

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANA BÁRBARA DIAS PEREIRA

**CONTRIBUIÇÃO PARA A PADRONIZAÇÃO QUÍMICA DE *Hancornia speciosa*
Gomes: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
A QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS**

Belo Horizonte – MG
2012

ANA BÁRBARA DIAS PEREIRA

**CONTRIBUIÇÃO PARA A PADRONIZAÇÃO QUÍMICA DE *Hancornia speciosa*
Gomes: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador Prof. Dr. Fernão Castro Braga - UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA BÁRBARA DIAS PEREIRA

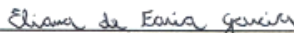
**“Contribuição para a padronização química de
Hancornia speciosa Gomes: desenvolvimento e
validação de métodos analíticos para quantificação de
marcadores químicos”**

Dissertação, como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em 06 de fevereiro de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dra. Maria Beatriz de Abreu Glória - UFMG



Prof. Dra. Eliana de Faria Garcia - Newton Paiva



Prof. Dr. Fernaldo Castro Braga - UFMG

*Aos meus amados pais, Lessandra e José Dias,
e à querida Lurdinha.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Fernão Castro Braga, meu querido orientador, agradeço especialmente pela confiança depositada, por despertar em mim o amor pela fitoquímica, por tantos ensinamentos ao longo desses anos de convivência. Exemplo de profissional, de ética e dedicação à pesquisa, mas, acima de tudo, um ser humano admirável! Obrigada, chefinho!

Aos meus Pais, Lessandra e José Dias, agradeço especialmente pelos valores morais ensinados, pelo apoio incondicional, pelo amor, por tornar minha caminhada mais leve e por acreditarem em meu potencial. Meu pai, exemplo de ser humano e, minha mãe, a amiga mais leal, sempre ao meu lado.

À Suzan, minha 'mãe' da fitoquímica, por todos os ensinamentos durante a iniciação científica, por me apresentar à fitoquímica, paixão irremediável em minha vida, pelos princípios morais e éticos apresentados. Pelo apoio para o meu crescimento como pesquisadora, pelos conselhos e por todo o carinho.

Ao Talisson e à Mariana, pelo trabalho desenvolvido, pela dedicação e pelos momentos de descontração.

Ao Professor Steyner de França Côrtes, pela colaboração com os ensaios biológicos.

À Grazi, pela realização dos ensaios biológicos.

Ao Antônio, pelo suporte técnico e disponibilidade.

À Bubu, pelo companheirismo, por me escutar em tantos momentos, por me apoiar, pela especial amizade e por tornar esses últimos anos mais leves e felizes.

Às amigas da fitoquímica, Bruna, Prica, Lili, Mariana, Raquel, pelos momentos agradáveis e de descontração, pelo apoio e pela amizade.

Ao Celinho, grande 'Dones', por estar comigo desde a iniciação científica e por me ensinar tanto ao longo desses anos. Exemplo de dedicação e amor à profissão.

Ao Professor Ricardo José Alves, pela contribuição imprescindível ao desenvolvimento deste trabalho, pelo exemplo de dedicação à docência e pelos ensinamentos de espectrometria.

Aos amigos do Laboratório de Química Farmacêutica, Marcela, Saulo, Tiago, Estefânia, Bruno, pelos materiais e reagentes compartilhados e pelos espectros de IV.

Ao Professor José Dias Alves, pelos espectros de RMN.

A todos os amigos da fitoquímica, Juliana, Renata, Maria Fernanda, Sarah, Marina, Marininha, Guilherme, Graça, Prof. Rachel, Prof. Alaíde, Taís, Patrícia, Hermine, pelo convívio de cada dia, pela paciência e troca de experiências.

Aos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade, pelo compartilhamento de materiais e reagentes.

Ao Rodrigo, exemplo de profissional e de pessoa, pelas conversas e pela colaboração neste trabalho.

Aos meus irmãos, Júnior e Tarcísio, pelo companheirismo de cada dia, pelo amor e paciência.

Ao Pedro, por todo amor e pelas alegrias proporcionadas na etapa de conclusão deste trabalho, transformando momentos de tensão em gargalhadas, ansiedade em carinho e descrença em fé.

À Claudinha, companheira de todas as horas, pela paciência, compreensão e pelos momentos de descontração.

À Lurdinha, minha mãe de coração, pelo amor, carinho e apoio.

Às minhas queridas amigas Mariana, Carla Amaral, Aline Lúcia, Aline Fortunato e Carla Elvira, pelos momentos de descontração, companheirismo e pela amizade.

Às minhas amigas Paula, Ohana, Fernanda, Bárbara, Raquel e Arianne, pela amizade.

RESUMO

Hancornia speciosa Gomes, popularmente conhecida como mangaba, tem uso etnomédico para o tratamento de hipertensão e diabetes, entre outros. A potencial atividade anti-hipertensiva da espécie foi relatada em trabalhos anteriores de nosso grupo em modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, sendo rutina, L-(+)-bornesitol e ácido clorogênico identificados como constituintes bioativos. O presente trabalho teve como objetivo quantificar os principais constituintes químicos em extratos de folhas da espécie, visando contribuir para sua padronização. Para tanto, foram desenvolvidos e validados métodos analíticos. Foram definidos como marcadores químicos o ácido clorogênico, rutina, L-(+)-bornesitol, flavonoides totais e FlavHS, um triglicosídeo de quercetina identificado por análises de CLAE-EM, empregando-se análises de impressão digital química de extratos etanólicos de folhas da espécie, obtidas de diferentes acessos genéticos. Os teores de flavonoides totais foram determinados por espectrofotometria no UV/Vis após reação com cloreto de alumínio. O método foi validado e apresentou linearidade ($r^2 > 0,99$), seletividade, precisão (DPR < 3,09%), exatidão (recuperação entre 94,03% e 96,24%) e robustez adequadas. Um método por CLAE-DAD foi desenvolvido e validado para a quantificação de rutina, ácido clorogênico e FlavHS, o qual apresentou parâmetros adequados de linearidade ($r^2 > 0,9968$), seletividade, precisão (DPR < 2,65%), exatidão (recuperação entre 97,09% e 102,97) e robustez. CLAE com detector de índice de refração foi avaliada para quantificação de L-(+)-bornesitol em matrizes de *H. speciosa*; porém, não se obteve seletividade adequada nas condições cromatográficas estabelecidas. Como alternativa, desenvolveu-se um método por CLAE-DAD para a quantificação deste ciclitol com derivatização prévia da amostra com cloreto de *p*-toluenossulfonila, utilizando-se pentaeritritol como padrão interno. A validação do método indicou parâmetros analíticos adequados de linearidade ($r^2 > 0,9942$), seletividade, precisão (DPR < 3,17%), exatidão (recuperação entre 92,31% e 99,13%) e robustez. Os métodos desenvolvidos foram aplicados na análise de extratos etanólicos provenientes de oito acessos distintos de *H. speciosa*, que apresentaram diferenças marcantes nos teores dos marcadores químicos. L-(+)-bornesitol foi o constituinte majoritário (teores de 5,77±0,09% a 8,78±0,14%), seguido por flavonoides totais (teores de 1,83±0,09% a 4,84±0,12%), rutina (teores de 1,05±0,00% a 2,00±0,03%), ácido clorogênico (teores de 0,80±0,01% a 1,52 ± 0,02%) e FlavHS (teores de

0,32±0,00% a 0,84±0,00). Os constituintes quantificados poderão ser utilizados para a padronização de derivados da droga vegetal folhas de *H. speciosa*.

Palavras-chaves: *Hancornia speciosa*, L-(+)-bornesitol, quantificação, derivatização, rutina, ácido clorogênico

ABSTRACT

Hancornia speciosa Gomes, a plant species popularly named “mangaba”, has ethnomedical uses to treat hypertension and diabetes, among others. The potential antihypertensive activity of the species has been previously described by our group employing *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* assays, rutin, L-(+)-bornesitol and quinic acid being regarded as the bioactive compounds. The goal of this work was to quantify the main constituents in extracts from *H. speciosa* leaves, aiming to contribute to their standardization. Analytical methods were developed and validated for this purpose. Definition of chemical markers for quantification was based on chemical fingerprint analyses of plant materials collected from different specimens. Chlorogenic acid, rutin, L-(+)-bornesitol, total flavonoids and FlavHS, a quercetin triglycoside identified by HPLC-MS analysis, were selected for quantitation. The contents of total flavonoids were assayed by spectrophotometry on UV-Vis, after chemical reaction with aluminum chloride. The method showed adequate linearity ($r^2 > 0.99$), selectivity, precision (RSD < 3.09%), accuracy (recovery between 94.03% - 96.24%) and robustness. An HPLC-DAD method was developed and validated to quantify rutin, chlorogenic acid and FlavHS, which was shown to be linear ($r^2 > 0.9968$), selective, precise (RSD < 2.65%), accurate (recovery between 97.09% - 102.97) and robust in the established conditions. HPLC with refractive index detector was evaluated to quantify L-(+)-bornesitol in matrices of *H. speciosa*; however, the established chromatographic conditions were not selective for quantitative analysis. As alternative, an HPLC-DAD method was developed to quantify this cyclitol in *H. speciosa* employing a derivatization step with *p*-toluenesulfonyl chloride and pentaerythritol as internal standard. The method presented adequate linearity ($r^2 > 0.9942$), selectivity, precision (RSD < 3.17%), accuracy (recovery between 92.31% - 99.13%) and robustness. The developed methods were employed for the analysis of ethanol extracts from leaves of eight specimens, which showed significant differences in the contents of chemical markers. L-(+)-bornesitol was the major compound ($5.77 \pm 0.09\%$ to $8.78 \pm 0.14\%$), followed by total flavonoids ($1.83 \pm 0.09\%$ to $4.84 \pm 0.12\%$), rutin ($1.05 \pm 0.00\%$ to $2.00 \pm 0.03\%$), chlorogenic acid ($0.80 \pm 0.01\%$ to $1.52 \pm 0.02\%$) and FlavHS ($0.32 \pm 0.001\%$ to 0.84 ± 0.00). The quantified compounds may be employed for standardization of derivatives from *H. speciosa* leaves.

Keywords: *Hancornia speciosa*, L-(+)-bornesitol, quantification, derivatization, rutin, chlorogenic acid

LISTA DE FIGURAS

1 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para (a) extrato etanólico de folhas de <i>H. speciosa</i> ; (b) ácido clorogênico; (c) ácido cafeico; (d) ácido quínico; (e) quercetina; (f) rutina e (g) canferol.....	79
2 Espectros no UV obtidos <i>on-line</i> pelo detector DAD para (a) ácido quínico (TR = 1,15 min) e (b) pico com TR = 1,22 min presente no extrato etanólico de <i>H. speciosa</i>	80
3 Espectros no UV obtidos <i>on-line</i> pelo detector DAD para (a) ácido cafeico e (b) picos do extrato etanólico de <i>H. speciosa</i> com tempo de retenção de 8-9 min.....	81
4 Espectro no UV obtido <i>on-line</i> pelo detector DAD para substância com TR de 14,9 min (FlavHS) e rutina (TR 15,3 min).	81
5 Perfil cromatográfico obtido por CLAE-EM da fração rica em flavonoides (a) e espectros de massas obtidos por ionização por spray de elétrons (ESI+) do pico com TR 7,4 (b) e MS2 do pico em m/z 757,2 (c).	82
6 Esquema de fragmentação proposto para FlavHS	84
7 Espectros no UV-Vis, registrados na região de 200 a 500 nm, obtidos pela varredura da solução de leitura proveniente da amostra HFAEM (a) sem adição de AlCl ₃ e (b) após adição de AlCl ₃	87
8 Curvas analíticas obtida pelo método de UV para a substância de referência de rutina, após reação com AlCl ₃	88
9 Teores médios de flavonoides totais na fração HFAEM obtidos em diferentes tempos de leitura, após reação com AlCl ₃	92
10 Teores de flavonoides totais, expressos como a média de seis determinações (n = 6), obtidos após adição de diferentes volumes de AlCl ₃	93
11 Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD para o extrato etanólico de folhas de <i>H. speciosa</i> , utilizando gradiente exploratório	94
12 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as condições analíticas A, B, C e D....	95
13 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as condições analíticas E e F.....	96
14 Perfis das curvas de gradiente disponíveis programa Empower 2 (Waters).....	97
15 Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD para a condição analítica G.....	97
16 Extração de ácido clorogênico, rutina e FlavHS do extrato MFA em três sistemas de solventes: água, MeOH e solução hidrometanólica a 50% (n = 3)	98
17 Cromatograma obtido por CLAE-DAD para extrato MFA de folhas de <i>H. speciosa</i>	100
18 Média das curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD, em dois dias de análise, para o ácido clorogênico	103

19 Média das curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD, em dois dias de análise, para rotina	103
20 Teores médios dos analitos em soluções hidrometanólicas a 50 %, mantidas à temperatura ambiente (23 ± 2 °C)	105
21 Influência do fluxo, lote de coluna, concentração de ácido na fase móvel e temperatura na quantificação de ácido clorogênico, FlavHS e rutina em <i>H. speciosa</i> (média, $n = 6$)	109
22 Cromatograma obtido por CLAE-IR para bornesitol, utilizando como eluente água:MeOH (95:5) e coluna de ODS	113
23 Cromatograma obtido por CLAE-IR para a fração enriquecida em ciclitóis e flavonoides de <i>H. speciosa</i>	113
24 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-IR para (a) bornesitol e (b) fração enriquecida em ciclitóis e flavonoides de <i>H. speciosa</i>	114
25 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-IR para (a) bornesitol e (b) fração enriquecida em ciclitóis e flavonoides de <i>H. speciosa</i>	114
26 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-IR com coluna de amino para a fração enriquecida em ciclitóis e flavonoides de <i>H. speciosa</i>	115
27 Cromatograma obtido por CCD de sílica gel para o eluato do pico correspondente ao bornesitol, para avaliação da seletividade do método por CLAE-IR	116
28 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para a reação de tosilação de (a) substância de referência bornesitol e (b) extrato etanólico de folhas de <i>H. speciosa</i> CFOF	117
29 Cromatograma obtido por CCD de sílica gel para monssacarídeos de referência, extrato e frações de <i>H. speciosa</i>	119
30 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as condições analíticas A e B	121
31 Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD na condição analítica C	121
32 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as condições analíticas D e E	122
33 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as condições analíticas F e G	123
34 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as condições analíticas H, I e J	124
35 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as condições analíticas K e L	124
36 Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD para a condição analítica estabelecida (M)	124
37 Efeito do tempo de reação e volume de piridina no teor de bornesitol pertosilado (PTB), expresso como a média da relação de áreas entre PTB e o produto de tosilação do P.I. (PPI) \pm D.P. ($n = 3$)	125
38 Efeito da massa de TsCl no teor de bornesitol pertosilado (PTB), expresso como média da relação de áreas PTB/PPI \pm D.P. ($n = 3$)	126

39 Efeito dos parâmetros temperatura e volume de ACN no teor de PTB, expresso como média da relação de áreas entre PTB/PPI \pm D.P. ($n=3$)	126
40 Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD para o extrato MFA de <i>H. speciosa</i> após reação de derivatização.....	127
41 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD nos ensaios para avaliar a seletividade do método.....	128
42 Curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD em dois dias de análise e curva média resultante para a quantificação de bornesitol em <i>H. speciosa</i>	131
43 Teores médios ($n = 6$) de bornesitol em estudo de estabilidade dos produtos de tosilção do analito (PTB) e do padrão interno (PPI) nas soluções reacionais obtidas para o extrato MFA de <i>H. speciosa</i> , mantidos à temperatura ambiente (23 ± 2 °C).....	133
44 Influência do fluxo, lote de coluna e temperatura no teor de bornesitol em <i>H. speciosa</i> (média, $n = 6$)	136
45 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR para os extratos etanólicos de folhas de <i>H. speciosa</i> e para substâncias de referência	137
46 Teores de marcadores químicos em extratos etanólicos de folhas de <i>H. speciosa</i> (média \pm d.p., $n = 3$), provenientes de acessos distintos da espécie, cultivadas no EMEPA-PB.....	139

LISTA DE TABELAS

1 Programa de eluição estabelecido para a análise de extratos e frações de folhas de <i>H. speciosa</i>	42
2 Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método por CLAE-DAD para quantificação de rutina, ácido clorogênico e FlavHS em extratos e frações de <i>Hancornia speciosa</i>	51
3 Programa de eluição estabelecido para a quantificação de rutina e ácido clorogênico em extratos e frações de folhas de <i>H. speciosa</i>	53
4 Volumes de soluções de referência e massas correspondentes utilizadas para construção das curvas analíticas	56
5 Correspondência entre os volumes e as massas injetadas no sistema de CLAE para determinação do limite de quantificação.....	57
6 Volumes e massas das substâncias de referência adicionadas ao extrato MFA no ensaio de exatidão (recuperação) de ácido clorogênico e rutina em <i>H. speciosa</i>	60
7 Condições analíticas avaliadas por CLAE-IR para a análise de bornesitol em matrizes de <i>H. speciosa</i>	63
8 Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método por CLAE-DAD para quantificação de bornesitol em extratos e frações de folhas de <i>H. speciosa</i>	66
9 Condições reacionais avaliadas para o desenvolvimento de método analítico para quantificação de bornesitol em extratos e frações de folhas de <i>H. speciosa</i> após derivatização com cloreto de <i>p</i> -toluenossulfonila.....	68
10 Sistema de eluição estabelecido para o método por CLAE-DAD para quantificação de bornesitol em extratos e frações de folhas de <i>H. speciosa</i>	69
11 Volumes das soluções padrão e massas de bornesitol e P.I correspondentes utilizadas para construção da curva analítica.....	72
12 Volumes das soluções 1 e 2 e massas correspondentes de bornesitol e P.I. empregados para a determinação do limite de quantificação do método	73
13 Volumes das soluções A e B e massas correspondentes das substâncias de referência adicionadas ao extrato MFA para o ensaio de recuperação	76
14 Concentrações das soluções de rutina após reação com $AlCl_3$ e leituras de absorvância para os pontos da curva analítica	87
15 Resultados da análise estatística dos dados da curva analítica obtida para a quantificação de rutina por espectrofotometria no UV-Vis, após reação com $AlCl_3$	88
16 Valores de absorvância, concentrações (mg/mL) e teores de flavonoides totais obtidos para as soluções de leitura na avaliação da precisão intradia	89

17	Valores de absorvâncias, concentrações (mg/mL) e teores de flavonoides totais obtidos para as soluções de leitura para avaliação da precisão interdia	90
18	Ensaio de recuperação de rutina para avaliar a exatidão do método de quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria no UV-Vis	91
19	Parâmetros de adequabilidade do sistema determinados para os picos dos analitos no extrato MFA de <i>H. speciosa</i>, empregando a condição cromatográfica estabelecida.....	100
20	Massa injetada, áreas médias ($n = 3$) e desvio padrão relativo (DPR) das curvas analíticas, para cada analito, nos dois dias de análise	102
21	Resultados da regressão linear para curvas analíticas dos analitos, em dois diferentes dias de análise	102
22	Limite de quantificação (LQ) do ácido clorogênico e rutina calculados pela equação de regressão e determinados experimentalmente.....	104
23	Limite de detecção (LD) do ácido clorogênico e rutina calculados a partir da equação de regressão e experimentalmente	105
24	Teores percentuais de ácido clorogênico, FlavHS e rutina no extrato MFA e valores de DPR utilizados para a determinação da precisão intradia do método	106
25	Teores percentuais de ácido clorogênico, FlavHS e rutina no extrato MFA e valores de DPR utilizados para determinação da precisão interdias do método	107
26	Recuperação de ácido clorogênico e rutina no extrato MFA de <i>H. speciosa</i> (média, $n = 3$)	108
27	Parâmetros de adequação do sistema determinados para os picos PTB e PPI no extrato MFA de <i>H. speciosa</i>, empregando a condição cromatográfica estabelecida.....	129
28	Massa injetada, áreas médias de PTB e PPI ($n = 3$) e valores de desvio padrão relativo (DPR) obtidos para as curvas analíticas, nos dois dias de análise	130
29	Resultados da regressão linear para as curvas analíticas de bornesitol, em dois dias consecutivos de análise	130
30	Limites de quantificação (LQ) do bornesitol calculados pela equação de regressão e determinados experimentalmente	131
31	Limite de detecção (LD) para o método de quantificação de bornesitol em <i>H. speciosa</i> calculado pela equação de regressão linear e determinado experimentalmente pela razão sinal/ruído	132
32	Teores percentuais de bornesitol no extrato MFA de <i>H. speciosa</i> e valores de DPR utilizados para a determinação da precisão intradia do método	133
33	Teores percentuais de bornesitol no extrato MFA de <i>H. speciosa</i> e valores de DPR utilizados para determinação da precisão interdia do método	134
34	Valores obtidos para o ensaio de recuperação de bornesitol no extrato MFA de <i>H. speciosa</i> (média, $n = 3$)	135

35 Rendimentos extrativos (%) para extratos de folhas de *H. speciosa* provenientes de diferentes acessos da espécie.....137

36 Teores de marcadores químicos em extratos etanólicos de folhas de *H. speciosa* provenientes de oito acessos da espécie fornecidos pela EMEPA-Pb138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	acetonitrila
AIDS	<i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Associação de Químicos Analíticos Oficiais)
CCD	cromatografia em camada delgada
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FR	cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
CLAE-EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectômetro de massas
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
CLAE-ESI-EM/EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectômetro de massas, por ionização por spray de elétrons
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CG-FID	cromatografia gasosa acoplada a detector por <i>flame ionization detector</i> (detector de ionização de chama)
DCV	doenças cardiovasculares
DI50	dose inibitória a 50%
ECA	enzima conversora de angiotensina
EtOAc	acetato de etila
EtOH	álcool etílico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Agência Regulatória Americana de Alimentos e Fármacos)
FIA-ESI-IT-MS/MS	<i>flow injection analysis – eletrospray ionization – ion trap – mass spectrometry</i> (espectrometria de massas acoplada a um <i>ion trap</i> com interface de ionização por eletrospray e inserção direta da amostra)
HAS	hipertensão arterial sistêmica
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i> (Conferência Internacional de Harmonização)
iECA	inibição da enzima conversora de angiotensina
IV	infravermelho
MeOH	metanol
mmHg	milímetros de mercúrio

iNOS	enzima óxido nítrico sintase induzível
<i>n</i>	número de repetições
NF-κB	<i>redox-sensitive nuclear transcription factor</i> κB (fator de transcrição nuclear κB redox-sensível)
NYHA	<i>New York Heart Association</i> (Associação Nova-iorquina de Coração)
ODS	octadecilsilano
OMS	Organização Mundial de Saúde
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PKA	proteína quinase A
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
R _f	fator de retenção
RMN de ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
rpm	rotações por minuto
TR	tempo de retenção
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i> (Farmacopeia dos Estados Unidos)
UV	ultravioleta
UV-Vis	ultravioleta e visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3 REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1 Hipertensão Arterial	25
3.2 <i>Hancornia speciosa</i> Gomes: ocorrência, usos populares e atividades biológicas.....	27
3.3 A química da espécie.....	30
4 PARTE EXPERIMENTAL	36
4.1 Equipamentos.....	36
4.2 Solventes e reagentes.....	37
4.3 Substâncias de referência	38
4.4 Vidrarias e materiais diversos.....	38
4.5 Obtenção da droga vegetal e preparo dos extratos.....	39
4.5.1 <u>Material vegetal</u>	39
4.5.2 <u>Obtenção dos extratos</u>	40
4.6 Soluções reveladoras	40
4.7 Avaliação da composição química da espécie para definição dos constituintes a serem quantificados em extratos e frações.....	41
4.8 Quantificação de flavonoides totais em extratos e frações de <i>H. speciosa</i> por espectrofotometria no UV-Vis	42
4.8.1 <u>Metodologia</u>	42
4.8.2 <u>Validação do método</u>	44
4.8.3 <u>Quantificação de flavonoides totais nos extratos e frações de <i>Hancornia speciosa</i></u>	48
4.9 Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de ácido clorogênico, rutina e FlavHS em <i>H. speciosa</i> por CLAE-DAD	49

4.9.1 <u>Sistema cromatográfico</u>	49
4.9.2 <u>Preparo das soluções de análise</u>	49
4.9.3 <u>Preparo da solução de referência das substâncias de referência</u>	49
4.9.4 <u>Desenvolvimento da condição cromatográfica</u>	49
4.9.5 <u>Otimização das condições de extração</u>	52
4.9.6 <u>Validação do método analítico</u>	52
4.9.7 <u>Quantificação de ácido clorogênico, FlavHS e rutina em extratos e frações de <i>H. speciosa</i></u>	61
4.10 Desenvolvimento de método analítico para quantificação do bornesitol em extratos e frações de <i>H. speciosa</i>	61
4.10.1 <u>Obtenção da substância de referência bornesitol</u>	61
4.10.2 <u>Análises por CLAE com detector de índice de refração (IR)</u>	62
4.10.3 <u>Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de bornesitol em <i>H. speciosa</i> por CLAE-DAD</u>	64
4.10.4 <u>Validação do método analítico para quantificação de bornesitol em extratos e frações de <i>H. speciosa</i></u>	68
4.10.5 <u>Quantificação de bornesitol em extratos e frações de <i>H. speciosa</i></u>	76
4.11 Avaliação química de diferentes acessos de <i>H. speciosa</i>	77
4.11.1 <u>Análise da composição quantitativa dos extratos</u>	77
4.11.2 <u>Obtenção de perfis cromatográficos por CLAE-DAD para os extratos</u>	77
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.1 Análise da composição química qualitativa de <i>H. speciosa</i>	78
5.2 Validação de método analítico por espectrofotometria no UV-Vis para a quantificação de flavonoides totais em <i>H. speciosa</i>	85
5.2.1 <u>Seletividade</u>	86
5.2.2 <u>Linearidade</u>	87
5.2.3 <u>Limites de quantificação e de detecção</u>	89
5.2.4 <u>Precisão intradia</u>	89
5.2.5 <u>Precisão interdia</u>	90

5.2.6 <u>Exatidão</u>	91
5.2.7 <u>Robustez</u>	91
5.3 Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação de ácido clorogênico, FlavHS e rutina em <i>H. speciosa</i>	93
5.3.1 <u>Desenvolvimento da metodologia analítica</u>	93
5.3.2 <u>Validação do método por CLAE-DAD para quantificação de ácido clorogênico, rutina e FlavHS em <i>H. speciosa</i></u>	99
5.4 Desenvolvimento de método analítico para quantificação de bornesitol em <i>H. speciosa</i>	109
5.4.1 <u>Purificação do bornesitol</u>	111
5.4.2 <u>Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração (CLAE-IR)</u>	112
5.4.3 <u>CLAE-DAD com derivatização prévia das amostras</u>	117
5.5 Avaliação da composição química de diferentes acessos de <i>Hancornia speciosa</i>	136
6 CONCLUSÃO	146
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142

1 INTRODUÇÃO

As plantas são uma fonte rica de substâncias bioativas que os homens têm utilizado ao longo da evolução com finalidades medicinais ou como drogas de abuso, muitas vezes sem conhecer seus constituintes químicos e mecanismos de ação (MACÍAS et al., 2007).

A evolução nos estudos de produtos naturais de plantas culminou no isolamento da primeira substância pura, morfina, comercializada pela Merck em 1826, e na obtenção do primeiro fármaco semi-sintético derivado de produtos naturais, o ácido acetilsalicílico (“aspirina”), pela Bayer, em 1899. Apesar da evolução no isolamento de produtos naturais bioativos de plantas e na otimização de protótipos moleculares, resultando na obtenção de novos fármacos, dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que aproximadamente 80% da população mundial utilizam plantas medicinais para o cuidado primário de saúde (NEWMAN et al., 2000).

A contribuição dos produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos é inquestionável e pode ser evidenciada pelos dados compilados por Newman e Cragg (2007): das 974 novas entidades químicas introduzidas no mercado americano no período entre 1981 e 2006, cerca da metade (51%) são produtos naturais, análogos semi-sintéticos de produtos naturais ou produtos sintéticos baseados em grupos farmacofóricos de produtos naturais. Apesar disso, o potencial não explorado de plantas como fonte de substâncias bioativas é enorme (BASSO et al., 2005). Dessa forma, a pesquisa de produtos naturais apresenta elevado potencial para a identificação de novas substâncias bioativas a partir de plantas ocorrentes no Brasil, com potencial para o desenvolvimento de fármacos e, portanto, que possam contribuir para consolidar e inovar o setor farmacêutico nacional.

A enorme biodiversidade do território brasileiro insere o país em uma posição estratégica para o desenvolvimento e exploração racional e sustentada de produtos naturais bioativos, uma vez que o Brasil tem a flora mais rica do mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas superiores – quase 19% da flora mundial (BASSO et al., 2005; GIULIETTI et al., 2005). A extensão do país abrange uma grande variedade de climas, tipos de solo e altitudes, fornecendo um conjunto de pressões seletivas para a adaptação das plantas nestes cenários, resultando em grande

diversidade de metabólitos secundários (BASSO et al., 2005). Apesar desse grande potencial, as plantas medicinais brasileiras ainda são pouco estudadas do ponto de vista químico e farmacológico (SIMÕES & SCHENKEL, 2002). Dessa forma, justifica-se o estudo fitoquímico e de atividades biológicas de plantas brasileiras, especialmente de plantas medicinais, com potencial para o desenvolvimento de fármacos.

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de incapacidade e de morte prematura em todo o mundo, contribuindo substancialmente para o aumento dos custos com saúde. Modificações nos fatores de risco para DCV, tais como redução de peso, dieta saudável, cessação do tabagismo, prática de exercícios físicos, redução da pressão arterial e controle dos níveis de colesterol, reduzem a mortalidade e morbidade relacionadas a essas doenças. Pressão arterial elevada é considerada um dos principais fatores de risco para DCV, causando cerca de sete milhões de mortes prematuras em todo o mundo (VI DIRETRIZES..., 2010; WHO, 2003; WHO, 2007). No Brasil, as DCV têm sido a principal causa de morte e inquéritos populacionais em cidades brasileiras nos últimos 20 anos apontaram uma prevalência de hipertensão arterial sistêmica (HAS) acima de 30% (VI DIRETRIZES..., 2010).

Apesar dos benefícios do controle da pressão arterial elevada na redução de DCV como o infarto, a hipertensão é tratada de maneira inadequada em grande número de casos. Estima-se que menos de 1/3 dos indivíduos com pressão arterial superior a 140/90 mmHg são tratados de forma adequada. Além disso, efeitos adversos são frequentemente relatados com os fármacos atualmente utilizados no tratamento (CHOBANIAN et al., 2003; KAPLAN & OPIE, 2006; WHO, 2003).

O uso terapêutico de produtos naturais para o tratamento de doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, doenças coronarianas, angina, hiperlipidemia e arritmias, é demonstrado por espécies de *Crataegus*, extensamente estudadas e utilizadas em países como Alemanha e Estados Unidos da América (FLATTERY, 2008; RIGELSKI & SWEET, 2002). Monografias de espécies de *Crataegus* constam da Farmacopéia Alemã e da Comissão E deste mesmo país, com indicação para o tratamento de insuficiência cardíaca no estágio II, segundo classificação da *New York Heart Association*

(NYHA). Os efeitos cardiovasculares dessas espécies estão relacionados à presença de flavonoides e proantocianidinas sendo as doses definidas em termos do conteúdo desses constituintes nos extratos (BLUMENTHAL, 1998). O efeito hipotensor e vasodilatador dependente de endotélio de extratos de *Crataegus* já foram relatados; porém, alguns autores consideram necessário realizar estudos adicionais para assegurar embasamento científico consistente no uso das espécies (ANSELM et al., 2009; CHEN et al., 1998; KIM et al., 2000; KOCYILDIZ et al., 2006; WALKER et al., 2002).

A espécie selecionada para estudo, *Hancornia speciosa* Gomes, apresenta potencial atividade anti-hipertensiva demonstrada em ensaios *in vitro* de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) para o extrato etanólico de folhas (BRAGA et al., 2000; SERRA et al., 2005) e atividade vasodilatadora dependente do endotélio, via óxido nítrico, em preparações *in vitro* de anéis de aorta, também para o extrato etanólico de folhas da espécie (FERREIRA et al., 2007a; FERREIRA et al., 2007b). Em outro trabalho de nosso grupo, Endringer (2007) obteve uma fração enriquecida em flavonoides e ciclitóis com pronunciada atividade inibitória da ECA (iECA) ($CI_{50} = 61,1 \pm 23,8 \mu\text{g/mL}$) e atividade inibitória do fator de transcrição nuclear kapa B (NF- κ B) ($CI_{50} = 1,1 \pm 0,0 \mu\text{g/mL}$). L-(+)-bornesitol e rutina foram isolados e identificados como os principais constituintes bioativos da espécie, além do ácido quínico (BRAGA et al., 2009). Recentemente, a atividade hipotensora de uma fração padronizada de *H. speciosa*, enriquecida em flavonoides e ciclitóis, foi demonstrada por nosso grupo em animais normotensos (SILVA, 2010; SILVA et al., 2011) e hipertensos (resultados ainda não publicados). Esses dados evidenciam de maneira inequívoca o potencial anti-hipertensivo da espécie. Além disso, o efeito sinérgico observado nos experimentos *in vitro* e *in vivo* indicam o potencial da espécie para o desenvolvimento de um fitoterápico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Quantificar os principais constituintes químicos presentes em derivados da droga vegetal folhas de *Hancornia speciosa*.

2.2 Objetivos específicos

1- Validar um método analítico por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível (UV-Vis) para a quantificação de flavonoides totais em extratos e frações de folhas de *H. speciosa*.

2- Desenvolver e validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar rutina, FlavHS (um triglicosídeo da quercetina) e ácido clorogênico nas matrizes supracitadas.

3- Desenvolver e validar um método analítico por CLAE para quantificar bornesitol nas matrizes supracitadas.

4- Preparar extratos de folhas de *H. speciosa* a partir de materiais vegetais oriundos de acessos genéticos distintos.

5-Quantificar flavonoides totais, rutina, FlavHS (um triglicosídeo da quercetina), bornesitol e ácido clorogênico nos extratos supracitados.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Hipertensão Arterial

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de incapacidade e de morte prematura em todo o mundo, contribuindo substancialmente para o aumento dos custos no cuidado com a saúde. DCV foram responsáveis por 30% das 58 milhões de mortes no mundo em 2005 (WHO, 2007). Os fatores de risco para DCV incluem tabagismo, dieta não saudável, sedentarismo, dislipidemias, hipertensão arterial e diabetes (WHO, 2007).

Dentre os fatores de riscos citados, a hipertensão arterial é o principal deles, sendo definida como uma condição clínica na qual a pressão arterial sistólica eleva-se para valores superiores a 140 mmHg e/ou a diastólica para valores superiores a 90 mmHg, em indivíduos que não estejam fazendo uso de medicação anti-hipertensiva (BRASIL, 2004; CHOBANIAN et al., 2003; MANCIA et al., 2007; VI DIRETRIZES..., 2010).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (VI DIRETRIZES..., 2010)

O controle da hipertensão reduz significativamente a morbidade e mortalidade associada ao sistema cardiovascular, diminui o risco de eventos fatais e não-fatais e de outros eventos coronarianos, além de diminuir a incidência de insuficiência cardíaca (MANCIA et al., 2007). A abordagem terapêutica depende da gravidade da hipertensão e inclui mudança nos hábitos de vida ou, em casos mais graves, abordagem farmacológica (MANCIA et al., 2007). A abordagem objetiva reduzir a pressão arterial para valores inferiores a 140/90 mmHg (BRASIL, 2004, MANCIA et al., 2007).

A terapia medicamentosa inclui diferentes classes de fármacos: diuréticos tiazídicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), bloqueadores dos canais de cálcio e dos receptores de angiotensina, além dos beta-bloqueadores (MANCIA et al., 2007; WHO, 2007). A escolha do agente terapêutico inicial deve ser feita considerando-se os fatores de risco associados a um dado paciente, bem como os benefícios que o agente terapêutico possa fornecer para o quadro, uma vez que os diferentes fármacos podem gerar efeitos protetores diferenciados sobre o sistema cardiovascular (MANCIA et al., 2007).

A monoterapia atinge a meta de redução da pressão arterial (para níveis inferiores a 140/90 mm Hg) em um número limitado de pacientes, e uma baixa dose de diuréticos tiazídicos, ou inibidores de ECA ou bloqueadores dos canais de cálcio é recomendada como terapia de primeira linha (MANCIA et al., 2007; WHO, 2007). Beta-bloqueadores só devem ser usados como primeira linha no tratamento da hipertensão quando houver uma indicação convincente, sendo benéfica a utilização dessa classe de fármacos em pacientes com angina, insuficiência cardíaca e infarto do miocárdio recente (MANCIA et al., 2007; WHO, 2007). Considerando-se a relação custo/efetividade, baixas doses de um diurético tiazídico deve ser alternativa de primeira escolha para a monoterapia (WHO, 2007).

Todavia, a maioria dos pacientes requer uma terapia combinada de agentes anti-hipertensivos de classes diferentes para o controle da pressão arterial. A implementação da terapia combinada adequada é um trabalho árduo para o médico e dispendioso para o paciente, devendo a abordagem ser individualizada e o sucesso terapêutico estritamente relacionado à adesão ao tratamento. Nesse contexto, devem-se considerar os efeitos adversos associados aos fármacos atualmente utilizados, uma vez que a adesão ao tratamento dependerá significativamente da tolerância do paciente. Exemplos de efeitos adversos causados por agentes anti-hipertensivos incluem ganho de peso, interferência com o metabolismo de lipídeos e aumento da incidência de diabetes com a utilização de beta-bloqueadores e efeitos dislipidêmicos e diabetogênicos relacionados ao uso de diuréticos tiazídicos (MANCIA et al., 2007).

Apesar da disponibilidade de diferentes agentes terapêuticos de classes distintas e com diferentes mecanismos de ação para o tratamento da hipertensão arterial, esta

é tratada de forma inadequada em grande número de casos: menos de 1/3 dos indivíduos com pressão arterial superior a 140/90 mmHg são adequadamente tratados, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2003). Este fato pode estar relacionado à incidência elevada de reações adversas e esquema terapêutico complexo, dificuldades na definição dos fármacos e doses adequados ao paciente, o que reduz a taxa de adesão ao tratamento, dentre outros fatores. Assim, a busca por novos fármacos anti-hipertensivos pode contribuir para a simplificação da terapia farmacológica. Neste contexto, os medicamentos fitoterápicos podem ser promissores, em função dos efeitos sinérgicos observados, além da menor incidência de efeitos adversos (WAGNER & ULRICH-MERZENIC, 2009).

3.2 *Hancornia speciosa* Gomes: ocorrência, usos populares e atividades biológicas

Hancornia speciosa Gomes, espécie denominada popularmente de mangabeira, mangaba ou mangava, é uma árvore frutífera de clima tropical, nativa do Brasil e encontrada em várias regiões do país, desde os tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas do Nordeste, onde é mais abundante, até os cerrados das regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste. Apresenta frutos aromáticos, saborosos e nutritivos, com ampla aceitação de mercado, tanto para o consumo *in natura*, quanto para a indústria, sendo empregados na produção de compotas, sorvete e xaropes, e, através de fermentação, para a produção de vinagre e álcool, além de constituir uma importante fonte de vitamina C (ALMEIDA, 1993; RUFINO et al., 2009)

Diversas partes da planta têm uso etnomédico. A casca possui propriedades adstringentes e é utilizada para tratar afecções hepáticas. O látex é usado no tratamento da tuberculose, úlceras, herpes, dermatoses e verrugas, enquanto o chá das folhas é indicado para cólica menstrual e o decocto da raiz para tratar luxações, hipertensão e como hipoglicemiante (ALMEIDA, 1993; BRASIL, 1984; MOREIRA, 1984). Em um levantamento de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas em Mato Grosso, a mangaba estava incluída na lista das dez espécies mais citadas, sendo a entrecasca a parte da planta utilizada (SILVA et al., 2010a). Em outro estudo etnobotânico, chá de folhas de mangaba foi descrito para tratar

doenças associadas ao aparelho genitourinário (MONTELES & PINHEIRO, 2007) e a espécie foi apontada como sendo utilizada para o tratamento de cólica menstrual, luxações e hipertensão (SOUZA & FELFILI, 2006). Em um levantamento etnobotânico de plantas medicinais no cerrado, decoctos da casca foram relatados para o tratamento de diabetes e obesidade e o unguento das cascas para tratar dermatoses (RODRIGUES & CARVALHO, 2001). Além do uso medicinal, o látex da espécie constitui matéria-prima para a fabricação de borracha (MALMONGE et al., 2009).

A revisão da literatura indica poucos trabalhos relativos às atividades biológicas de *H. speciosa*. O efeito gastroprotetor e ação anti-*Helicobacter pylori* do extrato etanólico de cascas da espécie foram demonstrados em ensaio *in vitro* por Moraes e colaboradores (2008). A atividade antioxidante foi relatada para os frutos da espécie em modelos *in vitro* (RUFINO et al., 2009). A atividade antiinflamatória, avaliada em modelo de edema de pata induzido por carragenina, e a atividade hipoglicemiante, avaliada em ratos com diabetes induzido por aloxana, foram relatadas em comunicações em congresso (KLEIN et al., 1996 *apud* ENDRINGER, 2007; LIMA & MARTINS, 1996 *apud* ENDRINGER, 2007). A atividade antifúngica de *H. speciosa* foi descrita por Costa e colaboradores (2008) usando ensaios de difusão em ágar, mas os constituintes responsáveis pela atividade não foram isolados, sendo atribuída aos taninos. Recentemente, foi relatada para o látex da espécie atividade contra *Candida albicans* (SILVA et al., 2010b), além de significativa atividade antiinflamatória avaliada em camundongos, associada à inibição da produção de óxido nítrico (NO), prostaglandina E₂ (PGE₂) e citocinas (MARINHO et al., 2011).

Nosso grupo de pesquisa vem avaliando o potencial anti-hipertensivo da espécie em diferentes modelos biológicos. A atividade inibitória da ECA *in vitro* foi inicialmente relatada para o extrato etanólico de folhas por Serra e colaboradores (2005), sendo obtida inibição enzimática de 45,7% para o extrato na concentração de 100 µg/mL. Posteriormente, foi relatada atividade vasodilatadora do extrato etanólico de folhas em preparações *ex vivo* de anéis de aorta de rato, efeito caracterizado como sendo dependente de endotélio, via óxido nítrico, bem como efeito vasodilatador em anéis de artéria mesentérica superior de ratos, efeito este dependente do endotélio, via NO, da ativação de canais de potássio e da liberação de fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FERREIRA et al., 2007a; FERREIRA et al., 2007b).

Em trabalho recente do nosso grupo, foi avaliada a atividade hipotensora de uma fração padronizada de folhas da espécie, enriquecida em flavonoides e ciclitóis, bem como seu mecanismo de ação (SILVA, 2010). Os resultados demonstraram uma redução significativa da pressão arterial sistólica em ratos normotensos após a administração intraperitoneal e oral da fração nas doses de 1 a 100 mg/Kg e que o mecanismo de ação da atividade hipotensora da fração envolve a inibição da ECA, redução da produção de angiotensina II e aumento dos níveis séricos de nitrito, além de efeito vasodilatador direto pela ativação da proteína quinase A (PKA) e de canais de potássio (SILVA, 2010; SILVA et al., 2011).

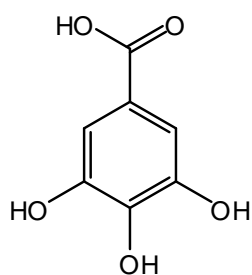
O estudo fitoquímico do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa*, biomonitorado pelo ensaio *in vitro* de inibição da ECA, realizado por Endringer (2007), resultou na identificação de L-(+)-bornesitol e rutina como principais constituintes bioativos, com valores de concentração inibitória a 50% (CI₅₀) de $8,0 \pm 1,8 \mu\text{g/mL}$ e $277,1 \pm 47,9 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Também foi avaliado pelo nosso grupo o efeito inibitório do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) do extrato bruto, da fração rica em ciclitóis e flavonoides, bem como dos constituintes isolados. Alguns inibidores da ECA em uso clínico como captopril e telmisartan apresentam significativa inibição da ativação do NF- κ B (NAKANO et al., 2009 ; AL-MAGHREBI et al., 2008). Essa inibição constitui um efeito adicional no tratamento de DCV, visto que o NF- κ B é responsável pela sinalização de mediadores inflamatórios com efeitos deletérios sobre os vasos sanguíneos.

A fração apresentou significativa inibição *in vitro* da ativação de NF- κ B, com CI₅₀ de $1,1 \pm 0,0 \mu\text{g/mL}$. Os constituintes da fração L-(+)-bornesitol (CI₅₀ = $5,3 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$), rutina (CI₅₀ = $16,4 \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$) e ácido quínico (CI₅₀ de $16,3 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$) também foram ativos (ENDRINGER et al., 2009), porém com valores de CI₅₀ superiores aos da fração, sugerindo a existência de sinergismo.

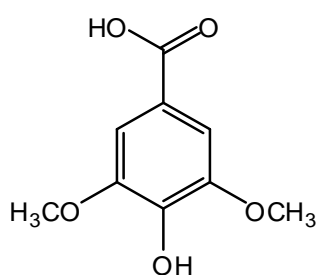
3.3 A química da espécie

H. speciosa já foi objeto de alguns estudos fitoquímicos. Do infuso das cascas da espécie foram isolados os ácidos gálico (1), 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (ácido siríngico) (2), 5-*O*-cafeoilquínico (3), 3-*O*-cafeoilquínico (4), além de *cis*-clorogenato de metila (5), *trans*-clorogenato de metila (6), 2,7-diidroxixantona (7) e 2,7-dimetoxixantona (8) (RODRIGUES et al., 2006). A presença de proantocianidinas do tipo B foi detectada em análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetria de massas (CLAE-EM), incluindo derivados C-glicosilados (RODRIGUES et al., 2007).

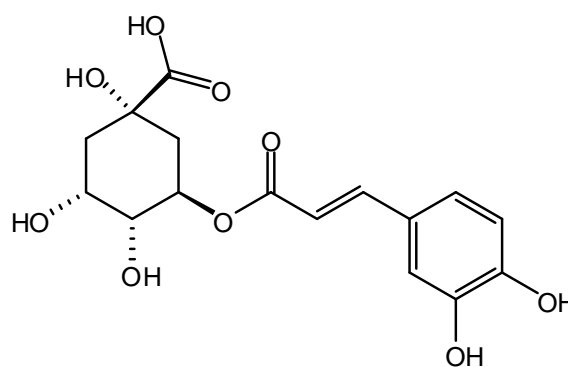
Os constituintes voláteis das folhas de *H. speciosa* foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), possibilitando a identificação do óxido de *trans*-linalol (9), óxido de *cis*-linalol (10), α -terpinol (11), linolol (12), geraniol (13), metil-antranilato (14), eugenol (15) e (*E*)-isoeugenol (16) (SANTOS et al., 2006). Em outro estudo, frutos de mangaba em três diferentes estágios de maturação foram avaliados empregando-se CG-EM e cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG-FID). Um total de 79 compostos voláteis foi identificado, entre aldeídos, ésteres, alcoóis, cetonas e monoterpenos (SAMPAIO & NOGUEIRA, 2006).



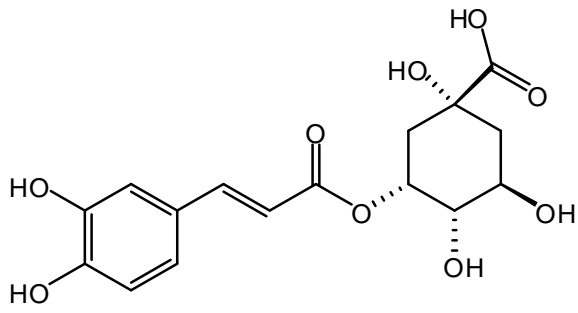
(1)



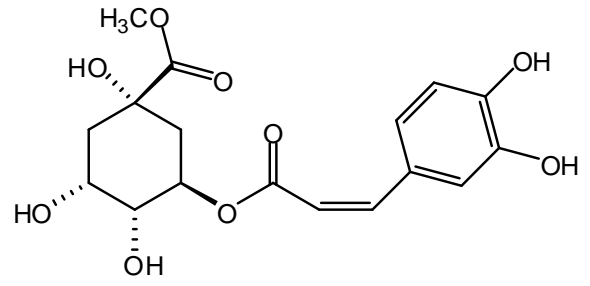
(2)



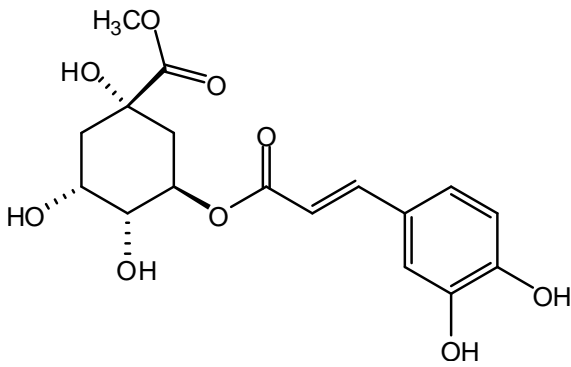
(3)



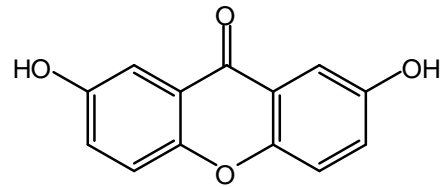
(4)



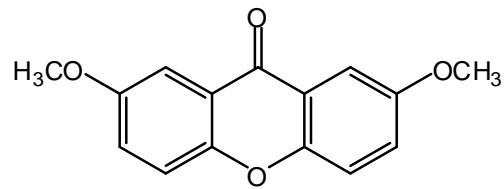
(5)



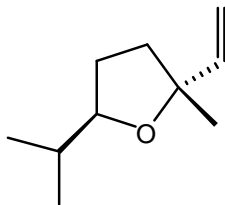
(6)



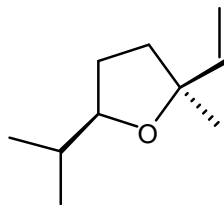
(7)



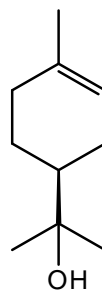
(8)



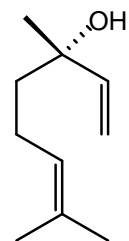
(9)



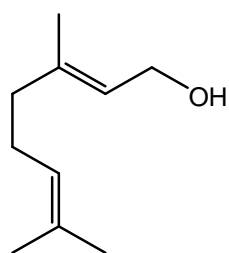
(10)



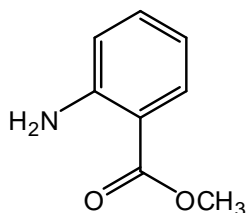
(11)



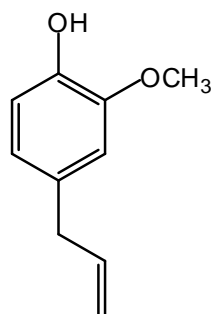
(12)



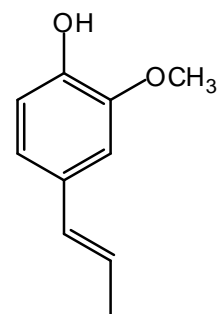
(13)



(14)



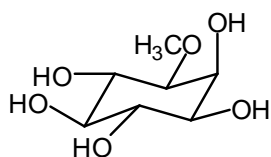
(15)



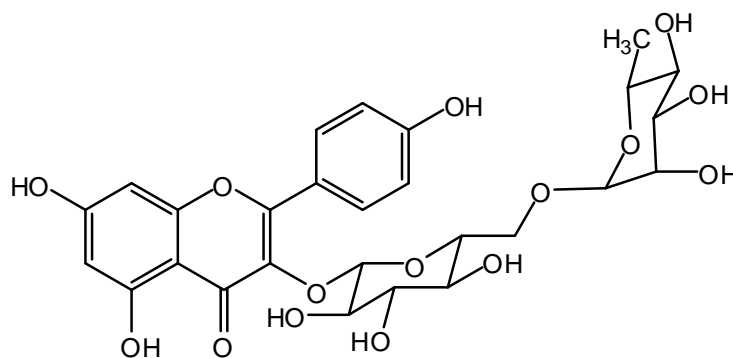
(16)

No trabalho de Endringer (2007), o fracionamento cromatográfico do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* resultou no isolamento de L-(+)-bornesitol (**17**), canferol-3-O-rutinosídeo (**18**), ácido 5-O-cafeoil-quínico (**3**), ácidos *cis* (**19**) e *trans* 4-hidroxi-cinâmico (**20**), α -amirina (**21**), lupeol (**22**) e seu 3 β -O-éster de ácido graxo (**23**), ácido quínico (**24**) e rutina (**25**).

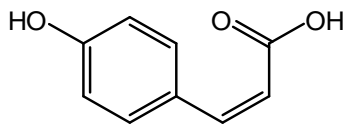
O fracionamento dos extratos hexânico e etanólico de folhas de *H. speciosa* por Barros (2008) resultou na obtenção, a partir do extrato hexânico, de mistura de hidrocarbonetos, mistura de álcoois de cadeia longa, mistura dos triterpenos α -amirina (**21**) e β -amirina (**26**), outra mistura dos triterpenos citados e lupeol (**22**), e uma mistura de obtusalina (**27**) e eritrodíol (**28**). Ainda do extrato hexânico, foi isolado o β -sitosterol (**29**), bem como obtida uma mistura de ésteres 3 β -O-acilados de α e β -amirina (**30**) e do lupeol (**31**); já do extrato etanólico foi obtida uma mistura de rutina (**25**) e ácido clorogênico (**3**).



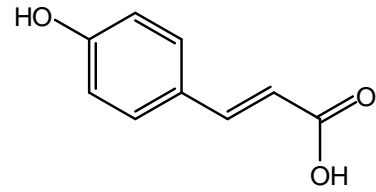
(17)



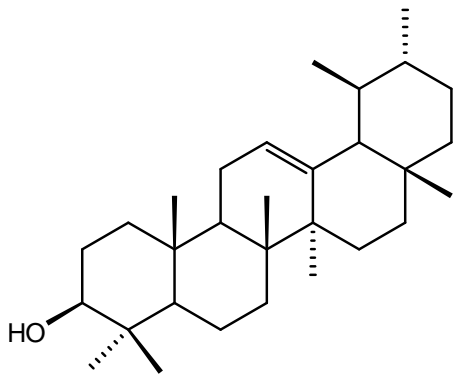
(18)



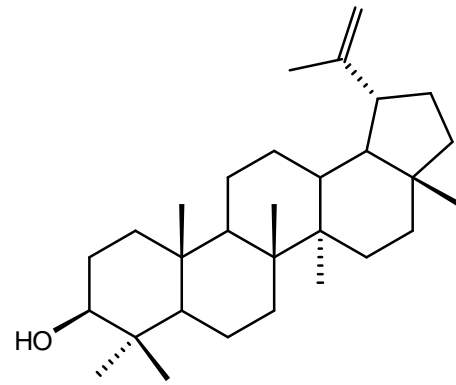
(19)



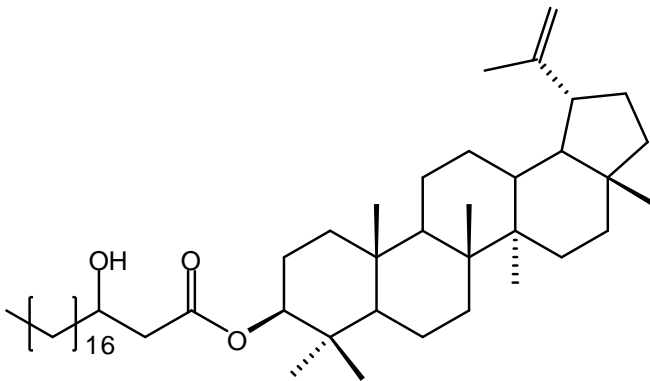
(20)



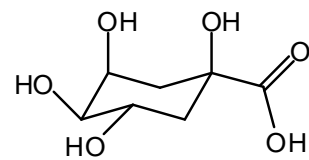
(21)



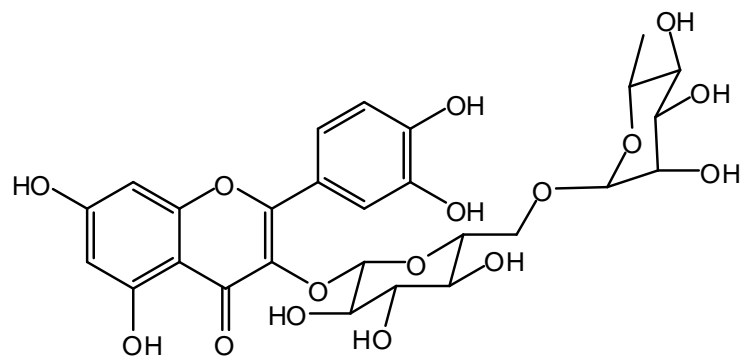
(22)



(23)

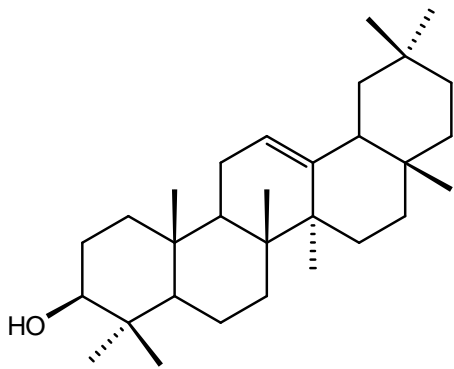


(24)

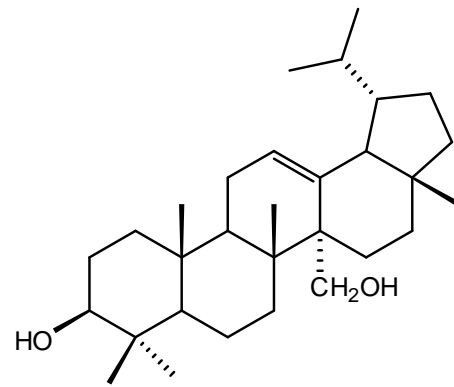


(25)

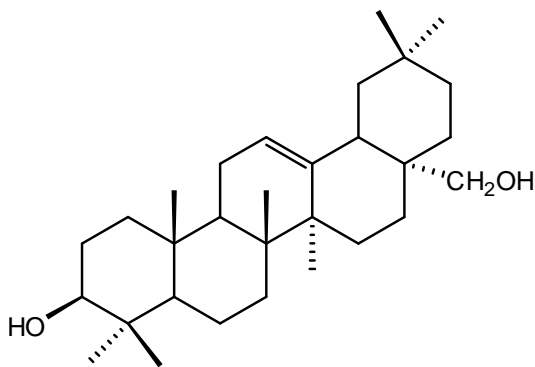
Em trabalho de Rodrigues (2007), cascas de *H. speciosa* foram utilizadas para o preparo de uma infusão, a qual após extração líquido-líquido e extração em fase sólida, foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), levando à identificação do ácido clorogênico (**3**), catequina (**32**), epicatequina (**33**) e galato de epigalocatequina (**34**). Neste mesmo trabalho utilizou-se espectrometria de massas acoplada a um *ion trap* com interface de ionização por spray de elétrons e inserção direta da amostra (FIA-ESI-IT-MS/MS) para identificar duas séries de proantocianidinas na espécie, com grau de polimerização de 1 a 6.



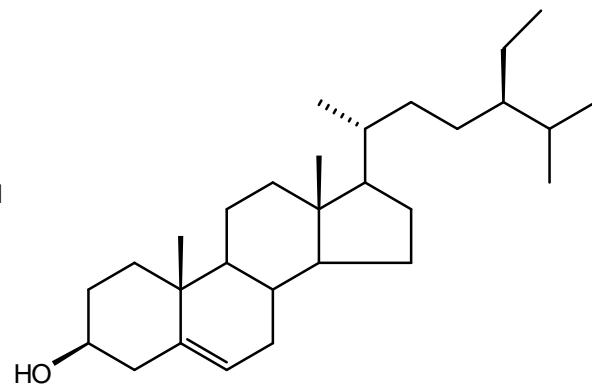
(26)



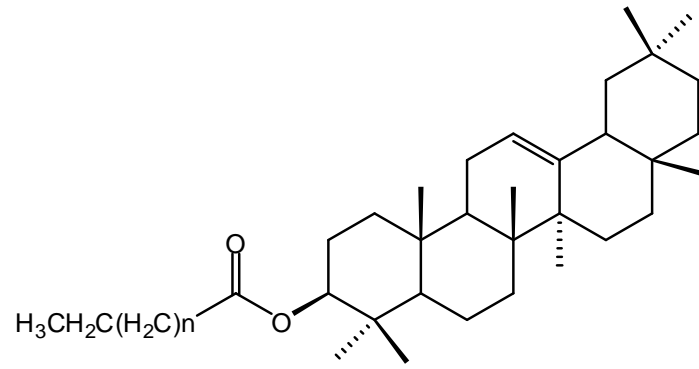
(27)



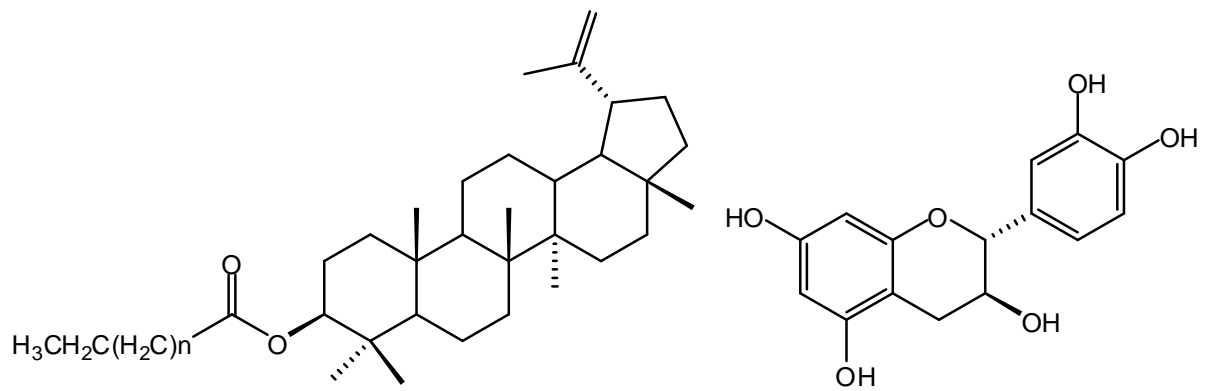
(28)



(29)

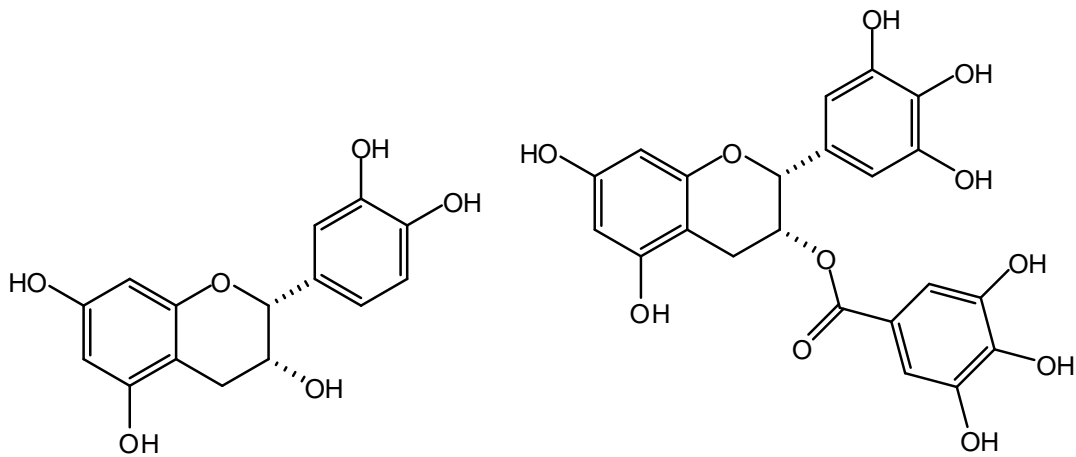


(30)



(31)

(32)



(33)

(34)

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Equipamentos

- Aparelho de ponto de fusão, modelo MQAPF – 301, Microquímica.
- Balança analítica Mettler, modelo AB 204.
- Balança semi-analítica Núcleo, modelo PR 1000.
- Banho de ultrassom Thornton, modelo T 50.
- Banho de ultrassom Unique, modelo USC 1400.
- Banho seco com agitação, Mixing Block, modelo MB-101, Bioer.
- Bombas de vácuo Fabbe (modelo 0320) e Edwards (modelo C 560786).
- Centrífuga Hermle Z323K.
- Chapas para aquecimento Fisatom, modelo 752 A e Corning, modelo V-092.
- Destilador de água Fabbe, modelo A 95.
- Espectrofotômetro UV-Vis, HITACHI, modelo U-2900
- Espectrofotômetro UV-Vis, Perkin Elmer, modelo Lambda 20.
- Espectrômetro de infravermelho FT-IR Perkin Elmer, modelo Spectrum One (Laboratório de Química Farmacêutica, FAFAR).
- Espectrômetro de massa de baixa resolução Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus (Central Analítica da USP, SP).
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Avance DRX, 400 MHz (LAREMAR, Departamento de Química, ICEX, UFMG).
- Evaporador rotatório Buchi, modelo B-480.

- Lâmpada de ultravioleta (UV) para cromatografia Spectroline, modelo 977 C (254 e 365 nm).
- Microcentrífuga Cientec, modelo CT-14000.
- Micropipetas HTL, vol. ajustável de 10 - 100 μ L e 100 - 1000 μ L.
- Moinho de facas Marconi, modelo MA680.
- Purificador de água Milli-Q Plus.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu, constituído de detector UV-VIS SPD-6AV e por índice de refração RID-AS, bomba LC-8A, sistema controlador de pressão SPD-6A e integrador C-R4A.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Waters, equipado com injetor automático 2695, detector de arranjos de diodos (DAD) 2996, bomba L-6200A, integrador C-R4A, e programa Empower para processamento de dados.
- Soprador térmico serigráfico Steinel, modelo HL-500.
- Tamis Tyler 20 mesh.
- Vortex Mixer, Vixar

4.2 Solventes e reagentes

- Solventes grau CLAE: acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH), Tedia.
- Solventes grau padrão analítico (P.A.): *n*-hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, éter etílico, acetona, metanol e álcool etílico, Quimex; álcool etílico 95%, Fmaia.
- Ácidos grau P.A.: ácido fórmico, ácido sulfúrico e ácido clorídrico, Merck.
- Álcool etílico comercial, Minálcool e Emfal.
- Sílica gel 60 Merck, 70-230 mesh.

- Sílica gel 60 Merck, 230-400 mesh.
- Sílica gel 60 G Merck.
- Cromatofolhas de alumínio recobertas por sílica gel 60 Merck, 20 x 20 cm.
- Piridina anidra, Merck e Sigma-Aldrich.
- Cloreto de *p*-toluenossulfonila (ReagentPlus), Sigma-Aldrich
- Cloreto de benzoila, Proquimios.
- Ácido fosfomolibdico, Vetec.

4.3 Substâncias de referência

Duas substâncias de referência de rutina foram utilizadas, ambas obtidas da Sigma-Aldrich: rutina triidratada (*Primary Reference Standard*) e rutina para CLAE com teor mínimo de 95%. Pentaeritritol (teor mínimo de 98%) foi obtido da Merck e as substâncias de referência ácido quínico, ácido cafeico, canferol, quercetina e ácido clorogênico da Sigma-Aldrich. Ramnose, glicose, arabinose, lactose e galactose foram provenientes de amostras disponíveis no Laboratório de Fitoquímica.

4.4 Vidrarias e materiais diversos

- Microtubo plástico de 2 mL e 1,5 mL do tipo *safe-lock*, Axygen.
- Balões volumétricos de 1, 10, 25 e 100 mL, Satelit, Normax e Blaubrand.
- Borrifador de vidro.
- Colunas cromatográficas de vidro de dimensões variadas.
- Coluna analítica para CLAE C-18 Lichrospher 100 (250 × 4,0 mm d.i.), Merck, partículas de 5 µm, com pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 × 4 mm), partículas de 5 µm.

- Coluna analítica para CLAE C-18 Lichrospher 100 (125 × 4,0 mm d.i.), Merck, partículas de 5 µm, com pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 × 4 mm), partículas de 5 µm.
- Coluna analítica de amino, Shimadzu, Shimpack, CLC-NH₂ (M) 25 cm.
- Coluna preparativa para CLAE C-18 Agilent (250 × 21,2 mm d.i.), partículas de 10 µm, com pré-coluna Agilent Prep C18.
- Coluna semi-preparativa para CLAE Zorbax SB-C18 (250 × 9,4 mm), Agilent, partículas de 5 µm, com pré-coluna Shimadzu Shim-pack G ODS.
- Cromatoplaças de vidro de 5 × 10 cm e 10 × 10 cm.
- Cubas cromatográficas de vidro Pirex.
- Frascos de penicilina com tampa de borracha.
- Papel indicador de pH Universal, pH 0-14, Merck.
- Percoladores de vidro e de aço inoxidável com volumes variados.
- Ponteiras plásticas, Corning.
- Tubos plásticos do tipo Falcon com volumes de 15 e 50 mL, TPP.
- *Vials* de vidro com tampa e septos de teflon para uso no injetor automático de sistema de CLAE.

4.5 Obtenção da droga vegetal e preparo dos extratos

4.5.1 Material vegetal

Oito acessos de *H. speciosa* foram cedidos pela Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA-PB), coletados em abril de 2009 do Banco de Germoplasma Ativo de Mangaba (BAG-Mangaba), em João Pessoa (coordenadas geográficas: 6° 33' 13" S e 34° 48' 31" O; altitude de 30 m). As folhas frescas foram

selecionadas, descartando-se aquelas atacadas por insetos. O material vegetal foi seco em estufa ventilada a 45°C e então pulverizado em moinho de facas. Foram recebidas de 0,5 kg a 3 kg de folhas frescas dos materiais supracitados. Os acessos recebidos foram codificados neste trabalho de acordo com a nomenclatura adotada pela EMEPA-PB: MFA, ASM, SPA, EMSA, CFOF, JSA, MBN e RVB.

4.5.2 Obtenção dos extratos

Foi realizada percolação exaustiva para cada um dos materiais vegetais provenientes dos oito acessos com etanol comercial 96° GL ou etanol (EtOH) a 95%. Os extratos etanólicos foram concentrados em evaporador rotatório, a 50°C, sob pressão reduzida, até resíduo, transferidos para frasco previamente tarado e mantidos em dessecador, sob vácuo, para completa eliminação do solvente residual, por no mínimo 48 h.

O extrato etanólico de folhas da espécie obtido por Endringer (2007) também foi empregado no desenvolvimento do trabalho, codificado como HFET, bem como uma fração proveniente do fracionamento cromatográfico do extrato HFET em coluna aberta de sílica gel, seguindo a série eluotrópica *n*-hexano, diclorometano, EtOAc e MeOH. A fração utilizada foi a resultante da eluição com EtOAc:MeOH (1:1), codificada como HFAEM.

4.6 Soluções reveladoras

- **Solução de ácido fosfomolibdico a 20% m/v em EtOH (ENDRINGER, 2007):** dissolveram-se 20 g de ácido fosfomolibdico em 100 mL de EtOH, sob resfriamento. Essa solução foi armazenada a 4 °C, até o momento do uso.
- **Solução de ácido sulfúrico a 50% v/v em EtOH (ENDRINGER, 2007):** misturaram-se 50 mL de ácido sulfúrico a 98% v/v em 50 mL de EtOH, sob resfriamento. Armazenou-se a 4 °C por, no máximo, 6 meses.

- **Reagente anisaldeído-ácido sulfúrico (WAGNER & BLADT, 1996):** Misturaram-se 0,5 mL de anisaldeído, 10,0 mL de ácido acético glacial, 85,0 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem.

4.7 Avaliação da composição química da espécie para definição dos constituintes a serem quantificados em extratos e frações

Para as análises, utilizou-se sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Waters 2695. A avaliação foi realizada empregando-se uma condição analítica otimizada para a análise de matrizes de *H. speciosa*, consistindo de coluna LiChrospher 100 RP-18 (125 x 4 mm d.i., 5 µm) e pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 x 4 mm d.i., 5 µm). A temperatura da coluna foi de 40 °C e como fase móvel utilizou-se água Milli-Q acidificada com 0,1% de ácido fosfórico (A) e acetonitrila grau CLAE acidificada com 0,1% de ácido fosfórico (B), com eluição em gradiente conforme apresentado na **Tabela 1**. O fluxo empregado foi de 1,0 mL/min e a detecção foi realizada em 350 nm, sendo o volume de injeção de 10 µL.

As soluções de referência foram preparadas individualmente. Pesou-se cerca de 1 mg de cada substância de referência (rutina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido quínico, canferol, quercetina) que foi solubilizado com 1,0 mL de MeOH grau CLAE, com auxílio de ultrassom por 15 min. Da mesma forma, cerca de 10 mg do extrato etanólico de folhas da espécie foram pesados e solubilizados com 1,0 mL do mesmo solvente, também sonificado por 15 min. Após solubilização, as amostras foram centrifugadas a 8.400 g por 10 min e alíquotas de 10 µL dos sobrenadantes foram injetados no sistema de CLAE descrito anteriormente. A detecção foi realizada em 210 nm.

Tabela 1 - Programa de eluição estabelecido para a análise de extratos e frações de folhas de *H. speciosa*.

Tempo (min)	%A	%B	Modo de eluição
0	95	5	Gradiente linear
40	60	40	Gradiente linear
50	5	95	Gradiente linear
60	95	5	-

Uma fração enriquecida em flavonoides oriunda do extrato etanólico de folhas SPA (item 4.10.1) foi obtida e analisada por CLAE-EM. Foi empregada a condição analítica consistindo de coluna C18 (250 × 4 mm d.i.); temperatura da coluna de 40 °C; fluxo de 0,4 mL/min. A fase móvel compreendeu eluição em gradiente de água acidificada com 0,1% ácido acético (solução A) e ACN (solução B), iniciando-se com 10% de ACN e elevando-se para 25% de ACN em 40 min.

4.8 Quantificação de flavonoides totais em extratos e frações de *H. speciosa* por espectrofotometria no UV-Vis

O método por espectrofotometria no UV-Vis para quantificação de flavonoides totais expressos como rutina, após reação com cloreto de alumínio (GARCIA, 2011; LEITE, 2002; LUENGAS-CAICEDO, 2005; RUSAK et al., 1993), foi validado conforme os parâmetros e especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC) (AOAC, 2002; BRASIL, 2003). Foram avaliados os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

4.8.1 Metodologia

4.8.1.1 Extração

Pesaram-se, exatamente, cerca de 30 a 50 mg do extrato ou fração a avaliar. Transferiu-se quantitativamente o material pesado para um balão de fundo redondo de 125 mL. Adicionaram-se 12 mL de metanol e aqueceu-se a mistura em manta

elétrica, sob refluxo, durante 30 min. O extrato obtido foi resfriado, deixado em repouso para que decantasse e filtrado através de algodão, recolhendo-se o filtrado, quantitativamente, em balão volumétrico de 25 mL. Recolheu-se, no balão anterior, o algodão e acrescentaram-se 10 mL de MeOH. A mistura foi extraída nas mesmas condições descritas anteriormente e filtrada, ao final, através de algodão, recolhendo-se o filtrado, quantitativamente, no mesmo balão. Lavou-se o algodão com 3 mL de metanol e completou-se o volume com este solvente.

4.8.1.2 Eliminação de carotenóides e clorofilas

Em um béquer foram misturados, na ordem indicada, 15 mL da solução metanólica obtida como descrito no item extração, 6 mL de clorofórmio e 9 mL de água. A mistura foi homogeneizada, transferida para tubo tipo Falcon e centrifugada a 3.074 g, por 10 min, para completa separação das fases. A camada hidrometanólica (superior) foi retirada com ajuda de uma pipeta de Pasteur e transferida para um balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com metanol.

4.8.1.3 Reação de coloração

Uma alíquota de 5,0 mL da solução hidrometanólica (item anterior) foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL; acrescentaram-se 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de solução de piridina:água (20:80) e 2,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado a 12% e completou-se o volume com água. Agitou-se e deixou-se em repouso por 20 min. Centrifugou-se a 3.074 g 10 minutos. Mediu-se a absorvância do sobrenadante em 420 nm, em cubetas de quartzo, frente à solução de compensação.

4.8.1.4 Solução de compensação

Preparou-se uma solução de compensação para anular a interferência da coloração natural do extrato ou fração. Para cada amostra elaborou-se uma solução de

compensação misturando-se 5 mL da solução hidrometanólica, 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de solução de piridina:água (20:80) e diluindo para 25 mL com água. Agitou-se e deixou-se em repouso por 20 min. Centrifugou-se a 3.074 g por 10 min e utilizou-se o sobrenadante.

4.8.2 Validação do método

4.8.2.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade do método foram obtidos espectros de soluções de leitura com e sem adição de cloreto de alumínio, da fração acetato de etila:metanol 1:1 (HFAEM; para modo de obtenção da fração, ver item 4.5) do extrato etanólico de *H. speciosa*, na faixa de 200 a 500 nm. A seletividade do método foi avaliada a partir da análise de bandas em 420 nm nos dois espectros, comprimento de onda utilizado para a leitura. A solução de leitura sem adição de cloreto de alumínio não deve apresentar nenhuma absorção significativa neste comprimento de onda, indicando que não há interferentes na matriz para a quantificação do complexo formado com o reagente de cor.

4.8.2.2 Linearidade

A solução estoque (0,5 mg/mL) foi preparada dissolvendo 5,0 mg de rutina, em metanol, em um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com o mesmo solvente. Empregaram-se alíquotas de 0,1 mL; 0,25 mL; 0,5 mL; 1,0 mL, 1,5 mL desta solução, correspondentes a 0,05 mg; 0,125 mg; 0,250 mg; 0,500 mg, e 0,750 mg de rutina, respectivamente. Completou-se cada um destes volumes para 2,0 mL pela adição de metanol. Adicionou-se, a cada balão, 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL de solução de piridina:água (20:80) e 2,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio hexaidratado a 12% e completou-se para 25,0 mL com água, obtendo-se soluções de concentração de 2, 5, 10, 20 e 30 µg/mL, respectivamente. Agitou-se e deixou-se em repouso por 30 minutos. Mediu-se a absorvância de cada solução em 420 nm, em cubetas de quartzo, frente ao branco. O branco foi

preparado em balão volumétrico de 25 mL adicionando-se 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL de solução de piridina:água (20:80), 2,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio hexaidratado a 12% e completando-se o volume com água. A partir das concentrações finais obtidas (0,002; 0,005; 0,010; 0,020 e 0,030 mg/mL) e das respectivas leituras de absorvância foi construída a curva analítica.

Foram construídas três curvas analíticas em dias diferentes. Análise de covariância foi empregada para definir se as curvas são estatisticamente iguais. A equação da reta foi determinada pelo método dos mínimos quadrados e as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software.

4.8.2.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação do método foi estimado empregando-se parâmetros da curva analítica, segundo a equação a seguir:

$$LQ = 10 \frac{s}{S}$$

Onde:

LQ = limite de quantificação,

s = desvio padrão do intercepto da curva de regressão,

S = inclinação da curva.

3.1.2.7 Limite de detecção

O limite de detecção do método foi determinado a partir dos parâmetros da curva analítica, segundo a equação a seguir:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S}$$

Onde:

LD = limite de detecção,

s = desvio padrão do intercepto da curva de regressão,

S = inclinação da curva analítica.

4.8.2.4 *Precisão intradia*

A precisão intradia do método foi verificada por meio de seis determinações no ponto médio de concentração de rutina na curva analítica. A partir da quantificação em triplicata da fração HFAEM (para modo de obtenção da fração, ver item 4.5) proveniente do extrato etanólico, foi determinado o teor de flavonoides totais desta amostra (13% m/m) e então foram estimadas as massas para obter a concentração de rutina no ponto médio da curva analítica. Assim, exatamente cerca de 30 mg de HFAEM foram pesados, em sextuplicata, e procedeu-se o preparo das soluções de leitura e posterior leitura no espectrofotômetro, conforme item 4.8.1.

O desvio padrão relativo (DPR) foi calculado para os teores encontrados ($n = 6$).

4.8.2.5 *Precisão interdía*

A precisão interdía foi avaliada conforme descrito para a precisão intradia, ou seja, no ponto médio de concentração da curva analítica, em dois dias diferentes e com analistas diferentes.

O DPR referente aos teores encontrados foi calculado ($n = 12$) e as médias dos teores entre os dois dias de determinações comparadas pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

4.8.2.6 *Exatidão*

A recuperação dos flavonoides na matriz foi avaliada pela fortificação do extrato EMSA (para modo de obtenção, ver item 4.5) com massas conhecidas de rutina

(substância de referência), em três níveis de concentração da curva analítica: alta, média e baixa. Cada nível foi avaliado em triplicata.

Foram preparadas três soluções padrão, conforme descrito a seguir.

Solução padrão 1 (10,0 mg/mL)

Pesaram-se exatamente 250 mg de rutina, que foram transferidos para balão volumétrico de 25,0 mL. Adicionaram-se 5 mL de metanol e submeteu-se a banho de ultrassom por cinco minutos. Completou-se o volume com metanol.

Solução padrão 2 (2,0 mg/mL)

Transferiram-se 2 mL da solução padrão 1 para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com metanol.

Solução padrão 3 (5 mg/mL)

Transferiram-se 5 mL da solução padrão 1 para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com metanol.

O preparo dessas soluções foi planejado para que o volume da solução de rutina adicionado ao extrato fosse o mesmo para os três níveis de concentração ensaiados.

O procedimento analítico foi realizado conforme descrito a seguir. Pesaram-se, em triplicata, exatamente cerca de 20,0 mg do extrato etanólico EMSA para cada um dos três níveis de concentração. Para o nível baixo de concentração, adicionou-se ao extrato 0,5 mL da solução padrão 2. Ao nível médio adicionou-se 0,5 mL da solução padrão 3, enquanto para o nível alto de concentração de flavonoides adicionou-se 0,5 mL da solução padrão 1. Pesaram-se, também em triplicata, exatamente cerca de 20,0 mg do extrato etanólico, porém sem a adição de solução de rutina. A obtenção das soluções de leituras foi conduzida conforme descrito no item 4.8.1. Para cada nível de concentração e para o extrato sem adição de rutina (extrato não fortificado) foi preparada uma solução de compensação.

4.8.2.7 Robustez

Seis soluções de leitura provenientes de três extrações diferentes foram preparadas a partir da fração HFAEM (para modo de obtenção da fração, ver item 4.5), conforme descrito nos item 4.8.1, variando-se alguns parâmetros analíticos indicados a seguir.

Volume da solução metanólica de AlCl_3 a 12%: 2,00; 2,50 e 3,00 mL. Para cada volume utilizado prepararam-se seis soluções de leitura, a partir de três extrações diferentes.

Tempo de leitura: seis soluções de leituras foram preparadas a partir de três extrações diferentes e foram lidas em 420 nm após 30, 70, 130, 190 e 250 minutos do preparo.

Foram calculados os teores de flavonoides totais em cada ensaio e os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos teores comparadas pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.8.3 Quantificação de flavonoides totais nos extratos e frações de *Hancornia speciosa*

Para a quantificação de flavonoides totais nos extratos e frações da espécie, as amostras foram preparadas e analisadas conforme descrito no item 4.8.1. Os teores foram calculados empregando-se a equação da curva analítica média obtida no ensaio de linearidade (item 4.8.2.2).

Os teores obtidos ($n = 3$) foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.9 Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de ácido clorogênico, rutina e FlavHS em *H. speciosa* por CLAE-DAD

4.9.1 Sistema cromatográfico

O desenvolvimento e validação do método foram realizados em sistema de CLAE Waters 2695. As análises foram realizadas em coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 × 4 mm i.d., 5 µm ou 125 × 4 mm i.d., 5 µm), em combinação com pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 × 4 mm i.d., 5 µm).

4.9.2 Preparo das soluções de análise

Para o desenvolvimento do método analítico, cerca de 10 mg dos extratos etanólicos de folhas de *H. speciosa* foram pesados diretamente para tubos plásticos do tipo *safe-lock* com capacidade de 1,5 mL. Os extratos foram solubilizados com 1,0 mL de MeOH medido com micropipeta volumétrica com capacidade de 100 - 1000 µL, e posteriormente sonificados por 15 min. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 8.400 g por 10 minutos. Alíquotas de 10 µL dos sobrenadantes foram injetadas automaticamente no sistema de CLAE.

4.9.3 Preparo da solução de referência das substâncias de referência

A solução de referência utilizada para a determinação da concentração das amostras em cada dia de análise foi preparada pesando-se exatamente cerca de 1,0 mg das substâncias rutina e ácido clorogênico para balão volumétrico de 10 mL. Utilizou-se metanol grau CLAE para a solubilização, auxiliada por sonicação, sendo o volume aferido com o mesmo solvente. Alíquotas de 10,0 µL dessa solução foram injetadas no sistema de CLAE, em cada dia de análise.

4.9.4 Desenvolvimento da condição cromatográfica

A condição analítica definida para o método de quantificação de rutina, FlavHS e ácido clorogênico foi otimizada avaliando-se a influência de parâmetros na resolução cromatográfica dos picos de interesse, tais como temperatura, fluxo, modo de eluição (isocrático e/ou em gradiente), concentração de ácido fosfórico na fase móvel e inclinação do gradiente. Um perfil exploratório do extrato etanólico foi inicialmente obtido (5 a 95 % de ACN em 70 min, ambos os solventes acidificados com 0,1 % de ácido fosfórico; 40°C; fluxo 1,0 mL/min, coluna LiChrospher 100 RP-18 de 125 x 4 mm d.i., partículas de 5 µm e pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 de 4 x 4 mm d.i.) para proposição das condições seguintes. As demais condições avaliadas estão descritas na **Tabela 2**. Os picos de interesse foram identificados em todas as condições pela co-injeção com as substâncias de referência e/ou pelos espectros no UV obtidos *on-line* pelo detector DAD.

A confiabilidade da condição cromatográfica estabelecida foi verificada pela seletividade do método e por testes de adequabilidade do sistema (*system suitability test*). A seletividade foi avaliada pela homogeneidade espectral dos picos, sendo a condição considerada seletiva quando espectros extraídos nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos apresentaram exata sobreposição. O método foi considerado seletivo quando, numa mesma condição analítica, todos os picos de interesse apresentaram homogeneidade espectral. Os testes de adequabilidade do sistema foram conduzidos pela avaliação dos parâmetros de resolução, fator de retenção, fator de cauda, número de pratos teóricos e DPR dos tempos de retenção para os picos de interesse. Todos os parâmetros foram calculados pelo *System Suitability* do programa Empower 2 (Waters), de acordo com as equações recomendadas pela Farmacopéia Americana (THE UNITED..., 2006), sendo os resultados expressos como valor médio de seis determinações e comparados com os limites recomendados pela Agência Regulatória Americana de Alimentos e Fármacos (FDA) (2000). O tempo morto (t_0) do sistema cromatográfico estabelecido foi determinado pela injeção, nas mesmas condições de análise, de 10 µL de solução hidrometanólica a 50 % de nitrato de sódio a 0,01% (m/v).

Tabela 2 - Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método por CLAE-DAD para quantificação de rutina, ácido clorogênico e FlavHS em extratos e frações de *Hancornia speciosa*.

Tempo (min)	Eluente* (%)		Fluxo (mL/min)	Tempo (min)	Eluente* (%)		Fluxo (mL/min)
	A	B			A	B	
Condição A**				Condição B**			
0	95	5	1,00	0	95	5	0,40
40	70	30	1,00	40	70	30	0,40
50	5	95	1,00	50	5	95	0,40
60	95	5	1,00	60	95	5	0,40
Condição C**				Condição D**			
0	90	10	0,40	0	90	10	0,40
50	70	30	0,40	50	85	15	0,40
55	5	95	0,40	55	5	95	0,40
60	5	95	0,40	60	5	95	0,40
65	90	10	0,40	65	90	10	0,40
Condição E***				Condição F***			
0	90	10	0,40	0	85	15	0,40
20	80	20	0,40	20	85	15	0,40
30	80	20	0,40	40	80	20	0,40
35	5	95	0,40	45	80	20	0,40
45	5	95	0,40	48	5	95	0,40
50	90	10	0,40	57	5	95	0,40
-	-	-	-	60	85	15	0,40
Condição G***,#							
0	85	15	0,40				
20	85	15	0,40				
40	80	20	0,40				
45	80	20	0,40				
48	5	95	0,40				
57	5	95	0,40				
60	85	15	0,40				

Nota: Eluentes: **A**, água; **B**, acetonitrila. Todos os eluentes foram acidificados com 0,1% de ácido fosfórico. **: coluna LiChrospher 100 RP-18 (125 × 4 mm i.d., 5 µm; Merck); ***: coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 × 4 mm i.d., 5 µm; Merck); #: Gradiente convexo Tipo 4. A detecção foi realizada no comprimento de onda de 350 nm para todas as condições ensaiadas.

4.9.5 Otimização das condições de extração

Três sistemas de solventes foram avaliados para solubilização dos extratos e frações: água, solução hidrometanólica a 50% e metanol grau CLAE. Cerca de 10 mg do extrato MFA (para modo de obtenção, ver item 4.5) foram exatamente pesados e solubilizados em 1,0 mL de cada um dos sistemas de solvente propostos. Os extratos foram sonicados por 15 min e centrifugados a 8.400 g por 10 min, sendo 10 µL do sobrenadante injetados automaticamente no sistema de CLAE descrito no item 4.9.14.9.1. Os testes foram realizados em triplicata para cada sistema de solvente. A eficiência da extração foi avaliada através da integração das áreas dos picos correspondentes às substâncias de interesse, utilizando as condições analíticas estabelecidas (item 4.9.6.1). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.9.6 Validação do método analítico

A validação do método cromatográfico desenvolvido (item 4.9.6.1) foi conduzida considerando-se critérios da Conferência Internacional de Harmonização (ICH), ANVISA e AOAC (AOAC, 2002; BRASIL, 2003; ICH, 1996).

A aquisição e o processamento dos dados foram realizados pelo programa Empower 2 (Waters). As análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism, versão 5 (GraphPad Software, 2007).

4.9.6.1 Condição cromatográfica estabelecida

A condição cromatográfica analítica foi estabelecida com coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 × 4 mm d.i., 5 µm) acoplada a pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 × 4 mm d.i., 5 µm). A temperatura da coluna foi de 40 °C e a fase móvel utilizada compreendeu gradiente de eluição de água Milli-Q acidificada com 0,1% de ácido fosfórico (A) e acetonitrila grau CLAE acidificada com 0,1% de ácido fosfórico (B),

apresentado na Tabela 3. O fluxo empregado foi de 0,4 mL/min e a detecção foi realizada em 350 nm, sendo o volume de injeção de 20 µL.

Tabela 3 - Programa de eluição estabelecido para a quantificação de rutina e ácido clorogênico em extratos e frações de folhas de *H. speciosa*.

Tempo (min)	%A	%B	Modo de eluição
0	85	15	Isocrático
20	85	15	gradiente convexo (Tipo 4)
40	80	20	Isocrático
45	80	20	gradiente convexo (Tipo 4)
48	5	95	isocrático
57	5	95	Gradiente convexo (Tipo 4)
60	85	15	-

4.9.6.2 Preparo das amostras

Pesaram-se exatamente cerca de 5,0 mg das amostras a serem analisadas e adicionou-se 1,0 mL de solução hidrometanólica a 50%. A solubilização foi conduzida em banho ultrassom por 15 min e posteriormente com agitação em vórtex. Na sequência, o extrato foi centrifugado a 8.400 g, por 10 min. Alíquotas de 20 µL do sobrenadante foram injetadas automaticamente no sistema de CLAE descrito no item 4.9.14.9.1.

4.9.6.3 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela homogeneidade espectral dos picos. Essa análise foi realizada pela sobreposição dos espectros registrados nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos, sendo considerados puros quando apresentaram exata sobreposição.

Para as determinações, foi empregado o extrato MFA (para modo de obtenção, ver item 4.5) de *H. speciosa* ($n = 6$).

4.9.6.4 Teste de adequabilidade do sistema

Experimentos de adequabilidade do sistema (*system suitability test*) foram realizados para estabelecer se o sistema cromatográfico e os procedimentos analíticos otimizados seriam capazes de fornecer dados de qualidade aceitável para análises quantitativas. Os parâmetros avaliados foram resolução, fator de retenção, fator de cauda, número de pratos teóricos e DPR dos tempos de retenção dos compostos de interesse. Os dados foram obtidos pelo *System Suitability* do programa Empower 2 (Waters), de acordo com as equações recomendadas pela Farmacopeia Americana (THE UNITED..., 2006), sendo os resultados expressos como valor médio de seis determinações. Os resultados foram comparados com os limites recomendados pelo FDA (2000). Para se estabelecer o tempo morto (t_0) da corrida cromatográfica injetou-se no sistema, nas mesmas condições de análise, alíquota de 20 μL de solução hidrometanólica a 50 % de nitrato de sódio a 0,01% (m/v).

4.9.6.5 Linearidade

A linearidade foi determinada a partir da construção de curvas analíticas, utilizando-se cinco concentrações distintas. Cada ponto das curvas analíticas foi obtido pela injeção, em triplicata, de massas diferentes das substâncias de referência.

As curvas analíticas foram construídas relacionando-se as áreas integradas dos picos de interesse e as respectivas massas injetadas, para cada substância de referência, em dois dias diferentes de análise.

Os dados obtidos foram avaliados através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação (r^2) correspondentes foram calculados. A análise estatística das curvas obtidas em dias diferentes foi realizada por análise de variância ($p < 0,05$).

4.9.6.5.1 Estimativas das faixas de concentração de trabalho

A estimativa das faixas de concentração de trabalho para os analitos foi obtida a partir dos teores percentuais de ácido clorogênico, rutina e FlavHS determinados em alguns extratos selecionados aleatoriamente, empregando-se o método desenvolvido neste trabalho.

4.9.6.5.2 Preparo da solução estoque das substâncias de referência

Foram preparadas duas soluções padrão contendo rutina e ácido clorogênico para a construção das curvas analíticas, conforme descrito a seguir:

Solução 1 (200 µg/mL)

Cerca de 2,0 mg de ambas as substâncias de referência foram pesados em balança de precisão analítica diretamente para balão volumétrico de 10 mL. Utilizou-se MeOH grau CLAE para solubilização, com auxílio de ultrassom por 15 min, sendo o volume aferido com o mesmo solvente.

Solução 2 (20,0 µg/mL)

Com o auxílio de micropipetador automático com capacidade de 100 a 1.000 µL, transferiram-se 500 µL da solução 1 para balão volumétrico de 5 mL. O volume foi aferido com MeOH grau CLAE.

A **Tabela 4** apresenta os volumes de cada solução injetada e as massas correspondentes das substâncias de referência, para cada ponto das curvas analíticas.

Tabela 4 - Volumes de soluções de referência e massas correspondentes utilizadas para construção das curvas analíticas.

Níveis de concentração	Volume Solução 1 (µl)	Volume Solução 2 (µl)	Massa da substância de referência (µg)
ÁCIDO CLOROGÊNICO			
1	-	10	0,2
2	5	-	1,0
3	10	-	2,0
4	15	-	3,0
5	20	-	4,0
RUTINA			
1	-	10	0,2
2	5	-	1,0
3	10	-	2,0
4	15	-	3,0
5	20	-	4,0

Condições cromatográficas: vide parte experimental item 4.9.6.1.

4.9.6.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi inicialmente estimado a partir da equação que considera os parâmetros da curva analítica, descrita a seguir:

$$LQ = 10 \frac{s}{S}$$

onde:

LQ: limite de quantificação

s: desvio padrão do intercepto da curva analítica

S: inclinação da curva analítica

A partir dos valores calculados pela equação, o LQ experimental foi determinado pela injeção ($n = 5$) de massas decrescentes das substâncias de referência (0,01 a 0,10 µg para rutina e 0,02 a 0,20 µg para o ácido clorogênico), utilizando soluções descritas a seguir.

Solução A (100 µg/mL de rutina e 200 µg/mL de ácido clorogênico)

Cerca de 1,0 mg de rutina e 2,0 mg de ácido clorogênico foram pesados com exatidão diretamente para balão volumétrico de 10 mL e solubilizados com MeOH grau CLAE. Completou-se o volume com o mesmo solvente.

Solução B (10 µg/mL de rutina e 20 µg mL de ácido clorogênico)

Transferiu-se 1,0 mL da solução A para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com MeOH grau CLAE.

Solução C (1,5 µg/mL de rutina e 3,0 µg/mL de ácido clorogênico).

Para obtenção da Solução C, transferiram-se 1,5 mL da Solução 2 para balão volumétrico de 10 mL O volume foi aferido com o MeOH grau CLAE.

Diferentes volumes das soluções B e C foram injetados automaticamente no sistema de CLAE (item 4.9.14.9.1), contemplando todo o intervalo de massas das substâncias de referência acima descrito. Na **Tabela 5** **Erro! Fonte de referência não encontrada.** estão relacionados os volumes injetados para cada massa avaliada.

O limite de quantificação foi determinado a partir da menor área dos picos das substâncias de referência que possibilitou a quantificação destes com precisão adequada (DPR < 3,0%) (SNYDER et al., 1997).

Tabela 5 - Correspondência entre os volumes e as massas injetadas no sistema de CLAE para determinação do limite de quantificação.

Volume Solução B (µL)	Volume Solução C (µL)	Massa injetada (µg)
ÁCIDO CLOROGÊNICO		
-	10	0,02
-	15	0,05
5	-	0,10
10	-	0,20
RUTINA		
-	10	0,01
-	15	0,02
5	-	0,05
10	-	0,10

Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.9.6.1.

4.9.6.7 Limite de detecção (LD)

O LD foi inicialmente estimado a partir dos parâmetros da curva analítica, utilizando-se a seguinte equação:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S}$$

onde:

LD: limite de detecção

s: desvio padrão do intercepto da curva de regressão

S: inclinação da curva analítica

O LD experimental foi então determinado pela injeção ($n = 5$) de massas decrescentes das substâncias de referência (0,05 a 0,005 μg para ambas).

O limite de detecção foi considerado como a menor massa injetada que resultou em relação sinal-ruído (S/N) de 3.

4.9.6.8 Estabilidade das substâncias de referência

A estabilidade dos analitos em solução hidrometanólica a 50% do extrato MFA (item 4.9.6.2) foi avaliada mantendo-se as soluções no carrossel do cromatógrafo à temperatura ambiente (23 ± 2 °C), e procedendo-se sua análise sequencial nos intervalos de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 horas.

As concentrações de ácido clorogênico, FlavHS e rutina foram calculadas em cada intervalo de tempo avaliado e submetidas à análise de variância, sendo as médias dos dados comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.9.6.9 Precisão

Avaliou-se a precisão intradia e interdia, empregando-se o extrato MFA. Para a precisão intradia, foram obtidas seis determinações na concentração do ponto médio da curva analítica ($n = 6$). Soluções hidrometanólicas a 50% foram preparadas segundo descrito no item 4.9.6.2. A precisão interdia foi determinada em dois dias consecutivos, com analistas diferentes ($n = 12$).

A concentração dos analitos no extrato foi determinada, o DPR calculado, e as médias dos teores entre os dois dias de determinações comparadas pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

4.9.6.10 Exatidão

A recuperação dos analitos nos extratos foi avaliada pela fortificação do extrato MFA com massas conhecidas das substâncias de referência, em três níveis de concentração da curva analítica: alta, média e baixa. Cada nível foi avaliado em triplicata. Duas soluções foram preparadas para a realização do teste.

Solução A (1,5 mg/mL de ácido clorogênico e rutina)

Pesaram-se, exatamente, cerca de 1,5 mg de ambas as substâncias de referência diretamente para balão volumétrico de 1 mL. Adicionou-se solução hidrometanólica a 50% e a solubilização das substâncias de referência foi realizada em banho de ultrassom, por 15 min. O volume final foi aferido com o mesmo solvente.

Solução B (150 µg/mL de ácido clorogênico e rutina)

Transferiram-se 100 µL da solução A para balão volumétrico de 1 mL. O volume foi aferido com solução hidrometanólica a 50%.

Diferentes volumes de ambas as soluções foram adicionados à cerca de 5,0 mg do extrato MFA, pesados em balança de precisão analítica. Na **Tabela 6** estão descritos os volumes de ambas as soluções adicionados ao extrato, em cada nível de concentração. Após a adição das soluções ao extrato, o volume final foi aferido para

1,0 mL, em cada nível, empregando-se o mesmo solvente e com auxílio de micropipetador automático. O preparo das amostras seguiu o protocolo descrito no item 4.9.6.2.

O extrato MFA não fortificado também foi avaliado ($n = 3$), para a determinação da massa recuperada.

Após o preparo das soluções, foram injetadas automaticamente alíquotas de 15 μL do sobrenadante no sistema de CLAE, empregando-se as condições de análise descritas no item 4.9.6.1.

Tabela 6 - Volumes e massas das substâncias de referência adicionadas ao extrato MFA no ensaio de exatidão (recuperação) de ácido clorogênico e rutina em *H. speciosa*.

Nível	Volume da solução A adicionado ao extrato MFA (μL)	Volume da solução B adicionado ao extrato MFA (μL)	Massa de ácido clorogênico adicionada ao extrato MFA (μg)	Massa de rutina adicionado ao extrato MFA (μg)
1	-	100	15	15
2	50	-	75	75
3	100	-	150	150

Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.9.6.14.9.6.1. Composição das soluções A e B: vide texto.

4.9.6.11 Robustez

Seis porções de cerca de 5,0 mg do extrato MFA foram pesadas com exatidão e analisadas empregando-se a condição analítica estabelecida (item 4.9.6.1), bem como com alterações deliberadas nas condições de análise dos seguintes parâmetros: temperatura da coluna (38 e 42 $^{\circ}\text{C}$); lote de coluna, concentração de ácido fosfórico na fase móvel (0,09 e 0,11 %) e fluxo (0,35 e 0,45 mL/min). As modificações inseridas foram avaliadas individualmente. Os teores dos analitos foram determinados para cada condição e os dados submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ou por meio do teste t de Student ($p < 0,05$).

Os teores, a resolução (R_s) e o fator de cauda (T) dos picos dos analitos foram determinados e os dados submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A pureza espectral dos picos de interesse foi avaliada a partir da sobreposição dos espectros no UV obtidos pelo DAD nas regiões ascendente, apical e descendente de cada pico.

4.9.7 Quantificação de ácido clorogênico, FlavHS e rutina em extratos e frações de *H. speciosa*

Para a quantificação dos analitos em extratos e frações da espécie, as amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.9.6.2, sendo as análises realizadas com o método de CLAE-FR desenvolvido e validado neste trabalho (item 4.9.4.9). Os teores foram calculados utilizando-se o fator de resposta (SNYDER et al., 1997).

Os teores obtidos ($n = 3$) foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.10 Desenvolvimento de método analítico para quantificação do bornesitol em extratos e frações de *H. speciosa*

4.10.1 Obtenção da substância de referência bornesitol

Inicialmente foi necessário obter bornesitol com pureza analítica adequada para sua utilização como substância de referência. Para tanto foi empregada recristalização à quente, utilizando-se MeOH, uma vez que o ciclitol é pouco solúvel neste solvente. Porções de 50 mg de frações enriquecidas em bornesitol provenientes do trabalho de Endringer (2007) foram purificadas. Tais frações foram obtidas pelo fracionamento do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* em coluna aberta de sílica gel, seguindo a série eluotrópica *n*-hexano, diclorometano, EtOAc e MeOH. As frações resultantes da eluição com EtOAc:MeOH (1:1) (HFAEM) foram recromatografadas em coluna aberta de sílica gel, empregando-se a mesma série eluotrópica descrita. As frações enriquecidas em bornesitol foram obtidas,

novamente, pela eluição com EtOAc:MeOH (1:1). O material obtido foi, então, purificado por recristalizações sucessivas.

A pureza do bornesitol obtido foi avaliada pelo ponto de fusão e pela obtenção de espectros por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H . Tal abordagem foi utilizada devido à inexistência de composto de referência comercialmente disponível, bem como de ensaios para a determinação da pureza do ciclitol.

4.10.2 Análises por CLAE com detector de índice de refração (IR)

4.10.2.1 Sistema cromatográfico

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado foi o Shimadzu CR4A com detector de índice de refração RID-AS. As análises foram realizadas na coluna e pré-coluna Agilent Prep-C18 Scalar (partículas de 10 μm ; 4,6 \times 250 mm) e coluna Shim-pack CLC-NH2 (M) 25 cm.

4.10.2.2 Condições analíticas avaliadas

Algumas condições analíticas foram avaliadas, variando-se a fase móvel, tipo de coluna e realizando-se a análise em sala refrigerada ou não. O extrato etanólico, bem como a substância de referência (bornesitol) e a fração enriquecida em flavonoides e ciclitóis (BRAGA et al., 2009) foram analisados nessas condições. A **Tabela 7** sumariza as condições empregadas.

Tabela 7 - Condições analíticas avaliadas por CLAE-IR para a análise de bornesitol em matrizes de *H. speciosa*.

Condições analíticas*	Fase móvel	Fluxo (mL/min)	Temperatura (°C)	Coluna
a	água mili-Q	1	ambiente ^a	C18 ^c
b	água:MeOH (95:5)	1	ambiente ^a	C18 ^c
c	água:ACN (97,5:2,5)	1	ambiente ^a	C18 ^c
d	água:MeOH (40:60)	1	sala refrigerada ^b	NH ₂ ^d
e	água:MeOH (20:80)	1	sala refrigerada ^b	NH ₂ ^d
f	MeOH	1	sala refrigerada ^b	NH ₂ ^d
g	água:ACN (5:95)	1	sala refrigerada ^b	NH ₂ ^d

* volume de injeção 20 µL

^a 25 ± 5°C

^b 25 ± 2°C

^c coluna e pré-coluna Agilent Prep-C18 Scalar (partículas de 10 µm; 4,6 × 250 mm).

^d coluna Shim-pack CLC-NH₂ (M) 25 cm.

4.10.2.3 Ensaio de seletividade

O ensaio de seletividade foi realizado a partir da recuperação do eluato correspondente ao pico do bornesitol (pico principal do cromatograma e com tempo de retenção de 4,161 minutos), empregando a condição analítica f descrita acima. Injeções sucessivas foram feitas (5 injeções, volume injetado de 20 µl, concentração 5 mg/ml da fração enriquecida em flavonoides e ciclitóis) e recuperada quantidade suficiente de eluato para avaliação. O eluato, após evaporação do solvente, foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se sílica 60G como fase estacionária e eluente acetona:água (5:4). A placa cromatográfica foi borrifada com água antes da aplicação das amostras e revelada com solução de ácido fosfomolibdico a 20% m/v em etanol, seguida de solução de ácido sulfúrico a 50% v/v em etanol e aquecimento por aproximadamente 5 minutos. O método é considerado seletivo se apresentar apenas uma banda na CCD após revelação adequada.

4.10.3 Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de bornesitol em *H. speciosa* por CLAE-DAD

4.10.3.1 Identificação do produto de tosilação do bornesitol (PTB)

Para identificação do produto pertosilado do bornesitol (PTB) no extrato etanólico de folhas da espécie, realizou-se a reação de tosilação com a substância de referência do bornesitol, obtida como descrito no item 4.10.1. Uma porção da substância de referência (cerca de 10 mg) foi pesada para balão de fundo redondo de 25 mL. Adicionaram-se cerca de 62,5 mg de cloreto de *p*-toluenossulfonila e 200 μ L de piridina anidra. O sistema foi mantido sob agitação em banho de gelo por 24h e por 1h à temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), também sob agitação. A reação foi elaborada, adicionando-se gelo picado ao meio e posteriormente acidificando-o até pH 1 com solução aquosa de ácido clorídrico (água:HCl 3:1). O precipitado formado foi filtrado sob vácuo e lavado com água gelada. Procedeu-se também a reação com o extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* (CFOF; para modo de obtenção do extrato, ver item 4.5). Cerca de 50 mg do extrato foram pesados para balão de fundo redondo de 25 mL. Adicionaram-se 750 μ L de piridina anidra e 358 mg de cloreto de *p*-toluenossulfonila. O sistema foi mantido em banho de gelo por 24h e, posteriormente, à temperatura ambiente por 1h. A elaboração da reação foi realizada como descrito acima.

Os produtos obtidos para ambas as reações foram analisados por CLAE-DAD, empregando-se gradiente linear de água (A) e MeOH (B), iniciando-se com 10% de B e elevando-se para 70% de B em 25 min, mantendo-se eluição isocrática até 40 min. A temperatura de análise foi de 40°C e fluxo de 1,0 mL/min. Soluções nas concentrações 1,0 mg/mL e 5,0 mg/mL dos produtos da reação de tosilação do bornesitol e do extrato CFOF, respectivamente, foram empregadas na análise, injetando-se um volume de 10 μ L.

4.10.3.2 Sistema cromatográfico

O desenvolvimento e validação do método foram realizados em sistema de CLAE Waters 2695. As análises foram realizadas em coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 × 4 mm d.i., partículas de 5 µm; e 125 × 4 mm d.i., 5 µm), em combinação com pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 × 4 mm i.d., 5 µm).

4.10.3.3 Desenvolvimento do método analítico

4.10.3.3.1 Desenvolvimento da condição cromatográfica

A condição analítica definida para o método de quantificação de bornesitol foi otimizada avaliando-se a influência de parâmetros como modificador orgânico, temperatura, fluxo, tipo de gradiente, modo de eluição (gradiente e/ou isocrático) e inclinação do gradiente na resolução dos picos correspondentes ao bornesitol pertosilado (PTB) e o pentaeritritol pertosilado (PPI), este último empregado como padrão interno. As condições avaliadas estão descritas na **Tabela 8**. Os picos de interesse foram identificados em todas as condições pela co-injeção com substâncias de referência.

A eficiência da condição cromatográfica estabelecida foi verificada pela seletividade do método e por testes de adequabilidade do sistema (*system suitability test*). A seletividade do método foi avaliada a partir da determinação da pureza espectral dos picos, sendo considerado seletivo quando espectros extraídos nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos apresentaram sobreposição exata. Além disso, para a condição analítica estabelecida, foram realizadas análises de soluções reacionais obtidas pela reação de a) apenas o P.I.; b) apenas o extrato e c) apenas os reagentes (cloreto de *p*-toluenosulfonila e piridina) empregando-se o método desenvolvido e descrito no item 4.10.4.1. O método foi considerado seletivo quando nenhum pico interferente foi observado nos tempos de retenção dos picos de interesse (PPI e PTB). Também foi realizada análise do extrato etanólico (MFA) nas mesmas condições, sem derivatização prévia.

Tabela 8 - Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método por CLAE-DAD para quantificação de bornesitol em extratos e frações de folhas de *H. speciosa*.

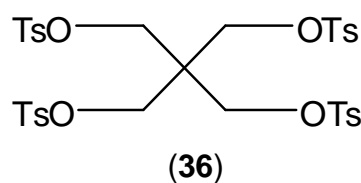
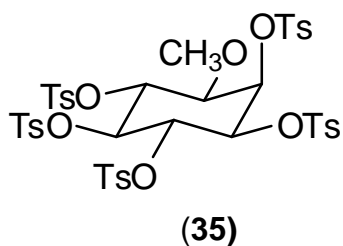
Tempo (min)	Eluente* (%)			Temp. (°C)	Tempo (min)	Eluente* (%)			Temp. (°C)
	A	B	C			A	B	C	
Condição analítica A**					Condição analítica B**				
0	60	40	-	25	0	60	40	-	25
10	40	60	-		5	40	60	-	
13	40	60	-		10	40	60	-	
20	35	65	-		18	35	65	-	
22	25	75	-		25	20	80	-	
32	25	75	-		27	5	95	-	
33	5	95	-		35	5	95	-	
40	5	95	-		-	-	-	-	
Condição analítica C**					Condição analítica D**				
0	70	-	30	25	0	70	20	10	25
10	50	-	50		10	45	45	10	
13	50	-	50		13	45	45	10	
20	45	-	55		20	35	55	10	
22	35	-	55		22	35	55	10	
32	30	-	70		32	30	20	50	
33	5	-	95		33	5	20	75	
55	5	-	95		55	5	20	75	
Condição analítica E**					Condição analítica F** e G**				
0	70	20	10	40	0	70	15	15	40
10	45	45	10		10	45	40	15	
13	45	45	10		13	45	40	15	
20	35	55	10		20	35	50	15	
22	30	20	50		27	30	20	50	
32	25	20	55		32	25	20	55	
33	10	20	70		33	10	20	70	
55	10	20	70		55	10	20	70	
Condição analítica H***					Condição analítica I***				
0	70	15	15	40	0	70	15	15	40
10	45	40	15		10	45	40	15	
13	45	40	15		13	45	40	15	
25	35	50	15		25	35	50	15	
27	30	20	50		27	30	20	50	
32	25	20	55		32	25	20	55	
33	10	20	70		33	15	20	65	
55	10	20	70		55	15	20	65	
Condição analítica J***					Condição analítica K***				
0	70	15	15	40	0	70	15	15	40
10	45	40	15		10	45	40	15	
13	45	40	15		13	45	40	15	
25	35	50	15		25	35	50	15	
27	30	20	50		28	30	20	50	
32	25	20	55		32	30	15	55	
33	19	18	63		55	30	15	55	
55	19	18	63		57	5	5	90	
57	5	5	90		67	5	5	90	
Condição analítica L***					Condição analítica M*** (condição analítica estabelecida)				
0	70	15	15	40	0	70	15	15	40
10	45	40	15		10	45	40	15	
13	45	40	15		13	45	40	15	
25	35	50	15		25	43	42	15	
29	33	20	47		32	43	42	15	
33	30	20	50		34	30	20	50	
55	30	20	50		55	30	20	50	
57	5	5	90		57	5	5	90	
67	5	5	90		67	5	5	90	

*Eluentes: **A**, água; **B**, metanol; **C**, acetonitrila. **: coluna LiChrospher 100 RP-18 (125 × 4 mm i.d., 5 µm) e *** coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 × 4 mm i.d., 5 µm), ambas em combinação com pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 × 4 mm i.d., 5 µm). **Nota:** a eluição foi realizada com fluxo de 1,0 mL/min em todas as condições avaliadas e a detecção realizada a 230 nm.

Os testes de adequabilidade do sistema também foram realizados, conforme descrito no item 4.9.4. O tempo morto (t_0) da corrida cromatográfica foi determinado pela injeção, nas mesmas condições de análise, de 20 μ L de solução de nitrato de sódio 0,01% (m/v) em piridina e ACN nas mesmas proporções observadas nas soluções reacionais (item 4.10.4.2).

4.10.3.3.2 Otimização das condições de reação

Diversas condições reacionais de derivatização foram avaliadas a partir da modificação dos seguintes parâmetros: temperatura, tempo de reação, volume de piridina, quantidade de cloreto de *p*-toluenossulfonila e volume de acetonitrila para extração final dos produtos tosilados do bornesitol (PTB) (**35**) e do padrão interno (P.I.) (PPI) (**36**).



As reações foram realizadas em tubos plásticos do tipo *safe-lock*, empregando-se exatamente cerca de 3,0 mg do extrato MFA, variando-se os parâmetros citados acima (**Tabela 9**). Cada condição foi avaliada em triplicata, totalizando 13 diferentes condições reacionais. Alíquotas de 20 μ L das soluções reacionais obtidas foram injetadas no sistema de CLAE descrito no item 4.10.3.2, empregando-se o método de análise estabelecido (item 4.10.4.1).

O teor de bornesitol foi calculado para cada condição a partir da relação de áreas PTB/PPI obtida e considerando-se a relação de áreas determinada para uma amostra controle (item 4.10.4.2.2). Os resultados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$) e as médias dos teores de cada condição foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 9 - Condições reacionais avaliadas para o desenvolvimento de método analítico para quantificação de bornesitol em extratos e frações de folhas de *H. speciosa* após derivatização com cloreto de *p*-toluenossulfonila.

Condições	Piridina (µL)	TsCl (mg)	ACN (mL)	Tempo de reação (h)	Temperatura (°C)
CR1	50	50	2	1	50
CR2	50	50	2	2	50
CR3	50	50	2	3	50
CR4	50	50	2	4	50
CR5	50	50	2	5	50
CR6	75	50	2	3	50
CR7	100	50	2	3	50
CR8	150	50	2	3	50
CR9	50	75	2	3	50
CR10	50	25	2	3	50
CR11	50	50	1	3	50
CR12	50	50	3	3	50
CR13	50	50	2	3	60

4.10.3.3.3 Preparo das soluções reacionais de extratos e frações de *H. speciosa*

O preparo das amostras na etapa de desenvolvimento do método analítico foi realizado a partir da definição da condição reacional otimizada (CR 3), descrita em detalhes no item 4.10.4.2.

4.10.4 Validação do método analítico para quantificação de bornesitol em extratos e frações de *H. speciosa*

A validação do método cromatográfico desenvolvido (item 4.10.3) foi conduzida considerando-se critérios do guia ICH , ANVISA e da AOAC (AOAC, 2002; Brasil, 2003; ICH, 1996).

A aquisição e o processamento dos dados foi realizado pelo programa Empower 2 (Waters). As análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism, versão 5 (GraphPad Software, 2007).

4.10.4.1 Condição cromatográfica estabelecida

A condição cromatográfica analítica estabelecida para o método consistiu de coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 × 4 mm d.i., partículas de 5 µm) e pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 x 4 mm d.i., partículas de 5 µm); temperatura da coluna de 40 °C; fluxo de 1,0 mL/min. A fase móvel compreendeu eluição em gradiente de água Milli-Q (solução A), MeOH grau CLAE (solução B) e ACN grau CLAE (solução C), conforme descrito na **Tabela 10**. O comprimento de onda de detecção utilizado foi 230 nm e o volume de injeção de 20 µL.

Tabela 10 - Sistema de eluição estabelecido para o método por CLAE-DAD para quantificação de bornesitol em extratos e frações de folhas de *H. speciosa*.

Tempo (min)	%A	%B	%C	Modo de eluição
0	70	15	15	gradiente linear
10	45	40	15	isocrático
13	45	40	15	gradiente linear
25	43	42	15	isocrático
32	43	42	15	gradiente linear
34	30	20	50	isocrático
55	30	20	50	gradiente linear
57	5	5	90	isocrático
67	5	5	90	gradiente linear
70	70	15	15	-

4.10.4.2 Preparo das amostras e soluções reacionais

4.10.4.2.1 Solução reacional de extratos etanólicos de *H. speciosa*

Solução padrão de P.I. (Sol. P.I.)

Cerca de 10,0 mg de pentaeritritol foram exatamente pesados em balão volumétrico de 5 mL e solubilizados em piridina anidra, com auxílio de ultrassom. O volume foi aferido com o mesmo solvente e a solução foi armazenada à temperatura ambiente, vedada com papel parafilme e envolta em papel alumínio.

Obtenção da solução reacional

Para as análises, cerca de 3,0 mg do extrato etanólico MFA de folhas de *H. speciosa* foram pesados diretamente para tubos plásticos do tipo *safe-lock* de 2 mL, em balança de precisão analítica. Posteriormente, cerca de 50 mg de cloreto de tosila foram adicionados ao tubo, seguido de 50,0 µL de sol. P.I., com auxílio de micropipeta volumétrica de capacidade 10 – 100 µL. Os tubos foram, então, vedados com parafilme e transferidos para bloco agitador a 800 rpm, à 50 °C por 3 h. Ao término da reação, foram adicionados ao meio reacional ACN grau CLAE suficiente para perfazer um volume final de 2,0 mL, com o auxílio de micropipeta de capacidade 100 – 1000 µL. A suspensão foi sonicada por 15 min, agitada em vortex e posteriormente centrifugada a 8.400 g por 10 min. Alíquotas de 20 µL dos sobrenadantes foram injetadas automaticamente no sistema de CLAE descrito empregando-se as condições de análise estabelecidas (item 4.10.4.1).

As soluções reacionais assim obtidas foram utilizadas para o processo de validação do método. O mesmo procedimento foi adotado no preparo das amostras de *H. speciosa* para quantificação.

4.10.4.2.2 Soluções de referência de bornesitol e P.I.

A solução de referência utilizada para determinar a relação de áreas entre PTB e PPI a cada dia de análise para quantificação das amostras foi preparada pesando-se exatamente cerca de 6,0 mg de bornesitol substância de referência e 2,0 mg de P.I. para balão volumétrico de 1 mL. As substâncias foram solubilizadas em piridina anidra com auxílio de sonicação e o volume aferido com o mesmo solvente. A solução obtida foi mantida à temperatura ambiente, vedada com parafilme e envolta em papel alumínio. Alíquotas de 30 µL dessa solução, adicionada a 20 µL da solução de P.I. em piridina (2,0 mg/mL, descrita no item anterior) foram submetidas à

reação de derivatização (item 4.10.4.2.1) em cada dia de análise e 20 µL da solução reacional final obtida foram injetados no sistema de CLAE.

4.10.4.3 Seletividade.

A seletividade do método foi avaliada pela homogeneidade espectral dos picos, de maneira semelhante à descrita anteriormente no item 4.9.6.3, bem como pela obtenção de diferentes soluções reacionais, descritas anteriormente no item 4.10.3.3.1. Para as determinações foi empregado o extrato MFA de *H. speciosa* ($n = 6$).

4.10.4.4 Teste de adequabilidade do sistema

Os testes de adequabilidade do sistema foram realizados, conforme descrito no item 4.9.6.4. O tempo morto (t_0) da corrida cromatográfica foi determinado pela injeção, nas mesmas condições de análise, de 20 µL de solução de nitrato de sódio 0,01% (p/v) em piridina e ACN nas mesmas proporções observadas nas soluções reacionais (item 4.10.4.2).

4.10.4.5 Linearidade

A linearidade foi determinada a partir de curvas analíticas, construídas utilizando-se cinco concentrações distintas. Cada ponto das curvas analíticas foi obtido pela injeção, em triplicata, de 20 µL de cinco soluções reacionais (item 4.10.4.2) efetuadas em cinco diferentes concentrações de bornesitol no meio reacional, como indicado na **Tabela 11**. As curvas analíticas foram determinadas empregando-se a relação de áreas PTB/PPI *versus* a massa injetada de PTB, em dois dias consecutivos.

Os dados obtidos foram avaliados através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação (r^2) correspondentes foram calculados. A análise estatística das curvas obtidas em dias diferentes foi realizada por análise de variância ($p < 0,05$).

Tabela 11 - Volumes das soluções padrão e massas de bornesitol e P.I correspondentes utilizadas para construção da curva analítica.

Níveis de concentração	Volume (μL)	Massa de bornesitol (μg)	Volume (μL)
	Solução de bornesitol e P.I.		Solução de P.I.
1	10,0	60,0	40,0
2	20,0	120,0	30,0
3	30,0	180,0	20,0
4	40,0	240,0	10,0
5	50,0	300,0	-

Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.10.4.1.

4.10.4.5.1 Estimativas de faixas de concentração de trabalho

A faixa de concentração de trabalho para o bornesitol foi estabelecida com base nos teores deste constituinte determinados em alguns extratos selecionados aleatoriamente, empregando-se as condições cromatográficas desenvolvidas. É importante ressaltar que a solubilidade da substância de referência em piridina teve que ser levada em conta na determinação da faixa de concentração de trabalho.

4.10.4.5.2 Preparo da solução estoque de bornesitol e P.I. em piridina

Foi preparada apenas uma réplica da solução bornesitol e P.I., devido à reduzida disponibilidade da substância de referência.

Solução estoque padrão de bornesitol

Exatamente cerca de 6,0 mg de bornesitol e 2,0 mg de P.I. foram pesados para balão volumétrico de 1 mL. As substâncias foram solubilizadas em piridina anidra, com auxílio de ultrassom. O volume foi aferido com o mesmo solvente e a solução foi armazenada à temperatura ambiente, vedada com papel parafilme e envolta em papel alumínio.

Solução estoque padrão de P.I.

Uma segunda solução contendo apenas P.I. (exatamente cerca de 2,0 mg/mL) foi preparada conforme descrito para a solução de referência anterior. Esta solução foi empregada para completar o volume de 50 µL da solução reacional e manter a mesma concentração em todos os pontos da curva.

4.10.4.6 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi inicialmente estimado pelo emprego da equação que considera os parâmetros da curva analítica, de maneira semelhante à descrita no item 4.9.6.6.

A partir do LQ calculado, determinou-se o LQ experimental pela injeção de soluções reacionais ($n = 5$) obtidas pela reação de massas decrescentes do analito (40 a 10 µg). Para tanto, uma solução padrão de bornesitol em piridina foi preparada, contendo exatamente cerca de 1,0 mg/mL de bornesitol (solução estoque). Transferiram-se 500 µL desta solução para balão volumétrico de 1 mL, contendo exatamente cerca de 2,0 mg de P.I.. Completou-se o volume com piridina anidra (Solução 1). Outra solução contendo apenas P.I. na mesma concentração (2,0 mg/mL) foi preparada (Solução 2) e utilizada para correção do volume (50 µL) e concentração final do P.I. (50 µg/mL). As soluções reacionais foram obtidas conforme descrito no item 4.10.4.2. Para todas as concentrações avaliadas, foram injetados 20 µL da solução reacional final no sistema de CLAE descrito no item 4.10.3.2. Na **Tabela 12** estão descritos os volumes das soluções 1 e 2 utilizados para cada concentração avaliada.

Tabela 12 - Volumes das soluções 1 e 2 e massas correspondentes de bornesitol e P.I. empregados para a determinação do limite de quantificação do método.

Concentração de bornesitol (µg/ 2,0 mL) na solução reacional	Volume (µL) da solução 1 (500 µg/mL de bornesitol)	Volume (µL) da solução 2 (2,0 mg/mL de P.I.)	Massa injetada de bornesitol (µg)	Massa injetada de P.I. (µg)
5	10,0	40,0	0,05	1
10	20,0	30,0	0,10	1
15	30,0	20,0	0,15	1
20	40,0	10,0	0,20	1

Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.10.4.1.

O limite de quantificação foi determinado a partir da menor relação de áreas dos picos PTB/PPI que possibilitou a quantificação de bornesitol na amostra com precisão adequada (DPR < 3,0%) (SNYDER et al., 1997).

4.10.4.7 Limite de detecção (LD)

O LD foi inicialmente calculado a partir dos parâmetros da curva analítica, conforme descrito no item 4.9.6.7.

O LD experimental foi determinado pela injeção, em quintuplicata, de soluções reacionais obtidas pela reação de massas decrescentes de bornesitol (10 a 0,05 µg), a partir de diluições sucessivas de uma solução padrão. O limite de detecção foi definido como sendo a menor relação de áreas entre os picos PTB e PPI que resultou em altura do pico do analito com relação sinal-ruído (S/N) de 3.

4.10.4.8 Estabilidade dos produtos de tosilação PTB e PPI

A estabilidade dos produtos de tosilação PTB e PPI nas soluções reacionais obtidas (item 4.10.4.2.1) foi avaliada mantendo-se as soluções no amostrador automático do sistema de CLAE, à temperatura ambiente (23 ± 2 °C), sendo estas analisadas sequencialmente nos intervalos de 0, 12, 24, 36 e 48 horas.

A concentração de bornesitol foi calculada para cada intervalo de tempo a partir da relação de áreas de PTB/PPI e considerando-se a relação de áreas obtida pela solução de referência (item 4.10.4.2.2). Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.10.4.9 Precisão

Avaliou-se a precisão intradia e interdia. Para a precisão intradia, foram obtidas seis determinações no ponto médio de concentração de bornesitol na curva analítica ($n = 6$). Soluções reacionais foram preparadas segundo descrito no item 4.10.4.2.1. A

precisão interdia foi determinada em dois dias consecutivos, com analistas diferentes ($n = 12$).

A concentração de bornesitol no extrato foi determinada através da relação de áreas PTB/PPI e considerando-se a relação de áreas obtida pela solução de referência (item 4.10.4.2.2). Os valores de DPR foram calculados e as médias dos teores entre os dois dias de determinações foram comparadas pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

4.10.4.10 Exatidão

A recuperação de bornesitol nos extratos foi avaliada pela fortificação do extrato MFA com massas conhecidas de bornesitol, em três níveis de concentração da curva analítica: alta, média e baixa. Cada nível foi avaliado em triplicata. Duas soluções foram preparadas para a realização do teste, ambas em piridina.

Solução A (4,0 mg/mL de bornesitol e 2,0 mg/mL de P.I.)

Cerca de 4,0 mg de bornesitol e 2,0 mg do P.I. foram exatamente pesados para balão volumétrico de 1 mL e solubilizados em piridina anidra, com auxílio de ultrassom.

Solução B (2,0 mg/mL de P.I.)

Cerca de 2,0 mg de P.I. foram exatamente pesados para balão volumétrico de 1 mL e solubilizados em piridina anidra com auxílio de ultrassom.

Diferentes volumes de ambas as soluções foram adicionados à cerca de 1,0 mg do extrato MFA, anteriormente pesado em tubos plásticos, em balança de precisão analítica. Na **Tabela 13** estão descritos os volumes das soluções A e B adicionados ao extrato, utilizadas para o ensaio de recuperação, em cada nível de concentração.

As soluções reacionais foram obtidas como descrito no item 4.10.4.2.1. O extrato MFA não fortificado também foi avaliado ($n = 3$), para a determinação da massa recuperada. Volumes de 20 μ L das soluções reacionais obtidas foram injetados no sistema de CLAE descrito (item 4.10.3.2) e as análises foram realizadas empregando-se o método analítico desenvolvido (item 4.10.4.1).

Tabela 13 - Volumes das soluções A e B e massas correspondentes das substâncias de referência adicionadas ao extrato MFA para o ensaio de recuperação.

Nível	Volume da solução A (µL)	Volume da solução B (µL)	Massa de bornesitol (µg)	Massa de P.I. (µg)
1	10	40	40	100
2	30	20	120	100
3	50	-	200	100

Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.10.4.1.

4.10.4.11 Robustez

Foram preparadas seis soluções reacionais a partir da pesagem, com exatidão, de cerca de 3,0 mg do extrato MFA (item 4.10.4.2). Estas foram analisadas empregando a condição analítica estabelecida (item 4.10.4.1), bem como com alterações deliberadas dos seguintes parâmetros: temperatura de análise (38 e 42 °C); lote de coluna e fluxo (0,9 e 1,1 mL/min). As modificações inseridas foram avaliadas individualmente.

Foram determinadas as concentrações, a resolução (R_s) e o fator de cauda (T) dos picos correspondentes a PTB e PPI, bem como seus tempos de retenção, sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ou por meio do teste t de Student ($p < 0,05$). A pureza espectral dos picos de interesse foi avaliada a partir da sobreposição dos espectros no UV obtidos nas regiões ascendente, apical e descendente de cada pico.

4.10.5 Quantificação de bornesitol em extratos e frações de *H. speciosa*

Para a quantificação do analito em extratos e frações da espécie, as amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.10.4.2.1 e analisadas pelo método de CLAE-DAD desenvolvido e validado neste trabalho (itens 4.10.3 e 4.10.4). A concentração de bornesitol nos extratos foi determinada através da relação de áreas PTB/PPI e considerando-se a relação de áreas obtida pela solução de referência

(item 4.10.4.2.2). Os teores calculados ($n = 3$) foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.11 Avaliação química de diferentes acessos de *H. speciosa*

A procedência do material vegetal empregado na análise, bem como a forma de obtenção dos extratos vegetais estão descritos no item 4.5.

4.11.1 Análise da composição quantitativa dos extratos

Foi realizada a quantificação de flavonoides totais, bornesitol, ácido clorogênico, rutina e FlavHS nos oito extratos obtidos segundo o item 4.5.2, utilizando-se os métodos analíticos desenvolvidos e/ou validados neste trabalho e descritos nos itens 4.8, 4.9 e 4.10.3. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.11.2 Obtenção de perfis cromatográficos por CLAE-DAD para os extratos

Foram obtidos perfis cromatográficos por CLAE-DAD para os extratos dos diferentes acessos, sendo esses comparados com o perfil do extrato empregado no trabalho de Endringer (2007). Utilizou-se, nessa etapa, as condições cromatográficas descritas no item 4.9.6.1. Foram analisadas soluções metanólicas dos extratos supracitados e das substâncias de referência rutina e ácido clorogênico, nas concentrações de 10 mg/mL e 1 mg/mL, respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da composição química qualitativa de *H. speciosa*

Inicialmente foi realizada uma análise qualitativa da composição química de extratos de folhas de *H. speciosa* a fim de identificar constituintes da espécie a serem quantificados, os quais poderão constituir marcadores químicos da mesma.

As substâncias de referência empregadas na análise (rutina, quercetina, canferol e os ácidos quínico, clorogênico e cafeico) foram selecionadas a partir de resultados anteriores de nosso grupo de pesquisa e de dados da literatura relativos à composição química da espécie.

Rutina, ácido quínico e ácido clorogênico foram isolados por Endringer (2007), sendo os dois primeiros correlacionados com a potencial atividade anti-hipertensiva da espécie. Além disso, diversos estudos indicam a potencial atividade anti-hipertensiva de flavonoides, sendo relatados efeito inibitório da ECA, redução da pressão arterial em ratos hipertensos e efeito hipotensor observados em estudos clínicos em humanos (ACTIS-GORETTA et al., 2006; BARBOSA-FILHO, 2006; JOUAD et al., 2001; LOIZZO et al., 2007; PEREZ-VISCAINO et al., 2009). Ressalta-se que a potencial atividade anti-hipertensiva do ácido clorogênico, principal constituinte de um extrato de café verde solúvel em água, foi relatada em ensaio com ratos hipertensos (SUZUKI et al., 2002) e posteriormente em estudo clínico com indivíduos com hipertensão leve (KOZUMA et al., 2005). O estudo de Suzuki e colaboradores (2002) também possibilitou identificar os ácidos ferúlico e cafeico como metabólitos do ácido clorogênico, possivelmente relacionados com a redução da pressão arterial induzida pela administração de ácido clorogênico aos animais hipertensos (SUZUKI et al., 2002). Assim, decidiu-se avaliar a presença e de rutina, ácido quínico, ácido clorogênico e ácido cafeico no extrato etanólico de folhas de *H. speciosa*, bem como de quercetina, genina da rutina, principal flavonoide detectado no extrato e possivelmente presente nas amostras.

Considerando ainda relatos anteriores de isolamento de canferol-*O*-rutinosídeo da espécie (ENDRINGER, 2007), e a potencial atividade anti-hipertensiva de

flavonoides (ACTIS-GORETTA et al., 2006; BARBOSA-FILHO, 2006; JOUAD et al., 2001; LOIZZO et al., 2007; PEREZ-VISCAINO et al., 2009), a presença da genina correspondente (canferol) foi avaliada, em virtude da indisponibilidade comercial do glicosídeo.

Na **Figura 1** estão apresentados os perfis cromatográficos obtidos. É possível identificar claramente a presença de ácido clorogênico e rutina no extrato etanólico de folhas de *H. speciosa*, sendo estes constituintes correspondentes aos picos majoritários da matriz.

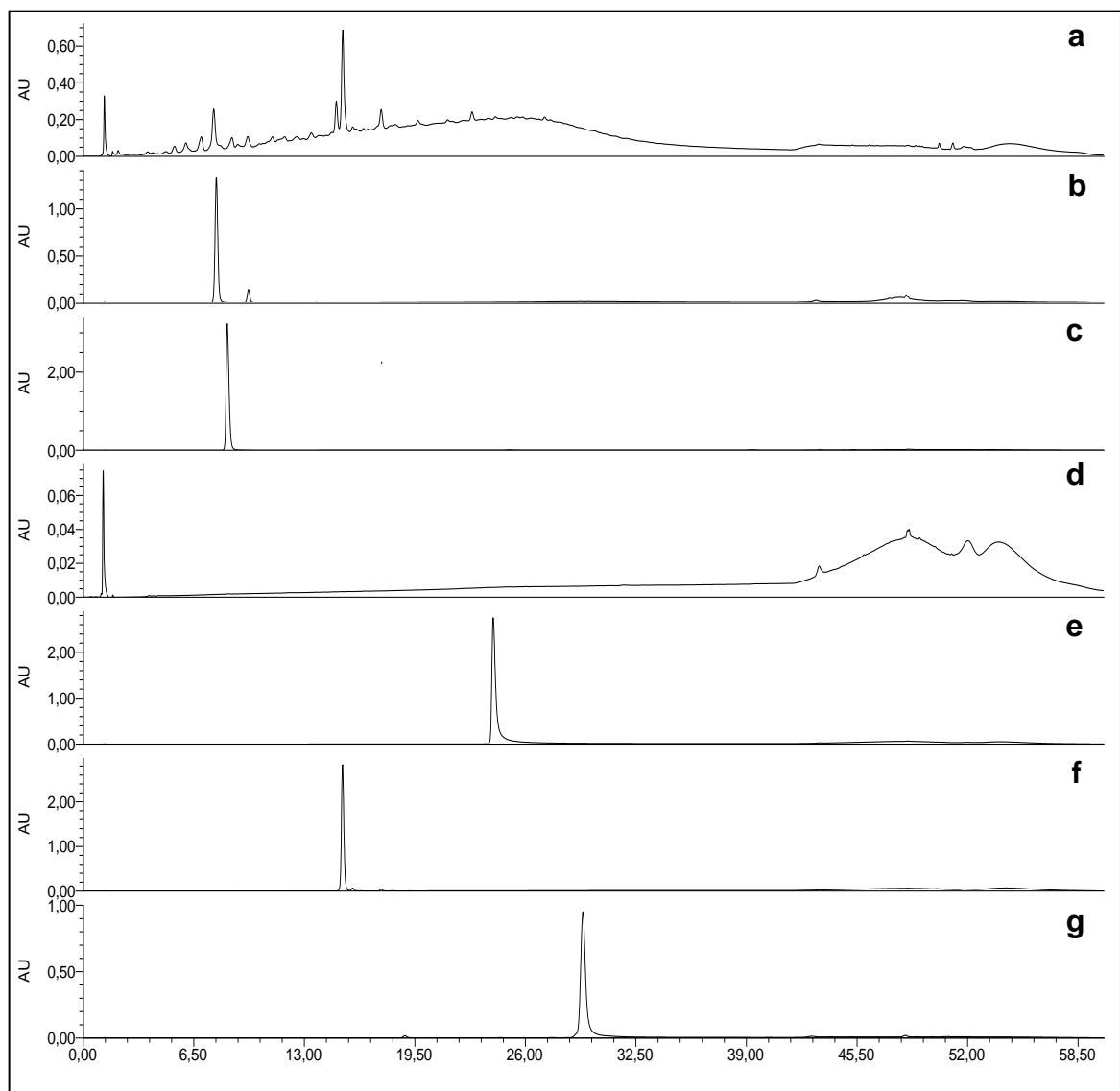


Figura 1 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para (a) extrato etanólico de folhas de *H. speciosa*; (b) ácido clorogênico; (c) ácido cafeico; (d) ácido quínico; (e) quercetina; (f) rutina e (g) canferol. As condições cromatográficas encontram-se descritas no item 4.7 e Tabela 1 da Parte Experimental. A detecção foi realizada no comprimento de onda de 210 nm.

A co-injeção de substância de referência e análise do espectro no UV registrado pelo detector DAD permitiu confirmar a presença de quercetina na espécie, correspondente a um pico de baixa intensidade.

O ácido clorogênico, identificado como um dos picos majoritários do extrato, corresponde ao produto de esterificação do ácido cafeico com a hidroxila em C-5 do ácido quínico. Dessa forma, poder-se-ia esperar a presença desses ácidos na forma livre no extrato, os quais não foram detectados nas análises realizadas. Observa-se um pico com tempo de retenção (TR) similar àquele obtido para o ácido quínico no extrato de *H. speciosa*; porém, a análise dos espectros de UV permitiu concluir não se tratar de ácido quínico (**Figura 2**). É importante salientar que ácido quínico foi isolado no trabalho de Endringer (2007) a partir do fracionamento do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa*. Porém, devido à presença de grandes quantidades de ácido clorogênico na espécie e, em função da labilidade da ligação éster, o ácido quínico isolado pode constituir um artefato, resultante da hidrólise do ácido clorogênico e de outros derivados durante o fracionamento do extrato em coluna de sílica gel.

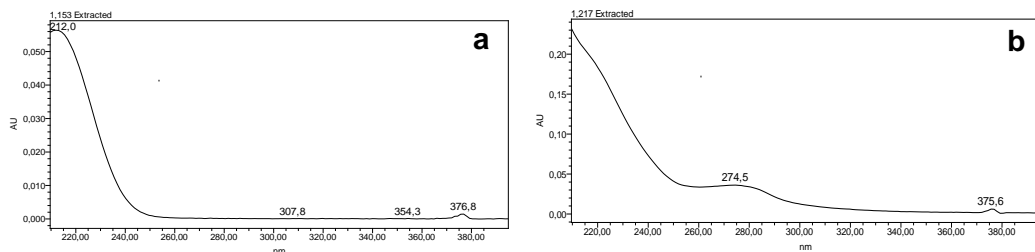


Figura 2 - Espectros no UV obtidos *on-line* pelo detector DAD para (a) ácido quínico (TR = 1,15 min) e (b) pico com TR = 1,22 min presente no extrato etanólico de *H. speciosa*.

Observam-se alguns picos no extrato etanólico da espécie com tempo de retenção próximo ao ácido cafeico. Porém, a análise dos espectros no UV descartou a presença deste constituinte na espécie (**Figura 3**).

Endringer (2007) relatou o isolamento do flavonoide canferol-3-O-rutinosídeo de folhas da espécie. A comparação dos perfis cromatográficos obtidos para o extrato etanólico de *H. speciosa* e para o canferol não possibilitou identificar a presença desta aglicona no extrato avaliado.

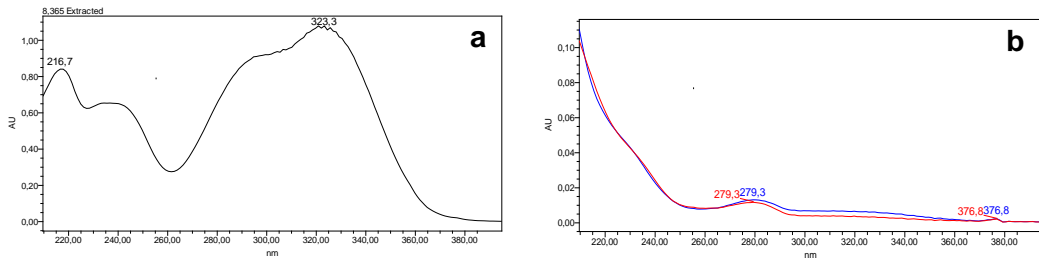


Figura 3 - Espectros no UV obtidos *on-line* pelo detector DAD para (a) ácido cafeico e (b) picos do extrato etanólico de *H. speciosa* com tempo de retenção de 8-9 min.

A análise do perfil cromatográfico do extrato (**Figura 1a**) revelou, ainda, a presença de um pico de intensidade média (TR = 14,9 min) próximo à rutina (TR = 15,3 min). A análise do espectro no UV desta substância indicou tratar-se de um flavonoide, denominado FlavHS, possivelmente com a mesma genina da rutina (quercetina), tendo em vista a semelhança nos máximos de absorção dos espectros de UV de ambos (**Figura 4**).

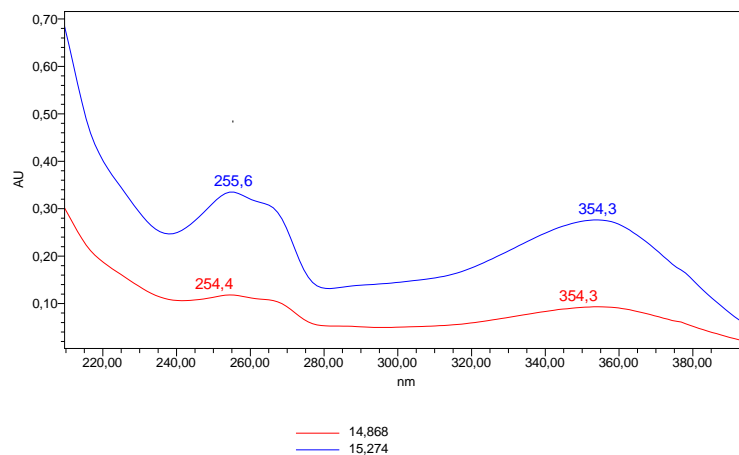


Figura 4 - Espectro no UV obtido *on-line* pelo detector DAD para substância com TR de 14,9 min (FlavHS) e rutina (TR 15,3 min).

Uma fração enriquecida em flavonoides oriunda do extrato bruto (item 4.7) foi obtida e analisada por CLAE-EM, conforme condições analíticas descritas no item 4.7. O espectro de baixa resolução obtido pela técnica de ionização por spray de elétrons (ESI+) evidenciou a presença de dois sinais $[M+H]^+$ principais em m/z 611,2 e 757,2 correspondentes ao pico de maior intensidade no cromatograma da fração enriquecida (TR = 7,4 min) (**Figura 5b**). O sinal em m/z 611,2 corresponde ao pico do íon molecular da rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$), flavonoide anteriormente isolado da espécie (Endringer, 2007) e também identificado neste trabalho. A análise do espectro de

massas obtido para a fragmentação do pico em m/z 757,2 (**Figura 5c**) indica que FlavHS é um triglicósídeo derivado da quercetina, constituído por dois resíduos de ramnose e uma hexose [quercetina (301) + hexose (162) + ramnose (146) + ramnose (146)].

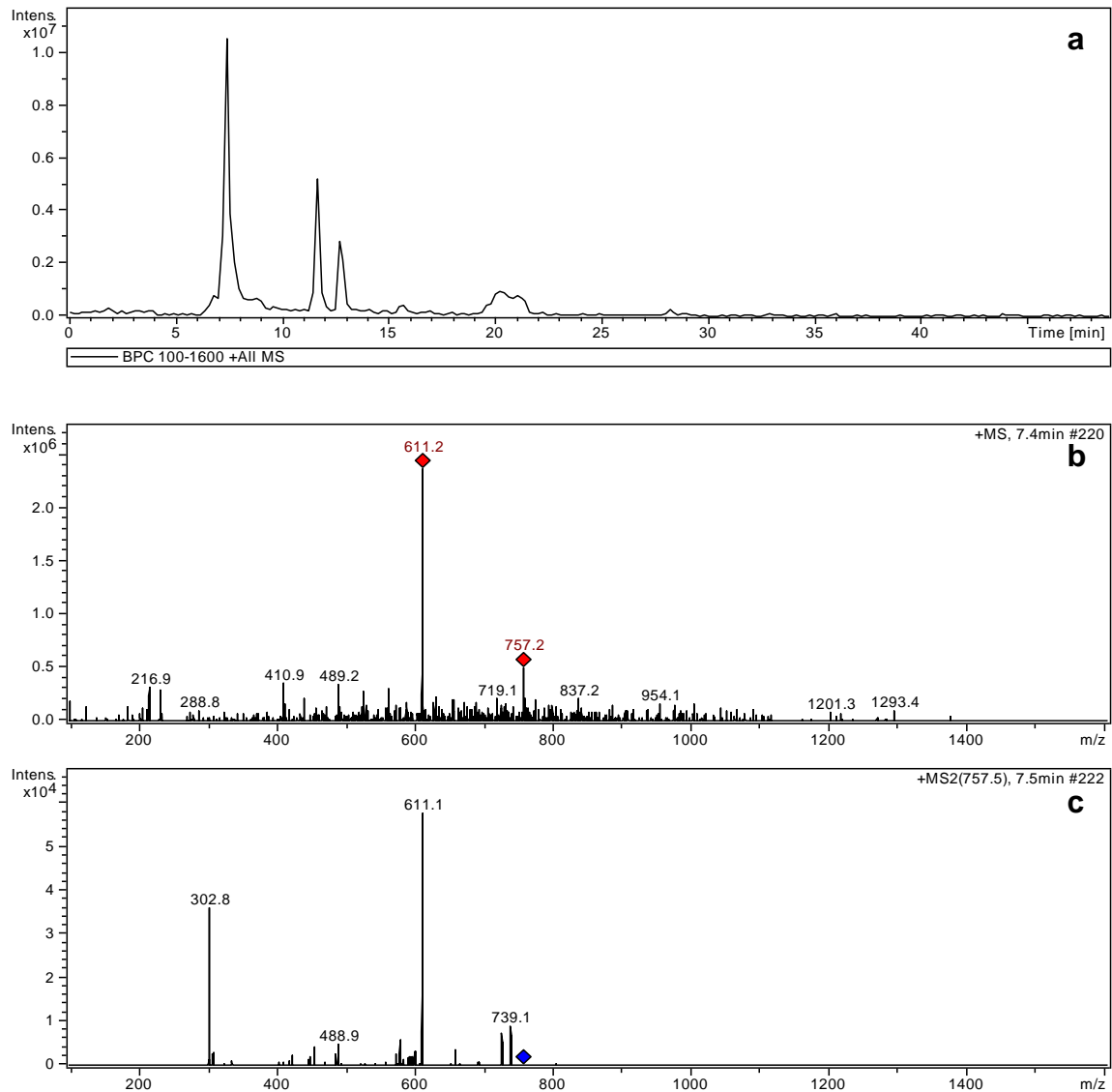


Figura 5 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE-EM da fração rica em flavonoides (a) e espectros de massas obtidos por ionização por spray de elétrons (ESI+) do pico com TR 7,4 (b) e MS2 do pico em m/z 757,2 (c).

A análise da fragmentação do íon molecular de FlavHS corrobora a presença de um triglicósídeo, pela observação dos picos em m/z 611,1 $[(M + H) - 146]^+$, correspondente à perda de um resíduo de ramnose (pico base); em m/z 302,8, associado à perda dos resíduos de carboidratos, resultando na genina (quercetina) e em m/z 739,1 $[(M + H) - 18]^+$, correspondente à perda de uma molécula de água

(Figura 6) (FERRERES et al., 2008). O espectro de UV de FlavHS apresenta um dos máximos de absorção em 353 nm, o que é compatível com ligação glicosídica na hidroxila em C-3 (FERRERES et al., 2005). Além disso, a correspondência dos máximos de absorção nos espectros de UV obtidos para rutina e FlavHS (Figura 4) sugere que o resíduo de trissacarídeo esteja ligado à genina em uma única hidroxila e na mesma posição de ligação dos resíduos na molécula da rutina (hidroxila em C-3). Os dados obtidos por CLAE-MS não possibilitaram definir a hexose constituinte de FlavHS, a sequência de ligação das unidades monossacarídicas e a estereoquímica das ligações. O isolamento de FlavHS encontra-se em andamento e dados de RMN de ^1H e de ^{13}C serão obtidos para definição inequívoca da estrutura do triglicosídeo.

A literatura registra alguns triglicosídeos da quercetina com estruturas químicas compatíveis com FlavHS. O triglicosídeo quercetina 3-O-(2"-ramnosil)-robinobiosídeo (37) foi identificado como constituinte do extrato metanólico de folhas de *Boerhaavia diffusa* L (FERRERES et al., 2005). Em outro trabalho, Ferreres e colaboradores (2008) identificaram dois triglicosídeos derivados da quercetina, quercetina-3-O-(2,6-di-O-ramnosil-galactosídeo) (38) e quercetina-3-O-(2,6-di-O-ramnosil-glicosídeo) (37) em extratos hidroalcoólicos de *Catharanthus roseus*. Triglicosídeos derivados da quercetina também foram identificados em extratos de folhas de *Ginkgo biloba* (MAURI et al., 1999).

Assim, com base nos resultados aqui apresentados e, considerando-se os relatos anteriores de atividade biológica para os compostos, decidiu-se quantificar rutina, ácido clorogênico, flavonoides totais e FlavHS nos extratos e frações de *H. speciosa*. É importante salientar que o bornesitol, dentre todos os compostos presentes na espécie, é o constituinte majoritário relacionado com sua potencial atividade anti-hipertensiva (ENDRINGER, 2007). Porém, a presença de bornesitol não foi verificada nesta análise, uma vez que este ciclitol não possui grupos cromofóricos em sua estrutura, o que inviabiliza sua análise com detectores na região do UV-Vis, sem prévia derivatização da amostra.

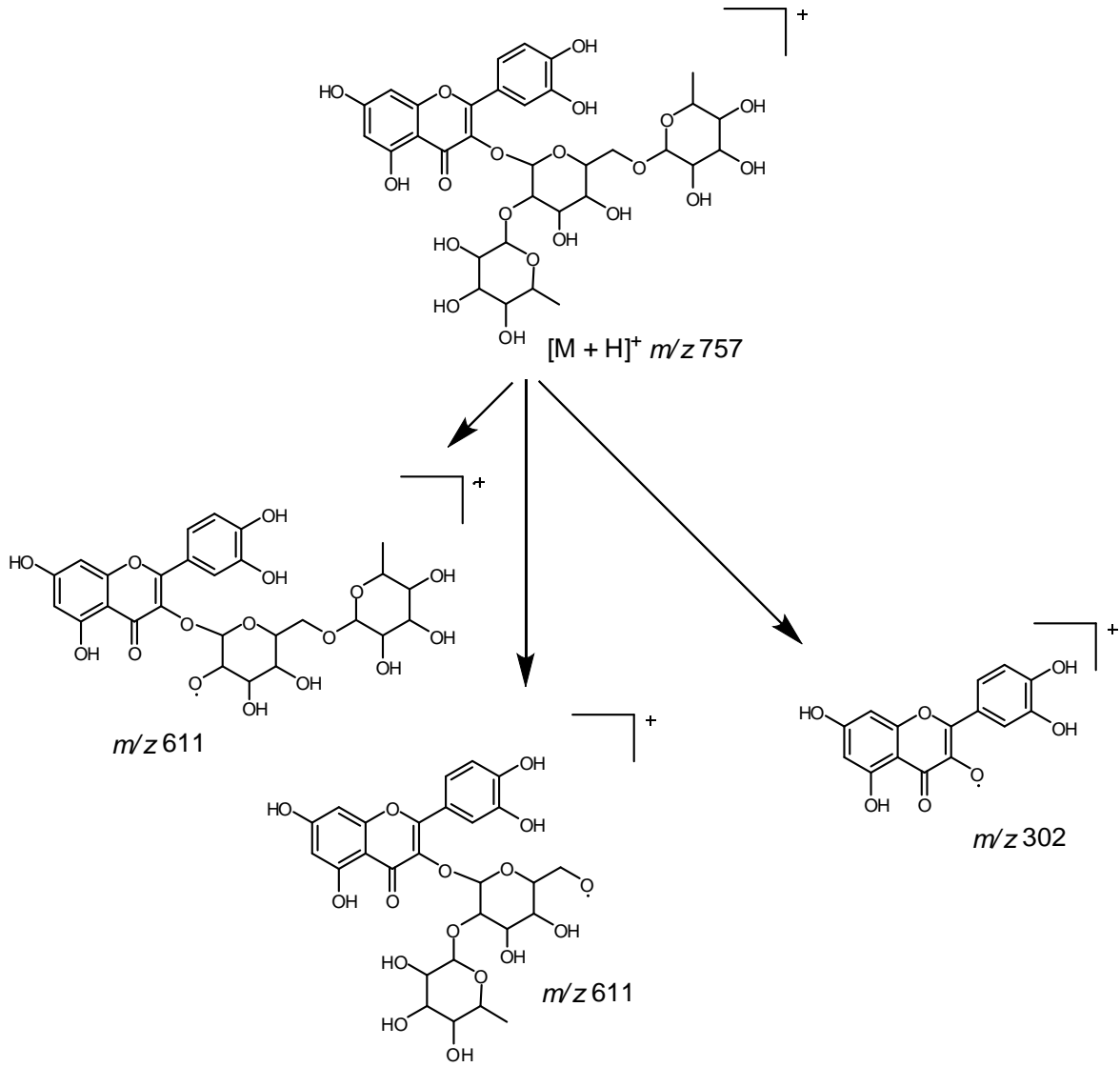
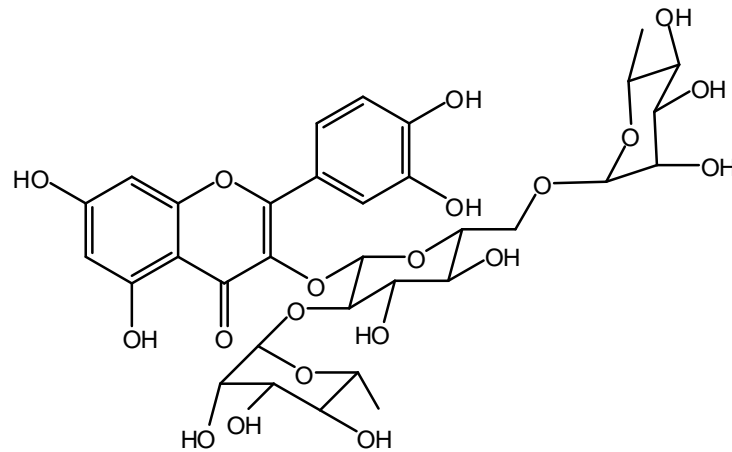
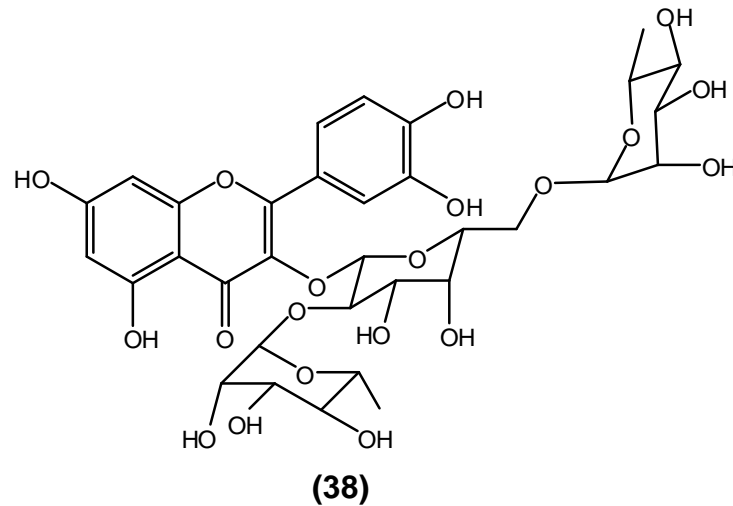


Figura 6 – Esquema de fragmentação proposto para FlavHS. Para condições de análise, vide texto





5.2 Validação de método analítico por espectrofotometria no UV-Vis para a quantificação de flavonoides totais em *H. speciosa*

A quantificação de flavonoides totais em extratos e frações de *H. speciosa* foi realizada por espectrofotometria no UV-Vis, com leitura no comprimento de onda de 420 nm, após reação com cloreto de alumínio (AlCl_3). O método baseia-se na formação de complexos estáveis entre o cátion alumínio e os flavonoides, em solução metanólica, resultando em deslocamento batocrômico e efeito hiperacrômico. Desta forma, é possível quantificar flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias, especialmente ácidos fenólicos (FUNARI & FERRO, 2006; MARCUCCI et al., 2009). Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com AlCl_3 , absorvem em comprimentos de onda inferiores (355 nm), não interferindo nas medidas de absorvância (MARCUCCI et al., 2011). Portanto, pode-se inferir que os ácidos fenólicos presentes em *H. speciosa*, em especial o ácido clorogênico e derivados, não interferem na quantificação de flavonoides totais nessas matrizes.

Kreft e colaboradores (2002) quantificaram rutina em uma espécie de trigo (*Fagopyrum esculentum* Moench) empregando três métodos distintos: dois por espectrofotometria na região do UV-Vis, após reação com AlCl_3 , e outro empregando CLAE-FR. O teor de rutina obtido pelo método espectrofotométrico foi 30% superior aquele determinado pelo método por CLAE-FR. Estes dados indicam que outros flavonoides são detectados e quantificados no método por espectrofotometria no

UV-Vis, sendo um método de seletividade limitada para quantificação de um flavonoide isoladamente.

A quantificação de flavonoides por CLAE, em comparação com aquela realizada por métodos espectrofotométricos, possibilita determinar cada composto isoladamente. Por outro lado, considerando-se que a atividade biológica de espécies medicinais frequentemente está associada a efeitos sinérgicos entre diferentes constituintes de uma mesma classe, ou de classes distintas, as quantificações de teores totais por métodos espectrofotométricos, como descritas aqui para flavonoides totais, seria uma estratégia válida para a padronização de drogas vegetais e derivados (GARCIA, 2011). Assim, no presente trabalho optou-se por efetuar a quantificação dos flavonoides por ambos os métodos.

Os parâmetros avaliados na validação do método espectrofotométrico no UV-Vis foram linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. A fração acetato de etila: metanol 1:1 (HFAEM, para modo de obtenção ver item 4.5) obtida por Endringer (2007) foi utilizada para a validação de todos os parâmetros do método, excetuando-se a exatidão, que foi conduzida com um extrato etanólico de folhas da espécie (EMSA, para modo de obtenção ver item 4.5), devido ao menor teor de flavonoides totais neste extrato, em comparação com HFAEM.

5.2.1 Seletividade

Foram traçados espectros de uma solução de leitura de HFAEM sem a adição de AlCl_3 e de uma outra solução de leitura contendo o reagente de cor, para avaliar a seletividade do método em relação a possíveis interferentes contidos na matriz vegetal. Os espectros obtidos para as duas soluções de leitura na faixa de 200 a 500 nm estão representados nas **Figura 7**.

No espectro da solução de leitura sem adição da solução de AlCl_3 observa-se uma absorção discreta no comprimento de onda de leitura (420 nm), que é compensada pelo uso da solução de compensação. No espectro obtido para a solução com AlCl_3 , observa-se uma banda intensa e com máximo de absorção em torno de 420 nm.

Dessa forma, o uso da solução de compensação elimina eventuais interferentes da matriz.

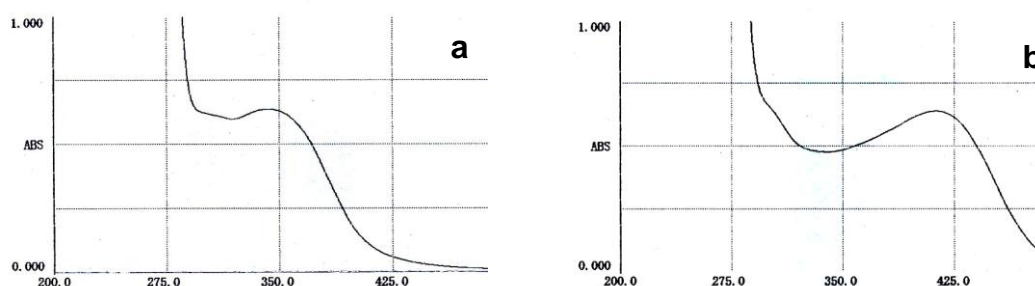


Figura 7 - Espectros no UV-Vis, registrados na região de 200 a 500 nm, obtidos pela varredura da solução de leitura proveniente da amostra HFAEM (a) sem adição de AlCl_3 e (b) após adição de AlCl_3 .

5.2.2 Linearidade

As curvas analíticas foram construídas, após reação da substância de referência (rutina) com cloreto de alumínio. Um total de três curvas foram traçadas em dias diferentes, utilizando-se cinco soluções de concentrações distintas. A curva analítica obtida indicou relação linear entre a concentração de rutina e a absorvância na faixa avaliada. A **Tabela 14** apresenta os valores de concentração e as respectivas absorvâncias obtidas no teste de linearidade.

Tabela 14 - Concentrações das soluções de rutina após reação com AlCl_3 e leituras de absorvância para os pontos da curva analítica.

Dia	Pontos (concentrações mg/mL)	Absorvâncias
1°	1 (0,002)	0,040
	2 (0,005)	0,123
	3 (0,010)	0,238
	4 (0,020)	0,563
	5 (0,030)	0,806
2°	1 (0,002)	0,063
	2 (0,005)	0,138
	3 (0,010)	0,256
	4 (0,020)	0,590
	5 (0,030)	0,821
3°	1 (0,002)	0,058
	2 (0,005)	0,123
	3 (0,010)	0,255
	4 (0,020)	0,586
	5 (0,030)	0,821

Através da análise de variância comprovou-se ausência de diferença estatística entre as curvas analíticas obtidas em dias distintos e, por isso, todos os dados foram reunidos obtendo-se uma única curva analítica, pela plotagem da concentração de rutina *versus* a absorvância. A equação da reta de melhor ajuste foi calculada pelo método dos mínimos quadrados. A **Figura 8** representa as curvas analíticas obtidas.

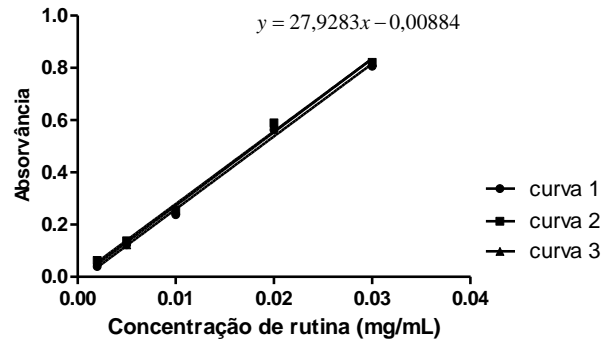


Figura 8 - Curvas analíticas obtida pelo método de UV para a substância de referência de rutina, após reação com AlCl_3 . A equação da curva apresentada refere-se à média das três curvas analíticas obtidas.

Os resultados da análise estatística da curva analítica obtida estão dispostos na **Tabela 15**.

Tabela 15 - Resultados da análise estatística dos dados da curva analítica obtida para a quantificação de rutina por espectrofotometria no UV-Vis, após reação com AlCl_3 .

Parâmetros	Valores obtidos para a curva média
Faixa linear (mg/mL)	0,002 – 0,03
Coefficiente de determinação (r^2)	0,9962
Inclinação	27,9283
Erro padrão da inclinação	0,1618
Intercepto	-0,00884
Erro padrão do intercepto	0,01010

A análise de covariância indicou que as inclinações e os interceptos das três retas eram equivalentes e, portanto, a equação da reta foi estabelecida com os valores médios, resultando na equação $y = 27,9283x - 0,0088$ com r^2 de 0,9962.

A curva analítica apresentou baixo valor de intercepto e, através do teste de significância do intercepto empregando-se o *software* Prisma (versão 5, 2007), verificou-se que esse parâmetro não foi estatisticamente diferente de zero. Dessa forma, pode-se desconsiderá-lo da equação da curva analítica.

5.2.3 Limites de quantificação e de detecção

O desvio padrão do intercepto e a inclinação da curva analítica foram utilizados para o cálculo do limite de quantificação do método, obtendo-se o valor de 3,615 µg/mL. Já o limite de detecção do método, calculado pela equação correspondente, foi de 1,193 µg/mL.

5.2.4 Precisão intradia

A precisão intradia foi avaliada utilizando-se seis determinações no ponto médio de concentração de rutina da curva analítica. Os valores de absorvância obtidos foram utilizados para o cálculo do teor de flavonoides totais e do desvio padrão relativo (DPR). A **Tabela 16** apresenta os resultados para a precisão intradia.

Tabela 16 - Valores de absorvância, concentrações (mg/mL) e teores de flavonoides totais obtidos para as soluções de leitura na avaliação da precisão intradia.

Amostra	Concentração na solução de leitura (mg/mL)	Teor (%)
1	0,0203	14,07
2	0,0198	13,68
3	0,0199	13,71
4	0,0196	13,63
5	0,0205	14,17
6	0,0206	14,30
	Média	13,93
	DPR	2,07

O valor encontrado para o desvio padrão relativo (2,07%), inferior a 5%, indica que o método possui precisão intradia adequada, segundo critérios da ANVISA (BRASIL, 2003).

5.2.5 Precisão interdia

A precisão interdia foi avaliada a partir de seis determinações no ponto médio de concentração de rutina da curva analítica, em dois dias diferentes e com analistas diferentes ($n = 12$). O teor de flavonoides totais foi calculado a partir dos valores de absorvância obtidos para cada solução de leitura e o DPR foi calculado para as doze determinações. A **Tabela 17** apresenta os resultados referentes à avaliação da precisão interdia.

O desvio padrão relativo obtido para a precisão interdia (3,09%) foi inferior a 5%, indicando que o método possui precisão interdias adequada, segundo critérios da ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 17 - Valores de absorvância, concentrações (mg/mL) e teores de flavonoides totais obtidos para as soluções de leitura para avaliação da precisão interdia.

Dia	Concentração na solução de leitura (mg/mL)	Teor (%)
1	0,0203	14,07
	0,0198	13,68
	0,0199	13,71
	0,0196	13,63
	0,0205	14,17
	0,0206	14,30
2	0,0197	13,60
	0,0191	12,99
	0,0196	13,63
	0,0210	14,47
	0,0208	14,37
	0,0210	14,16
Teor médio (%)		13,90
DPR (%)		3,09

5.2.6 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em ensaio de recuperação, utilizando-se o extrato EMSA, em três níveis de concentração diferentes da curva analítica: alta, média e baixa. O extrato EMSA foi selecionado para este ensaio devido ao menor teor de flavonóides totais em comparação com a fração HFAEM. A **Tabela 18** apresenta os resultados obtidos para as soluções de leitura provenientes dos extratos fortificados e do extrato não fortificado (sem a adição de rutina).

Segundo a AOAC (2002), os valores de recuperação dependem do teor dos constituintes nas amostras. Considerando-se que para os flavonoides totais este teor varie de 1 a 10%, são aceitáveis recuperações de 92 a 105%. Portanto, como os valores de recuperação encontrados no ensaio variaram de 94,03 a 96,24%, o método para quantificação de flavonoides totais em matrizes de *H. speciosa* atende os requisitos para o ensaio de exatidão.

Tabela 18 - Ensaio de recuperação de rutina para avaliar a exatidão do método de quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria no UV-Vis.

Níveis de fortificação	Conc. flavonoides totais solução de leitura ($\mu\text{g/mL}$)	Massa adicionada na solução de leitura ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração teórica na solução de leitura ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental na solução de leitura ($\mu\text{g/mL}$)	DPR (%)	Recuperação (%)
1	3,92	4,8	8,72	8,26	5,85	94,72
2	3,92	12,0	15,92	14,97	0,52	94,03
3	3,92	24,0	27,92	26,87	2,67	96,24

Nota: os ensaios foram realizados em triplicata, para cada nível de concentração.

5.2.7 Robustez

Uma vez determinado o tempo ótimo de leitura (20 min) para formação do complexo entre os flavonoides e o cloreto de alumínio, faz-se necessário avaliar a estabilidade do complexo formado. Assim, foram realizadas leituras de seis soluções obtidas a partir de três diferentes extrações no comprimento de onda de 420 nm e nos tempos

de 30, 70, 130, 190 e 250 min após a adição de cloreto de alumínio. Não foi possível realizar a leitura imediatamente após a adição do reagente de cor, uma vez que há formação de duas fases na solução resultante, o que requer centrifugação previamente à leitura. A **Figura 9** apresenta graficamente os resultados obtidos, como a média das determinações para cada tempo de leitura ($n = 6$).

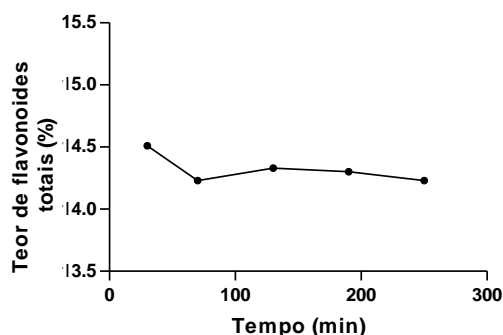


Figura 9 - Teores médios de flavonoides totais na fração HFAEM obtidos em diferentes tempos de leitura, após reação com AlCl_3 .

A análise dos resultados sugere que o teor de flavonoides totais após 30 min é ligeiramente superior aos demais tempos avaliados. Porém, a análise de variância dos dados não indicou diferenças estatisticamente significativas entre os teores e, portanto, o complexo formado pela reação com cloreto de alumínio mantém-se estável por, pelo menos, 250 minutos.

A robustez do método também foi avaliada pela adição de diferentes volumes de AlCl_3 à solução de leitura. Assim, os teores médios obtidos pela adição de 2,0; 2,5 (condição nominal) e 3,0 mL de AlCl_3 , como média de seis determinações ($n = 6$) foram submetidos à análise de variância e pós-teste de Tukey e não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (**Figura 10**).

Pode-se concluir que a variação do volume de AlCl_3 na faixa de 2,0 a 3,0 mL não compromete a quantificação de flavonoides totais em extratos e frações de *H. speciosa*. O método utilizado mostrou-se robusto em relação às alterações deliberadas inseridas na condição nominal de análise.

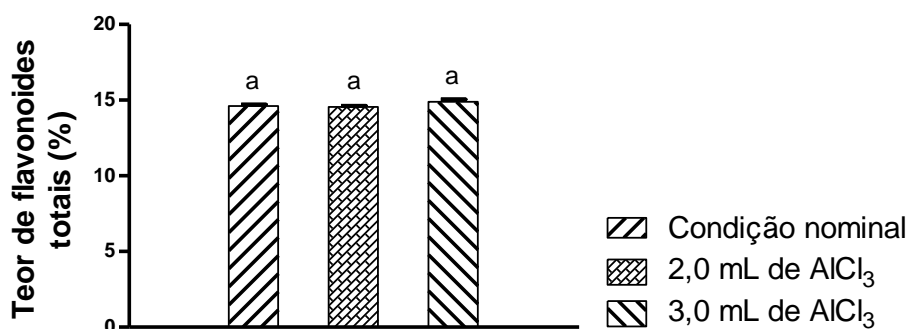


Figura 10 - Teores de flavonoides totais, expressos como a média de seis determinações ($n = 6$), obtidos após adição de diferentes volumes de AlCl₃. As médias identificadas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.3 Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação de ácido clorogênico, FlavHS e rutina em *H. speciosa*

Tendo em vista que rutina foi identificada como um dos constituintes de *H. speciosa* com atividade inibitória da ECA (ENDRINGER, 2007), objetivou-se, no presente trabalho, quantificar este flavonoide isoladamente, com vistas a sua utilização como marcador químico da espécie, para a padronização de derivados da droga vegetal. A padronização proposta também deveria contemplar a quantificação de ácido clorogênico e FlavHS, identificados, juntamente com a rutina, como os três picos majoritários no extrato de *H. speciosa* (item 5.1) e da fração enriquecida em flavonoides e ciclitóis (ENDRINGER, 2007). Para tanto, fez-se necessário desenvolver e validar um método de CLAE para a quantificação simultânea desses constituintes em matrizes de *H. speciosa*.

5.3.1 Desenvolvimento da metodologia analítica

5.3.1.1 *Desenvolvimento da condição cromatográfica*

O desenvolvimento da condição analítica iniciou-se pela análise do perfil cromatográfico exploratório do extrato etanólico da espécie representado na **Figura 11**. O cromatograma obtido indica que os compostos de interesse são eluídos em até 12 min, apresentam resolução inadequada e que o tempo de análise é muito

extenso para o propósito. Dessa forma, o desenvolvimento da condição analítica objetivou obter uma resolução adequada dos três constituintes para análises quantitativas ($R_s > 1,5$), bem como otimizar o tempo de análise. Em todas as condições avaliadas, a pureza espectral dos picos de interesse foi verificada pela extração *on-line* dos espectros no UV nas regiões apical, ascendente e descendente de cada pico e posterior sobreposição dos mesmos.

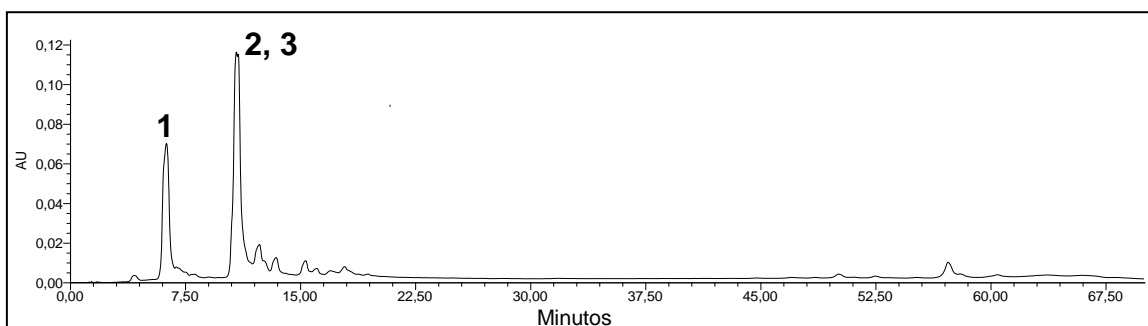


Figura 11 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD para o extrato etanólico de folhas de *H. speciosa*, utilizando gradiente exploratório. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.9.4. (1) ácido clorogênico; (2) FlavHS e (3) rutina.

A primeira modificação proposta, a partir da corrida exploratória, foi utilizar um gradiente linear com inclinação suave ($0,625\% \text{ min}^{-1}$), até 40 min. Gradientes com baixa inclinação constituem uma ferramenta importante para melhorar a resolução cromatográfica (SNYDER et al., 1997). Esta abordagem também teve como objetivo aumentar o fator de retenção (k) dos analitos e consequentemente a resolução (Condição A). É importante ressaltar que a temperatura de análise ($40\text{ }^\circ\text{C}$), bem como os eluentes (ACN e água, ambos acidificados com $0,1\%$ de ácido fosfórico) e a coluna foram mantidos. O perfil cromatográfico obtido para esta condição está apresentado na **Figura 12** e observa-se claramente um aumento nos tempos de retenção e melhoria considerável na resolução dos picos, além destes apresentarem-se finos e simétricos. Porém, o par crítico, referente à rutina e FlavHS, não apresenta resolução adequada para análises quantitativas. É importante salientar que picos finos fornecem relação sinal/ruído maior e menor limite de detecção, enquanto picos simétricos ($T < 2$) possibilitam integração da área com maior exatidão e precisão (SNYDER et al., 1997).

Objetivando-se melhorar a resolução do par crítico, decidiu-se reduzir o fluxo do eluente, a fim de aumentar o número de pratos teóricos (SNYDER et al., 1997).

Assim, na condição B, mantendo-se as demais condições de análise, o fluxo foi reduzido para 0,4 mL/min. A **Figura 12** apresenta o perfil cromatográfico obtido, sendo possível observar aumento previsível dos tempos de retenção dos picos de interesse, mas diminuição da resolução do par crítico.

A condição C foi proposta para otimizar o tempo de análise, iniciando-se a corrida com 10% do modificador orgânico, bem como aumentar a resolução dos picos de interesse, reduzindo-se a inclinação do gradiente para 0,4% min⁻¹. O cromatograma obtido está apresentado na **Figura 12**, observando-se melhoria na resolução do par crítico e, também, redução nos tempos de retenção dos compostos.

Na condição D reduziu-se a concentração do modificador orgânico e a inclinação do gradiente (0,1% min⁻¹), resultando em resolução adequada dos picos de interesse. Porém, estes se apresentaram largos e com tempos de retenção elevados, além da presença de um grande intervalo de tempo entre os picos do ácido clorogênico e aqueles dos flavonoides de interesse (**Figura 12**).

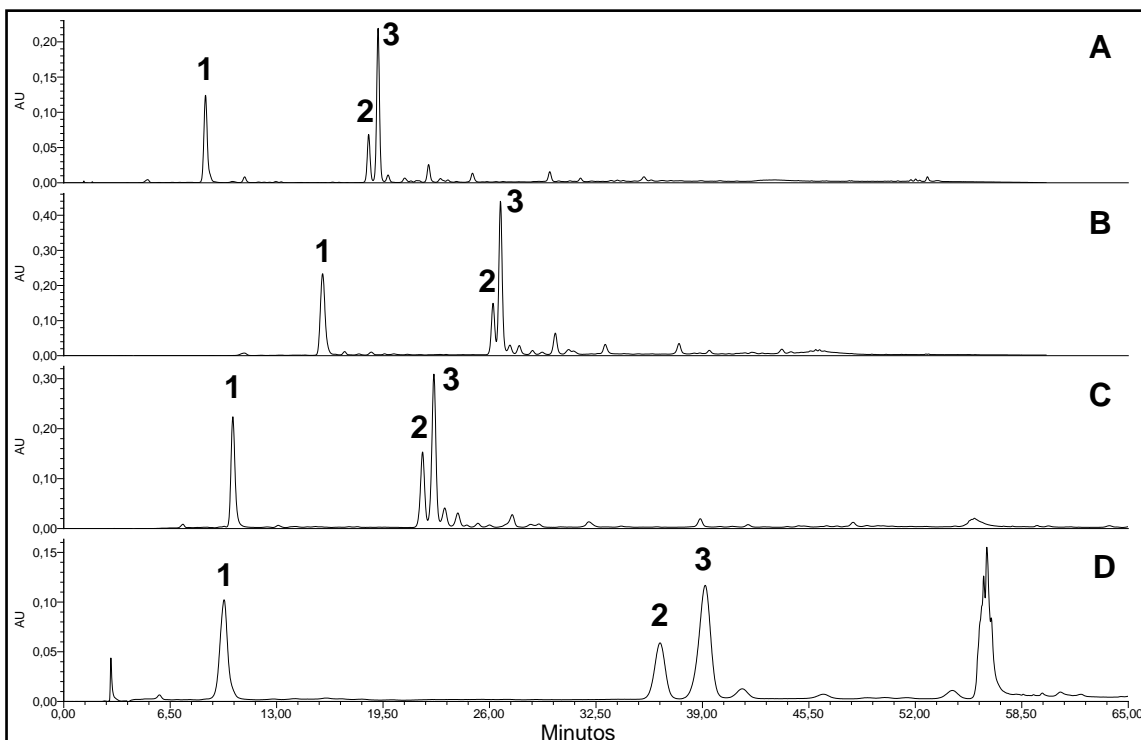


Figura 12 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as condições analíticas A, B, C e D. Condições cromatográficas: vide Tabela 2, item 4.9.4. Picos: (1) ácido clorogênico; (2) FlavHS e (3) rutina

A fim de tornar os picos mais finos e melhorar a resolução, decidiu-se utilizar coluna com maior comprimento (250 × 4 mm d.i.) em relação àquela utilizada nas condições A - D (125 × 4 mm d.i.), ambas com partículas de 5 µm. O aumento do tamanho da coluna oferece maior número de pratos teóricos, resultando em separação mais eficiente (SNYDER et al, 1997). O perfil cromatográfico obtido para a condição E (**Figura 13**) apresenta picos mais finos e menores tempos de retenção para os flavonoides; porém, a resolução destes ainda não foi satisfatória para análises quantitativas, além de se observar um intervalo entre 0–10 min sem eluição de nenhum pico de interesse.

Na condição F aumentou-se a porcentagem inicial do modificador orgânico para 15%, seguindo-se uma eluição isocrática até 20 min. Um gradiente linear suave foi inserido na sequência para reduzir o alargamento dos picos dos flavonoides de interesse (0,25% min⁻¹). Picos ligeiramente assimétricos foram observados nesta condição, bem como alargamento das bandas referentes aos flavonoides (**Figura 13**).

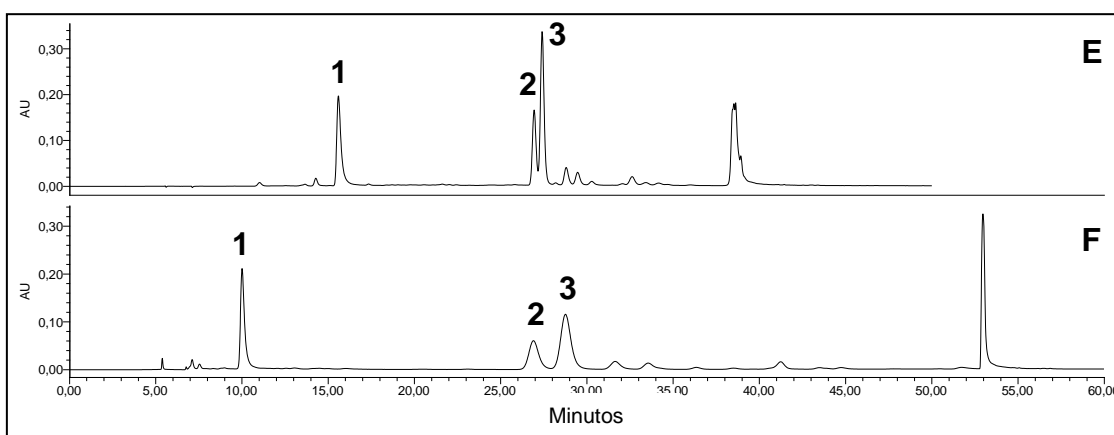


Figura 13 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as condições analíticas E e F. Condições cromatográficas: vide Tabela 2, item 4.9.4. Picos: (1) ácido clorogênico; (2) FlavHS e (3) rutina.

O *software* utilizado no presente trabalho para o controle do sistema de CLAE e processamento dos cromatogramas (Empower 2) possibilita o emprego de gradientes côncavos e convexos. O programa apresenta quatro tipos de gradientes côncavos, com variação na curvatura (tipo 7 ao 10) e quatro tipos de gradientes convexos (tipo 2 ao 5), representados na **Figura 14**. A fim de avaliar o efeito desses gradientes na resolução dos picos de interesse, na condição G empregou-se o

gradiente convexo (Tipo 4), mantendo-se as demais condições de análise. No cromatograma obtido (**Figura 15**) é possível observar resolução adequada para os picos 2 e 3, bem como que eles se apresentam ligeiramente mais finos. Esta condição foi definida como a condição analítica para a validação do método e posterior quantificação dos compostos de interesse, uma vez que apresentou melhores valores de resolução e tempo de análise satisfatório (eluição de todos os picos de interesse em até 30 min).

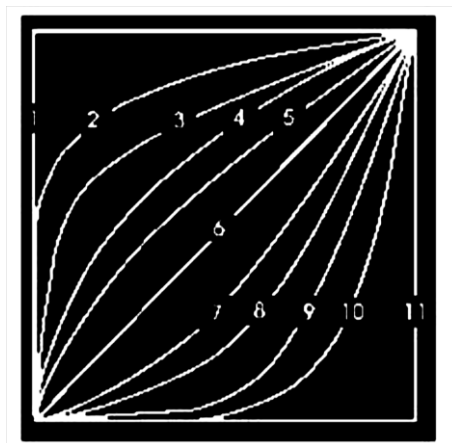


Figura 14 - Perfis das curvas de gradiente disponíveis no programa Empower 2 (Waters). 2 a 5: gradientes convexos, 6: linear, 7 a 10: gradientes côncavos.

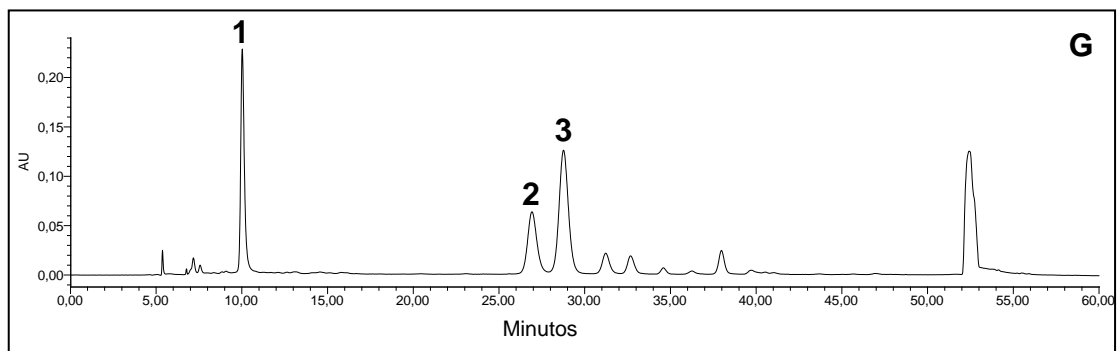


Figura 15 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD para a condição analítica G. Condições cromatográficas: vide Tabela 2, item 4.9.4. Picos: (1) ácido clorogênico; (2) FlavHS e (3) rutina.

Vale ressaltar que em todas as condições avaliadas, o gradiente de eluição foi elevado, ao final da análise, para 95% do modificador orgânico para efetuar a limpeza da coluna, com retorno à condição inicial ao término da corrida. Assim, a condição de análise definida apresentou tempo de análise de 60 min, com reequilíbrio da coluna de 15 min entre as injeções.

5.3.1.2 Otimização das condições de extração

A fim de selecionar o solvente adequado para extração dos três constituintes de interesse na matriz de *H. speciosa*, procedeu-se à avaliação de água, solução hidrometanólica a 50% e metanol grau CLAE. Os solventes foram selecionados com base na polaridade dos constituintes de interesse. O ensaio foi realizado conforme descrito no item 4.9.5.

A eficiência da extração foi avaliada através da integração das áreas dos picos correspondentes às substâncias de interesse e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos dados comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 16**. Observa-se que a extração com os três sistemas de solventes forneceu diferentes teores dos compostos de interesse, relacionados às áreas obtidas pela integração dos picos. O emprego de solução hidrometanólica a 50% possibilitou recuperação máxima dos constituintes em análise, sendo selecionada para o método analítico em desenvolvimento.

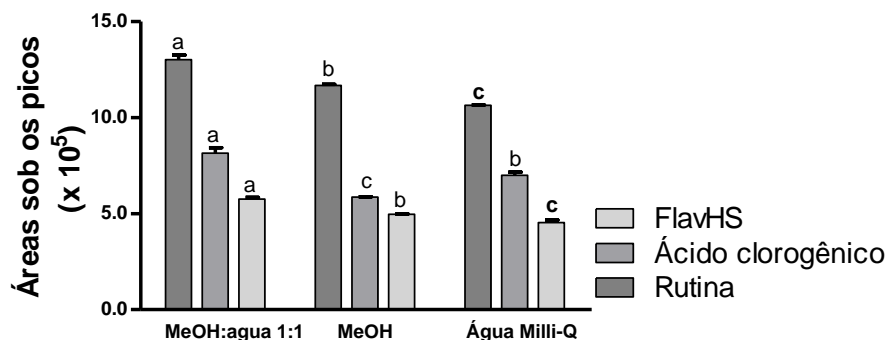


Figura 16 - Extração de ácido clorogênico, rutina e FlavHS do extrato MFA em três sistemas de solventes: água, MeOH e solução hidrometanólica a 50% ($n = 3$). Para cada composto, as médias identificadas com letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.3.2 Validação do método por CLAE-DAD para quantificação de ácido clorogênico, rutina e FlavHS em *H. speciosa*

A condição cromatográfica definida e que resultou na adequada resolução das substâncias de interesse foi validada segundo critérios do ICH, ANVISA e AOAC (AOAC, 2002; BRASIL, 2003; ICH, 1996).

5.3.2.1 Seletividade

A seletividade da condição cromatográfica estabelecida (item 4.9.6.1) foi avaliada para soluções hidrometanólicas (item 4.9.6.2). Na **Figura 17** estão representadas as sobreposições dos espectros extraídos pelo detector DAD nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos correspondentes ao ácido clorogênico, rutina e FlavHs. Observa-se coincidência nos máximos de absorção, indicando a seletividade do método e, portanto, que ele não está sujeito a interferências de componentes presentes na matriz (RIBANI et al., 2004).

Para avaliar a confiabilidade da condição cromatográfica estabelecida, testes de adequabilidade do sistema foram realizados, analisando-se os parâmetros: resolução, fator de cauda, número de pratos teóricos, fator de retenção e repetibilidade da resposta dos picos, avaliada pelo DPR do tempo de retenção de seis determinações ($n = 6$), para cada pico de interesse.

Os resultados dos testes de adequabilidade do sistema estão de acordo com as recomendações do FDA (2000) (**Tabela 19**), com exceção da resolução dos picos correspondentes a FlavHS e rutina, respectivamente de 1,90 e 1,88, bem como do fator de retenção do ácido clorogênico ($k < 2$) (FDA, 2000). No entanto, valores de resolução menores que 2 são aceitos para testes de adequabilidade do sistema em matrizes biológicas e análise de traços (DONG et al., 2001). Em relação ao fator de retenção (k), alguns autores recomendam valores de k entre 0,5 e 20 para matrizes complexas, como extratos vegetais (SNYDER et al, 1997).

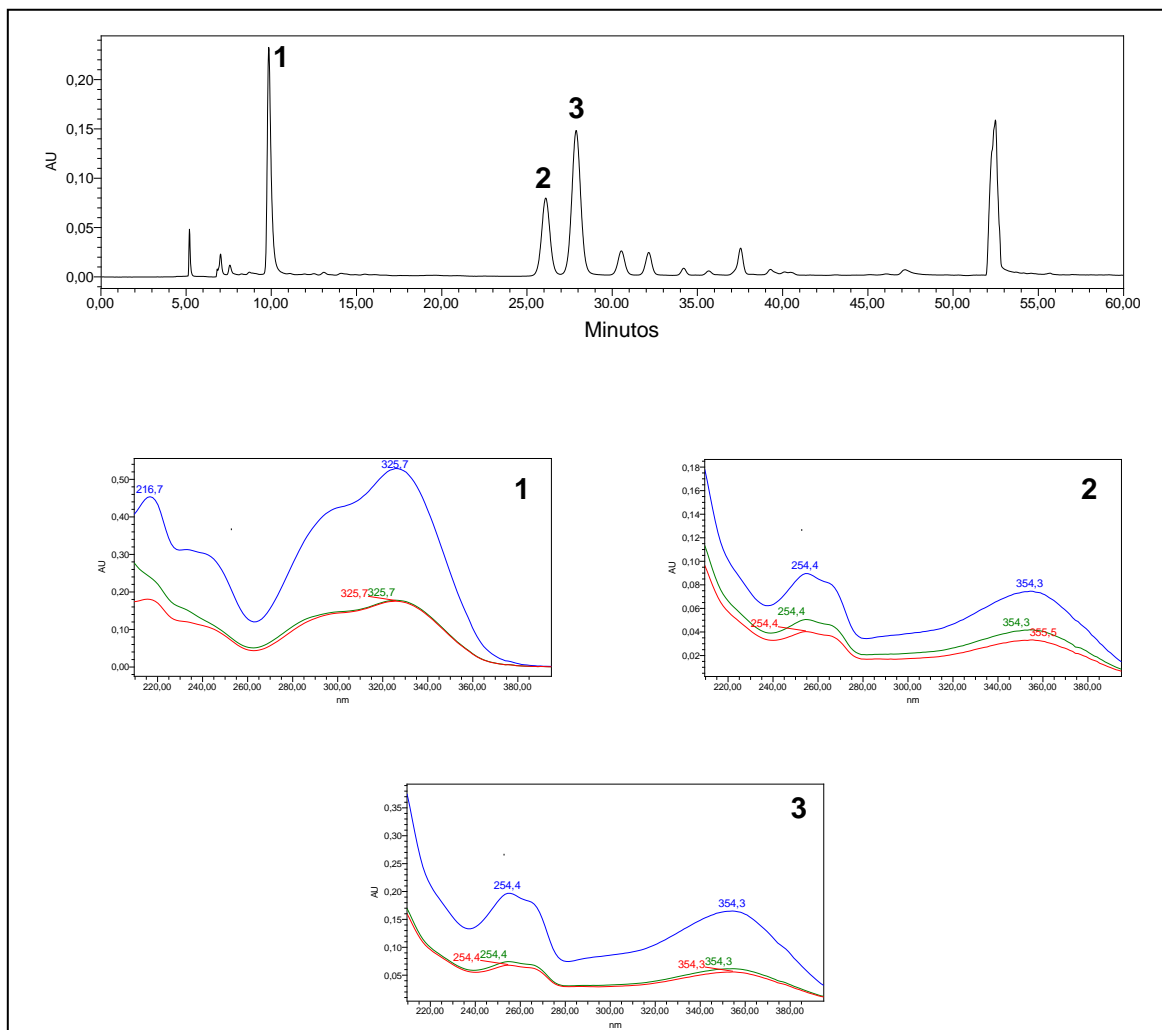


Figura 17 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD para extrato MFA de folhas de *H. speciosa*. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.9.6.1. Detecção: 350 nm. Picos: 1, ácido clorogênico; 2, FlavHS; 3, rutina. Os espectros no UV foram extraídos *on-line* pelo detector DAD nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos correspondentes.

Tabela 19 - Parâmetros de adequabilidade do sistema determinados para os picos dos analitos no extrato MFA de *H. speciosa*, empregando a condição cromatográfica estabelecida.

Parâmetro	R_s	T	N	k	TR	RSD (RT, n=6)
Analito						
Ácido clorogênico	2,05	1,52	9.918	1,27	9,86	0,21
FlavHS	1,90	1,02	31.692	5,02	26,12	0,21
Rutina	1,88	1,02	13.716	5,43	27,90	0,21
Valores recomendados pelo FDA (FDA, 2000)	$R_s > 2/$ $R_s > 1.5$	$T \leq 2$	>2.000	$k > 2.0$	-	RSD \leq 1%. para $n \geq 5$

Condição cromatográfica: vide Parte Experimental, item 4.9.6.1.
*SNYDER et al., 1997; DONG et al., 2001.

5.3.2.2 Linearidade

Para contemplar as variações de concentração dos analitos nos diferentes extratos e frações da espécie, uma ampla faixa de concentração foi empregada para as substâncias de referência rutina e ácido clorogênico. O teor de FlavHS foi expresso em termos de rutina, uma vez este flavonoide não foi isolado para ser empregado como substância de referência. Tendo em vista que ambos os flavonoides são glicosídeos da quercetina e, portanto, com os mesmos cromóforos, tal abordagem é viável. Assim, a faixa de concentração da curva analítica construída empregando-se rutina deveria ser suficientemente larga para englobar os teores de ambos os flavonoides. Foi proposta, então, uma faixa contemplando concentrações no intervalo 0,2-4,0 µg para ambas as substâncias de referência (rutina e ácido clorogênico).

Duas curvas analíticas, em dois dias diferentes, foram construídas para os analitos. Foram preparadas duas soluções das substâncias de referência, em cada dia de análise, como descrito no item 4.9.6.5. Volumes distintos dessas soluções foram injetados automaticamente no sistema de CLAE, em triplicata. A **Tabela 20** apresenta os valores das massas injetadas de rutina e ácido clorogênico e suas respectivas áreas e desvios padrão relativos, para os dois dias de análise.

Ambas as curvas analíticas construídas para as substâncias de referência indicaram relação linear entre a massa injetada da substância de referência (µg) *versus* a área dos picos correspondentes, sendo obtidos coeficientes de determinação (r^2) com valores superiores a 0,99. Os dados da análise de regressão linear, dos dois dias de análises, e as curvas analíticas obtidas pela média das duas curvas para rutina e ácido clorogênico estão apresentados nas **Figuras 18 e 19 e Tabela 21**.

As curvas obtidas nos dois dias de análise não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). Portanto, dentro das faixas de concentração propostas para os analitos, o método apresentou relação linear adequada.

Tabela 20 - Massa injetada, áreas médias ($n = 3$) e desvio padrão relativo (DPR) das curvas analíticas, para cada analito, nos dois diferentes dias de análise.

Volume injetado (μL)		Massa injetada (μg)	Dia 1		Dia 2	
Sol 1	Sol 2		Área média	DPR (%)	Área média	DPR (%)
ÁCIDO CLOROGÊNICO						
Solução de referência (1,89 mg/mL)						
-	10	0,19	625099	1,81	563827	0,77
5	-	0,95	3330896	0,23	3071046	3,49
10	-	1,89	6570178	0,25	6221520	1,20
15	-	2,84	9809950	0,19	9302324	0,77
20	-	3,78	13400089	0,37	13365734	2,53
RUTINA						
Solução de referência (1,95 mg/mL)						
-	10	0,20	845116	0,82	763169	2,49
5	-	0,98	4357338	0,10	4428378	0,06
10	-	1,98	8753613	0,27	8999833	0,05
15	-	2,93	13169187	0,12	13355520	0,18
20	-	3,90	17478194	0,27	17677251	0,40

Tabela 21 - Resultados da regressão linear para curvas analíticas dos analitos, em dois dias de análise.

Parâmetros estatísticos	Ácido clorogênico		Rutina	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
Faixa linear (μg)	0,19 – 3,78		0,20 – 3,90	
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9996	0,9968	0,9999	0,9999
DPR da curva (%)	1,64	4,88	0,68	0,88
Inclinação ($\times 10^5$)	35,31	35,13	44,96	45,67
Erro padrão da inclinação ($\times 10^5$)	0,39	1,15	0,21	0,25
Intercepto ($\times 10^5$)	-0,60	-2,67	-0,43	-0,61
Erro padrão do intercepto ($\times 10^5$)	0,90	2,67	0,49	0,59

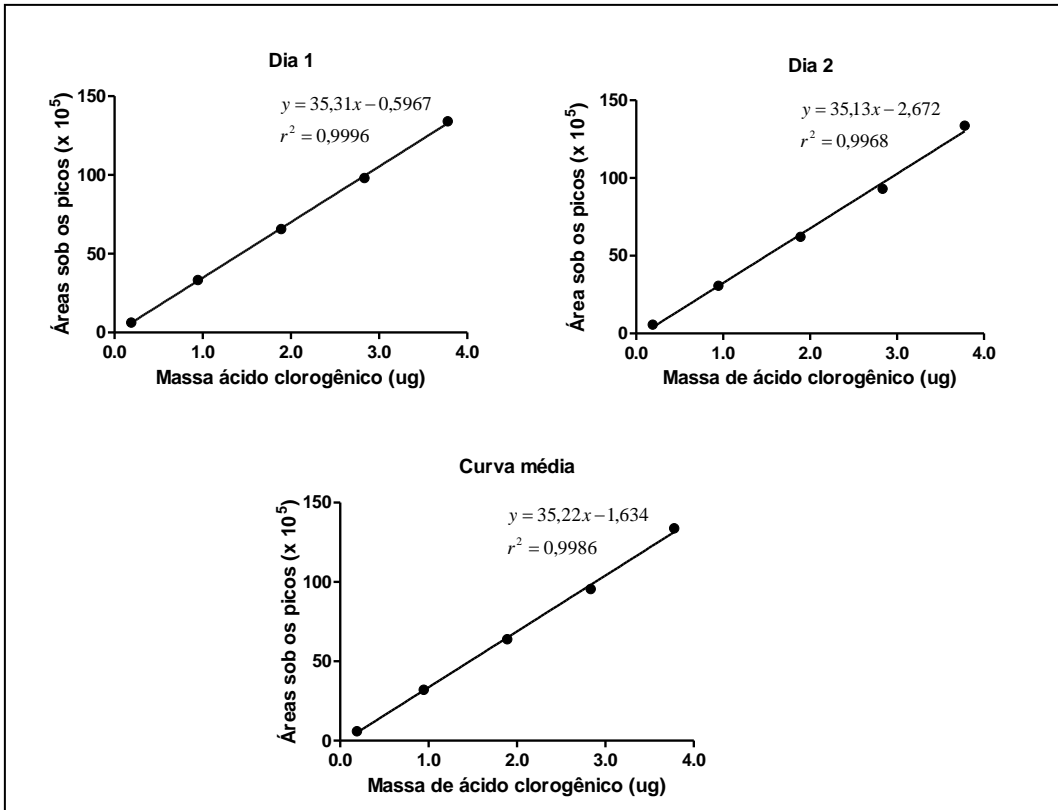


Figura 18 - Média das curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD, em dois dias de análise, para o ácido clorogênico.

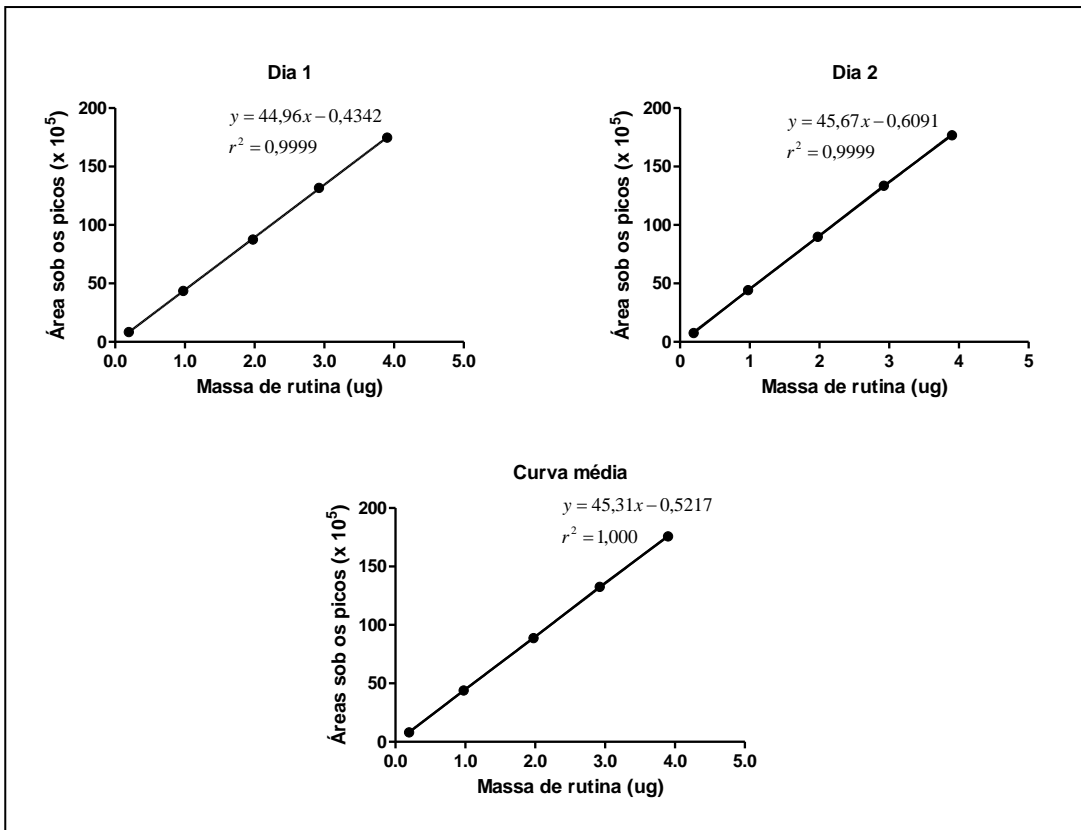


Figura 19 - Média das curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD, em dois dias de análise, para a rutina.

5.3.2.3 Limite de quantificação

Inicialmente, o limite de quantificação do analito foi calculado empregando-se a equação que considera os parâmetros das curvas analíticas (desvio padrão do intercepto e a inclinação das curvas analíticas) (**Tabela 22**).

Posteriormente, o limite de quantificação foi determinado pela injeção ($n = 5$) de massas decrescentes das substâncias de referência (0,01 a 0,10 μg para rutina; 0,02 a 0,20 μg para o ácido clorogênico). Os valores de limites de quantificação para ambos os analitos obtidos por meio dos dois métodos estão listados na **Tabela 22**.

Tabela 22 - Limite de quantificação (LQ) do ácido clorogênico e rutina calculados pela equação de regressão e determinados experimentalmente.

Forma de determinação	LQ do ácido clorogênico (μg injetados)	LQ da rutina (μg injetados)
Curva analítica média*	0,51	0,12
LQ experimental**	0,05	0,05

*Calculado pelos parâmetros das curvas obtidas em dois dias de análise, conforme item 4.9.6.6.

**DPR < 3,00 % (SNYDER et al., 1997)

5.3.2.4 Limite de detecção

O LD foi calculado empregando-se a equação que considera os parâmetros das curvas analíticas, obtidas em dois dias distintos.

Para a determinação experimental foram realizadas injeções de massas decrescentes das substâncias de referência (0,05 a 0,005 μg para ambas as substâncias de referência). Os valores de limites de detecção calculados pela curva analítica e pela razão sinal/ruído ($S/N = 3$) são apresentados na **Tabela 23**.

Tabela 23 - Limite de detecção (LD) do ácido clorogênico e rutina calculados a partir da equação de regressão e experimentalmente.

Forma de determinação	LD para ácido clorogênico (μg injetados)	LD para rutina (μg injetados)
Curva analítica média*	0,167	0,039
LD (S/R = 3) experimental**	0,017	0,017

*Calculado pelos parâmetros das curvas obtidas em dois dias de análise, conforme item 4.9.6.7.

**relação S/R = 3

5.3.2.5 Estabilidade dos analitos na solução hidrometanólica a 50%

A estabilidade do ácido clorogênico, FlavHS e rutina nas soluções hidrometanólicas a 50% foi avaliada à temperatura ambiente (23 ± 2 °C), em diferentes intervalos de tempo (0, 10, 20, 30, 40 e 50 h). As médias dos teores obtidos em cada intervalo de tempo, para ambos os analitos, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando submetidos à análise de variância e pós-teste de Tukey ($p > 0,05$), conforme representado na **Figura 20**.

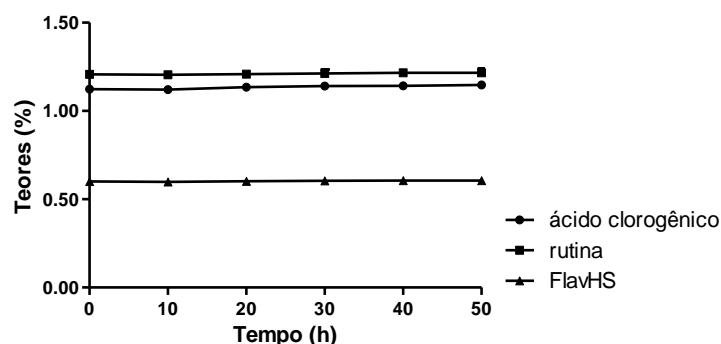


Figura 20 - Teores médios dos analitos em soluções hidrometanólicas a 50 %, mantidas à temperatura ambiente (23 ± 2 °C). Os dados são expressos como teor médio de seis determinações ($n = 6$). As médias dos teores de todos os analitos em cada intervalo de tempo analisado não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.3.2.6 Precisão

5.3.2.6.1 Precisão intradia

Seis soluções hidrometanólicas a 50% do extrato MFA de *H. speciosa* foram preparadas, ajustando-se a massa do extrato para que a concentração dos analitos se aproximasse do ponto médio de concentração das substâncias de referência da curva analítica, e analisadas por CLAE-DAD conforme descrito no item 4.9.6.9. A partir dos teores de ácido clorogênico, FlavHS e rutina obtidos ($n = 6$), calculou-se o desvio padrão relativo e determinou-se a precisão intradia, cujos dados são apresentados na **Tabela 24**. Segundo critérios da ANVISA (BRASIL, 2003), valor de DPR menor que 5,0% indica que o método desenvolvido apresenta precisão intradia adequada.

Tabela 24 - Teores percentuais de ácido clorogênico, FlavHS e rutina no extrato MFA e valores de DPR utilizados para a determinação da precisão intradia do método.

Amostra	Teor de ácido clorogênico (%)	Teor de rutina (%)	Teor de FlavHS (%)
1	1,17	1,20	0,58
2	1,13	1,24	0,61
3	1,12	1,26	0,62
4	1,12	1,25	0,62
5	1,18	1,25	0,62
6	1,13	1,24	0,62
Teor médio (%)	1,14	1,24	0,61
DPR (%)	2,24	1,64	2,65

5.3.2.6.2 Precisão interdia

A precisão interdia foi avaliada por meio de seis determinações dos teores dos analitos no extrato selecionado (MFA), em dois dias consecutivos, com analistas diferentes ($n = 12$). O desvio padrão relativo dos teores também foi calculado. A **Tabela 25** apresenta os valores para a precisão interdia obtidos para o método em questão.

Os valores de desvio padrão relativo abaixo de 5,0% indicam que o método desenvolvido apresenta precisão interdia adequada, segundo critérios da ANVISA (BRASIL, 2003).

As médias dos teores entre os dois dias de determinações foram comparadas pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$). Os teores não diferiram entre o primeiro e o segundo dias de análises.

Tabela 25 - Teores percentuais de ácido clorogênico, FlavHS e rutina no extrato MFA e valores de DPR utilizados para determinação da precisão interdias do método.

Dia	Amostra	Teor de ácido clorogênico (%)	Teor de rutina (%)	Teor FlavHS (%)
1	1	1,17	1,20	0,58
	2	1,13	1,24	0,61
	3	1,12	1,26	0,62
	4	1,12	1,25	0,62
	5	1,18	1,25	0,62
	6	1,13	1,24	0,62
2	1	1,18	1,26	0,62
	2	1,14	1,22	0,63
	3	1,15	1,25	0,64
	4	1,16	1,26	0,63
	5	1,15	1,24	0,61
	6	1,18	1,25	0,62
Teor médio (%)		1,15	1,24	0,62
DPR (%)		1,93	1,38	2,25

5.3.2.7 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em testes de recuperação, a partir da fortificação do extrato MFA com massas conhecidas de ácido clorogênico e rutina. Na **Tabela 26** estão apresentados os resultados para o ensaio, em cada um dos três níveis de concentração avaliados.

A recuperação do ácido clorogênico compreendeu a faixa de 98,52 a 101,26% e para a rutina de 100,65 a 102,97%. Esses valores estão dentro da faixa de recuperação estabelecida pela AOAC (2002), considerando-se que o teor dos

analitos em *H. speciosa* varia de 1 a 10% e, portanto, que a recuperação deve situar-se entre 92 – 105%.

Tabela 26 - Recuperação de ácido clorogênico e rutina no extrato MFA de *H. speciosa* (média, $n = 3$).

Nível de fortificação	Massa na droga vegetal (μg)	Massa adicionada (μg)	Massa teórica (μg)	Massa experimental (μg)	DPR (%)	Recuperação (%)
ÁCIDO CLOROGÊNICO						
1	0,78	0,21	0,99	1,01	1,77	101,26
2	0,78	1,07	1,85	1,80	0,41	97,09
3	0,78	2,14	2,92	2,88	0,68	98,52
RUTINA						
1	0,93	0,20	1,13	1,16	0,73	102,85
2	0,93	1,00	1,93	1,94	0,47	100,65
3	0,93	1,99	2,92	3,01	0,80	102,97

5.3.2.8 Robustez

A avaliação da robustez do método foi realizada por análises comparativas de amostras obtidas e quantificadas nas condições cromatográficas estabelecidas e com alterações deliberadas desta, como temperatura da coluna (38 e 42°C), lote da coluna, concentração de ácido fosfórico na fase móvel (0,09 e 0,11%) e fluxo (0,35 e 0,45 mL/min).

Os resultados obtidos no ensaio de robustez do método estão dispostos na **Figura 21**.

Os resultados da análise de variância e do teste de Tukey indicaram que não há diferenças estatísticas entre as médias obtidas para quantificação dos analitos nas variações avaliadas ($p > 0,05$). Esses dados indicam que o método é robusto para as variáveis avaliadas.

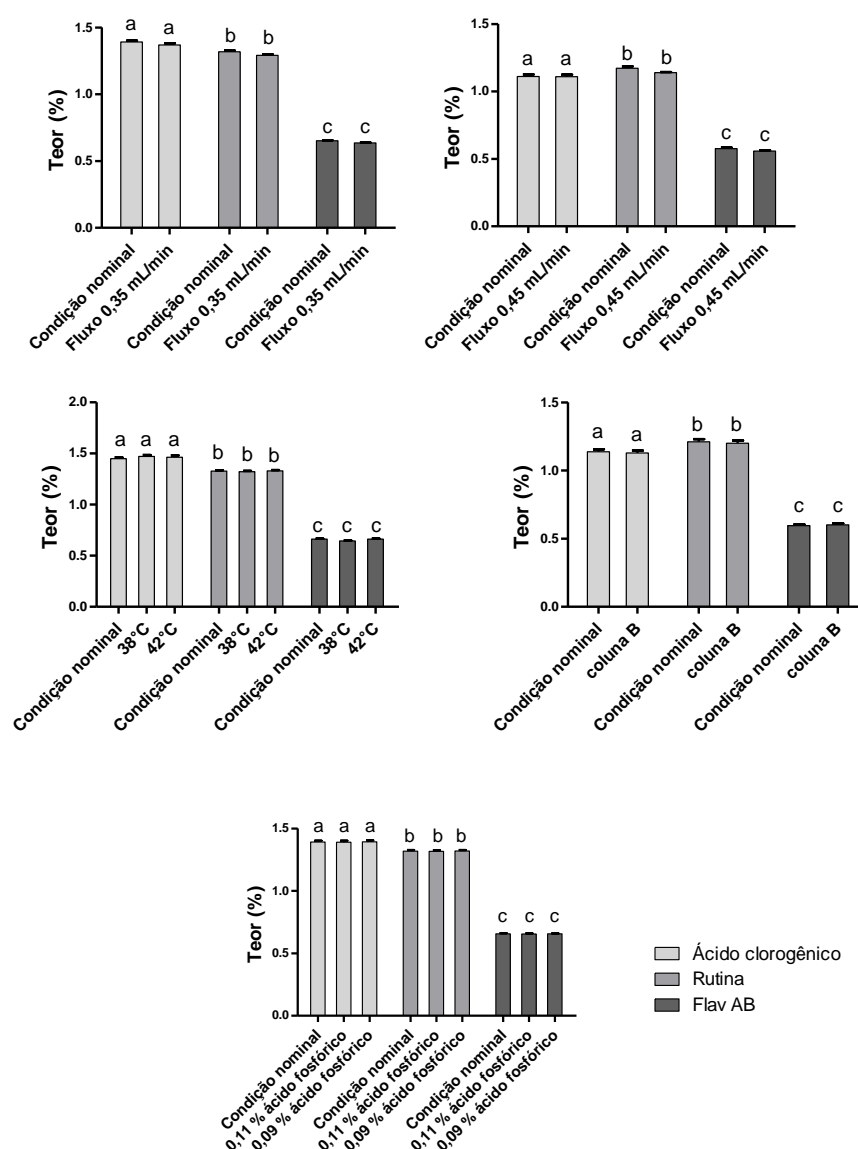


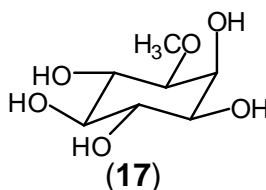
Figura 21 - Influência do fluxo, lote de coluna, concentração de ácido na fase móvel e temperatura na quantificação de ácido clorogênico, FlavHS e rutina em *H. speciosa* (média, $n = 6$). As médias identificadas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.4 Desenvolvimento de método analítico para quantificação de bornesitol em *H. speciosa*

Os ciclitóis constituem uma classe de poliidroxicicloalcanos ou polióis cíclicos e seus derivados. Na literatura, o termo ciclitol é usado frequentemente para referir-se a compostos poliidroxicilados cíclicos (DUCHEK et al., 2011). São compostos cristalinos, solúveis em água, possuem alto ponto de ebulição e sabor adocicado. Como álcoois, reagem similarmente aos polióis acíclicos, mas devido à estrutura

cíclica, são consideravelmente mais estáveis (DEY & HARBONE, 1989; PIGMAN, 1957).

Myo-inositol ou inositol é o ciclitol mais comum, sendo encontrado em microorganismos, plantas e animais. Bornesitol (**17**) é um éter monometílico do *myo*-inositol, que ocorre naturalmente (PIGMAN, 1957).



Em geral, procedimentos utilizados para análise de carboidratos e polióis aplicam-se igualmente aos ciclitóis (DEY & HARBONE, 1989). A detecção direta de carboidratos e compostos relacionados (incluindo ciclitóis) não é simples, uma vez que esses compostos não absorvem na região do UV ou visível, e também não possuem fluorescência (CHAPLIN & KENNEDY, 1994).

Dentre as abordagens para a análise dessas substâncias está a utilização de sistemas de CLAE acoplados a detector de índice de refração (IR). Esse tipo de detecção apresenta sensibilidade cerca de dez vezes inferior ao detector de UV, devido ao ruído causado pela pulsação do solvente e a influência da variação da temperatura durante o experimento. Além disso, o detector de IR não permite eluição em gradiente, constituindo um fator limitante para a análise de matrizes complexas (CHAPLIN & KENNEDY, 1994).

Para incrementar a sensibilidade da detecção desses compostos, uma alternativa é empregar uma etapa de derivatização da amostra, que é definida como uma reação química entre o analito e um reagente visando alterar propriedades químicas ou físicas dos analitos. Essa estratégia possibilita a inserção de grupos cromofóricos com alta absorvidade molar em moléculas que não absorvem na região do UV. A derivatização pode ser realizada antes ou após a separação no sistema cromatográfico empregado. Os cromóforos comumente inseridos nessa etapa incluem: benzil, 4-nitrobenzil, benzoato, toluila, fenacil, dentre outros. Convém ressaltar que essa abordagem deve ser considerada como a de última escolha, uma

vez que aumenta a complexidade da análise, por aumentar o erro e o tempo total de análise (CHAPLIN & KENNEDY, 1994; SNYDER et al., 1997).

A cromatografia gasosa (CG) é o método de escolha para a análise de mono e dissacarídeos. Por requerer que as substâncias a serem analisadas sejam voláteis, é necessário introduzir uma etapa de derivatização da amostra. A reação com trimetilsilano (TMS) é a mais utilizada, uma vez que se completa rapidamente, devido à estabilidade dos derivados TMS. Além disso, as colunas disponíveis possibilitam elevada resolução para a separação desses derivados (STREETER & STRIMBU, 1998). CG é um método com grande sensibilidade e a detecção por espectrometria de massas é a mais empregada para a análise de polióis (CHAPLIN & KENNEDY, 1994). Diversos métodos utilizando CG-EM estão descritos para a determinação de carboidratos (STREETER & STRIMBU, 1998), poliálcoois e bornesitol (RUIZ-MATUTE et al., 2007; SANZ et al., 2008). Outros métodos utilizados incluem CLAE-EM, mas uma etapa de derivatização prévia é recomendada para aumentar a sensibilidade e para obtenção de espectros mais simples (LAMARI et al., 2003). Um método para a determinação de açúcares e ciclitóis em vegetais empregando-se derivatização pós coluna para inserção de grupos fluorescentes também foi relatado (MASUDA et al., 1996).

Em função da indisponibilidade de sistema de CG, optou-se, inicialmente, por avaliar um método por CLAE com detector de índice de refração (CLAE-IR). A vantagem desta abordagem é a simplicidade de análise, uma vez que não requer derivatização prévia da amostra. Porém, IR é um método de detecção inespecífico, com sensibilidade inferior ao UV-Vis, além de estar sujeito a variações de temperatura, o que constituem desvantagens do método.

Assim, duas metodologias foram avaliadas para desenvolvimento de método para quantificação de bornesitol em *H. speciosa*: CLAE-IR e CLAE-DAD.

5.4.1 Purificação do bornesitol

Inicialmente fez-se necessário obter bornesitol com pureza analítica, visto que este ciclitol não é comercialmente disponível. A purificação foi realizada a partir de

frações enriquecidas, provenientes do trabalho de Endringer (2007). Recristalização com MeOH a quente foi o método de purificação empregado, visto que o composto é pouco solúvel nesse solvente (solubilidade de 2,5 mg/mL) (ENDRINGER, 2007).

O sólido obtido após tratamento com MeOH foi analisado por métodos espectrométricos usuais (RMN de ^1H e ^{13}C ; IV), bem como foi determinada sua faixa de fusão (198,7 – 200,2 °C). Os dados obtidos foram comparados com aqueles descritos por Endringer (2007), que relatou uma faixa de fusão de 199,9 a 200,5. Análises por CCD, empregando-se as condições descritas no trabalho de Endringer (2007), também foram realizadas.

Os dados obtidos indicaram grau de pureza necessária para seu emprego como substância de referência para validação do método analítico.

5.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração (CLAE-IR)

5.4.2.1 Avaliação de condições analíticas

Nos artigos que descrevem análises de ciclitóis por CLAE com detecção por índice de refração foi utilizada coluna de amino (CHÁVEZ-SERVÍN et al., 2004). Porém, como já havia sido realizada análise do bornesitol em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa (ENDRINGER, 2007) em coluna de fase reversa (octadecilsilano-ODS), optou-se por reproduzir a condição previamente estabelecida.

Inicialmente, empregaram-se as condições descritas por Endringer (2007), para a análise do bornesitol por CLAE-IR utilizando água como eluente. O emprego da fase móvel água:metanol (95:5) (condição b, **Tabela 7**, Parte Experimental) resultou em perfil cromatográfico muito similar ao obtido com água como eluente (**Figura 22**).

Também foi obtido cromatograma por CLAE-IR para a fração enriquecida em ciclitóis e flavonoides, utilizando as mesmas condições descritas acima. O perfil cromatográfico (**Figura 23**) indicou três picos parcialmente sobrepostos ao pico do bornesitol (1,800 min). Considerando que a condição avaliada não resultou em

seletividade para o bornesitol, inviabilizando sua análise quantitativa, condições alternativas foram avaliadas na tentativa de alterar a seletividade do método e resolver o pico de interesse.

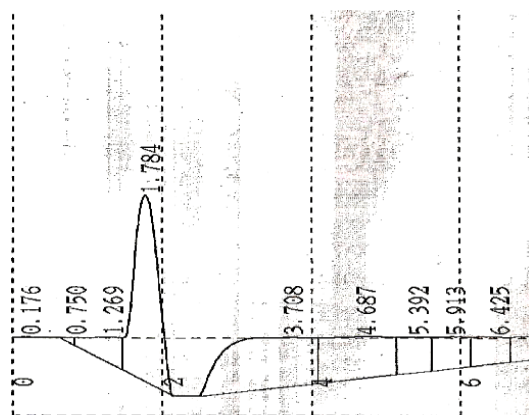


Figura 22 - Cromatograma obtido por CLAE-IR para bornesitol, utilizando como eluente água:MeOH (95:5) e coluna de ODS. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.10.2.2.

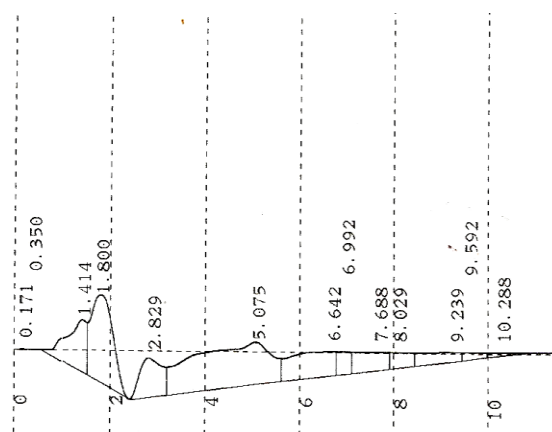


Figura 23 - Cromatograma obtido por CLAE-IR para a fração enriquecida em ciclitóis e flavonoides de *H. speciosa*. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.10.2.2. Eluente água:MeOH (95:5) e coluna de ODS.

Uma estratégia poderosa para modificar a seletividade do método é a substituição do modificador orgânico, mantendo-se a mesma força de eluição (SNYDER et al., 1997), o que pode resultar em uma melhoria na resolução dos picos. Assim, utilizou-se acetonitrila como modificador orgânico na nova condição analítica (água:acetonitrila 97,5:2,5; condição c, **Tabela 7**, Parte Experimental). A **Figura 24** representa os perfis cromatográficos obtidos para o extrato de *H. speciosa* e para a

fração enriquecida em flavonoides e ciclitóis, podendo-se observar a sobreposição de picos na fração enriquecida.

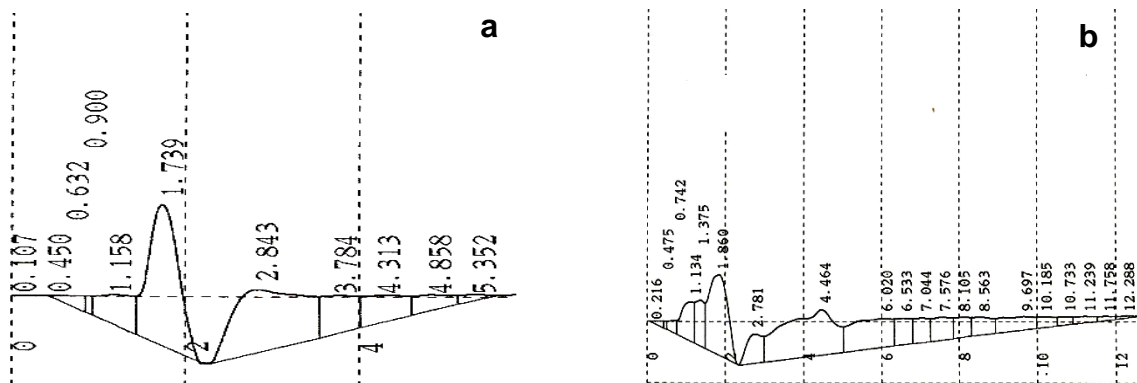


Figura 24 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-IR para (a) bornesitol e (b) fração enriquecida em ciclitóis e flavonoides de *H. speciosa*. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.10.2.2. Eluente água:ACN (97:2,5) e coluna de ODS.

Outra tentativa para melhorar a resolução do bornesitol na fração enriquecida em ciclitóis e flavonoides foi a utilização de coluna de amino (Shim-pack CLC-NH₂), fase estacionária muito empregada na análise de carboidratos e compostos relacionados. A condição inicial testada nesta coluna foi fluxo de 1 ml/min, temperatura ambiente e fase móvel de água:MeOH (40:60) (condição d, **Tabela 7**, Parte Experimental). Nessas condições observou-se um aumento no tempo de retenção do bornesitol e separação de três picos na fração de interesse (**Figura 25**).

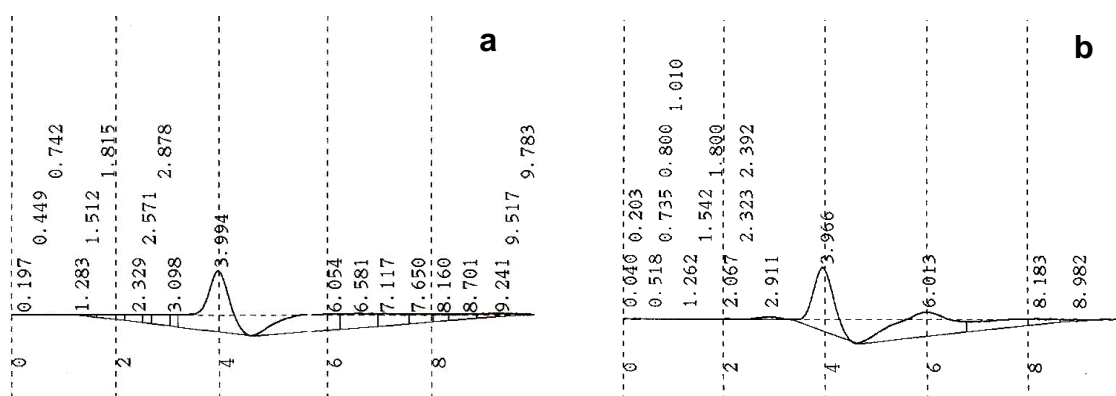


Figura 25 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-IR para (a) bornesitol e (b) fração enriquecida em ciclitóis e flavonoides de *H. speciosa*. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.10.2.2. Eluente água:MeOH (40:60) e coluna de amino.

Objetivando-se melhorar a resolução do pico de interesse, a força da fase móvel foi reduzida nas condições subsequentes. As seguintes fases móveis foram avaliadas: água:metanol (20:80); metanol; acetonitrila:água (95:5) (condição e, f e g,

respectivamente, **Tabela 7**, Parte experimental). Além disso, procedeu-se ao a análise em sala refrigerada (25 ± 2 °C), uma vez que o detector de índice de refração é muito sensível a esta variável. A **Figura 26** representa os perfis cromatográficos obtidos.

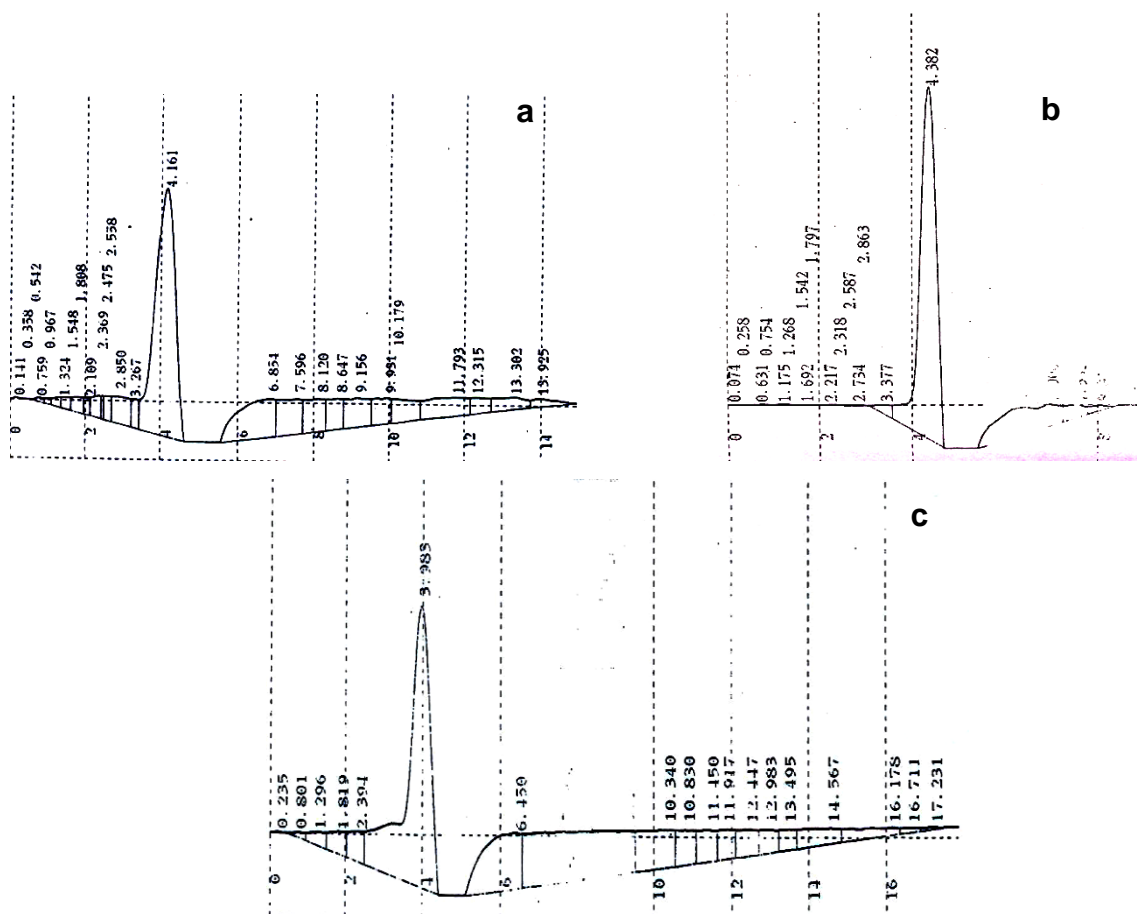


Figura 26 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-IR com coluna de amino para a fração enriquecida em ciclitóis e flavonoides de *H. speciosa*. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.10.2.2. Eluentes: (a) MeOH (100%); (b) água:ACN (5:95); (c) MEOH:água (80:20).

5.4.2.2 Avaliação da seletividade

Tendo em vista que os perfis cromatográficos obtidos em todas as condições cromatográficas avaliadas no item anterior foram similares, e que o tempo de retenção do bornesitol não variou significativamente, a condição com 100% de metanol como eluente foi escolhida para a avaliação da seletividade. Para tanto, procedeu-se à recuperação do eluato correspondente ao pico do bornesitol (TR = 4,161), após sucessivas injeções. O solvente foi evaporado e o resíduo resultante foi

avaliado por CCD de sílica 60G (para Condições cromatográficas vide Parte Experimental item 4.10.2.3). O revelador utilizado (ácido fosfomolibdico e ácido sulfúrico) cora de azul o bornesitol, que apresentou Rf de aproximadamente 0,5 (Figura 27).

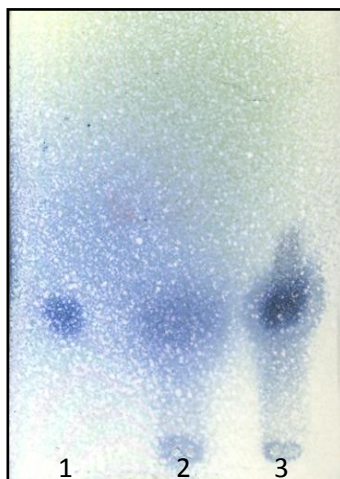


Figura 27 - Cromatograma obtido por CCD de sílica gel para o eluato do pico correspondente ao bornesitol, para avaliação da seletividade do método por CLAE-IR. Eluente: acetona:água (5:4); revelador: ácido fosfomolibdico e ácido sulfúrico. Bandas: 1, bornesitol; 2, eluato do pico; 3, fração enriquecida em ciclitóis e flavonoides de *H. speciosa*.

O cromatograma de CCD obtido indica que o método não foi seletivo, uma vez que além da banda correspondente ao bornesitol há pelo menos mais uma banda no ponto de aplicação.

Além das limitações anteriormente mencionadas para a CLAE-IR, ressalta-se a impossibilidade de eluição em gradiente, reduzindo as estratégias disponíveis para alteração da seletividade. Alterações possíveis, como controle de temperatura, troca do modificador orgânico e diminuição da força do eluente foram avaliadas, sem sucesso. A seletividade da fase estacionária também foi alterada (inicialmente ODS e posteriormente coluna de amino) e o tempo de retenção do bornesitol não se alterou significativamente. Devido à elevada polaridade do bornesitol e de outros ciclitóis presentes na fração padronizada, não é viável utilizar coluna cromatográfica de sílica. Assim, decidiu-se tentar outro método para a quantificação do bornesitol nas amostras. Na indisponibilidade de sistema de cromatografia em fase gasosa

(CG), o método escolhido para a quantificação de bornesitol foi o CLAE-DAD com derivatização prévia das amostras.

5.4.3 CLAE-DAD com derivatização prévia das amostras

5.4.3.1 Identificação do produto de tosilação do bornesitol (PTB)

A análise por CLAE-DAD do produto da reação de tosilação do bornesitol (**Figura 28**), empregando-se as condições analíticas descritas no item 4.10.3.1, indica a formação de uma mistura de produtos, totalizando 5 picos no perfil cromatográfico resultante. Considerando-se que o bornesitol possui cinco hidroxilas, é provável que os picos observados no cromatograma correspondam aos derivados mono, di, tri, tetra e pentatosilados do ciclitol. Uma vez que a inserção de grupos tosila em moléculas polares torna estas mais lipofílicas, e que a análise foi realizada em coluna de C18, o pico com menor TR deve corresponder ao produto monotosilado e o de maior TR, ao produto pertosilado.

A análise do perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD do produto obtido da reação de tosilação do extrato CFOF permite observar a presença majoritária dos produtos tetra e pertosilados (**35**) (**Figura 28**).

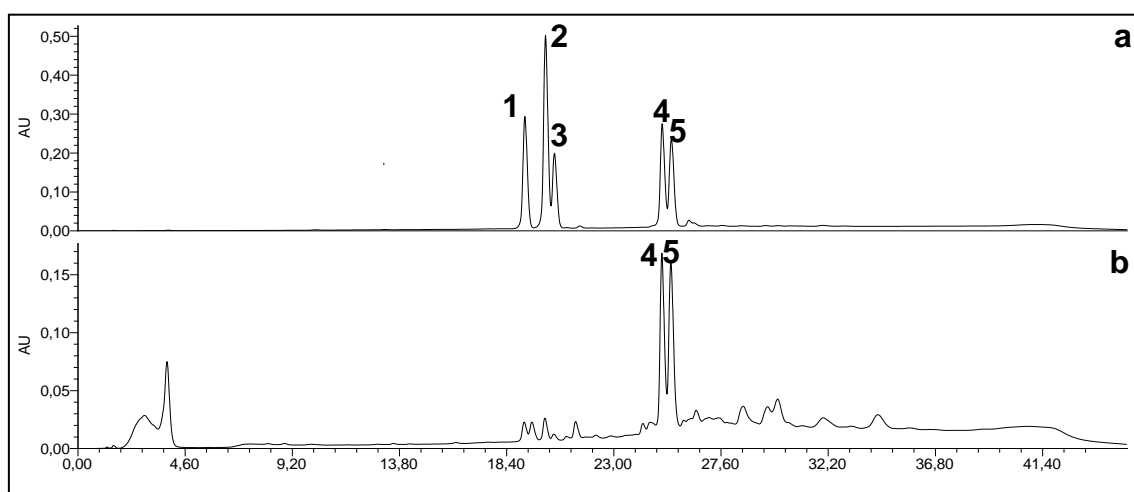
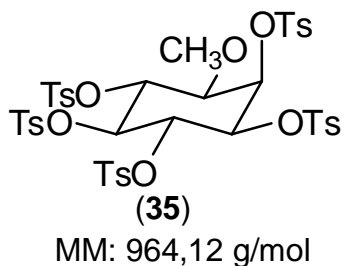


Figura 28 – Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para a reação de tosilação de (a) substância de referência bornesitol e (b) extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* CFOF. (1) derivado monotosilado, (2) ditosilado, (3) tritosilado, (4) tetratosilado e (5) pentatosilado. Para condições analíticas, vide Parte Experimental, item 4.10.3.1.



O produto pertosilado foi, então, definido para a validação do método analítico para quantificação do ciclitol.

5.4.3.2 Definição do padrão interno e do reagente de derivatização

Os grupos cromóforos selecionados para avaliação na etapa de derivatização da amostra foram benzoila (reagente cloreto de benzoila - BzCl) e tosila (cloreto de *p*-toluenossulfonila - TsCl). Cloreto de benzoila foi avaliado empregando-se diversas condições reacionais, mas não se obteve sucesso com este reagente (dados não apresentados). Além disso, BzCl é líquido à temperatura ambiente, enquanto TsCl é sólido, o que facilita controlar a massa empregada na reação. Assim, optou-se por utilizar TsCl como reagente de derivatização. A reação com TsCl é geralmente realizada em piridina anidra, solvente selecionado para a etapa de derivatização da amostra.

Métodos analíticos que possuem uma etapa de derivatização são considerados complexos e, para assegurar a confiabilidade dos resultados, é necessário empregar um padrão interno (RIBANI et al., 2004; SNYDER et al., 1997). O padrão interno deve apresentar similaridade estrutural com o constituinte alvo da análise e possuir comportamento químico semelhante, especialmente frente à substituição nucleofílica, reação empregada nesse trabalho. Além disso, não deve estar presente na amostra e, no caso de métodos por CLAE, possuir TR diferente da substância de interesse e não reagir com a substância ou outro componente da matriz. Assim, para métodos em que não é possível obter a matriz isenta do analito, o padrão interno deve ser utilizado para fazer uma “correção da recuperação” para a substância de interesse (RIBANI et al., 2004).

A fim de selecionar o padrão interno, avaliou-se a presença de alguns monossacarídeos (arabinose, glicose, galactose, lactose e ramnose) na fração de *H. speciosa* enriquecida em flavonoides e ciclitóis (BRAGA et al., 2009; ENDRINGER, 2007), na fração EtOAc:MeOH (1:1) e no extrato etanólico da espécie. A análise do cromatograma da **Figura 29** sugere que a ramnose poderia ser utilizada como padrão interno, pois não foi detectada no extrato e nas frações. Porém, este oligossacarídeo apresenta isômeros, o que a princípio dificulta seu uso como padrão interno. A ausência dos demais oligossacarídeos nas matrizes avaliadas não pôde ser atestada e, dessa forma, decidiu-se pela utilização do pentaeritritol (**37**), um poliol sintético, que não ocorre como produto natural. Esta substância apresenta os requisitos necessários a um padrão interno, visto que deve se comportar de maneira similar ao bornesitol frente às reações de benzoilação e tosilação avaliadas na derivatização, por possuir quatro hidroxilas. Além disso, o derivado pertosilado (**36**) deste composto estava disponível no laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFMG.

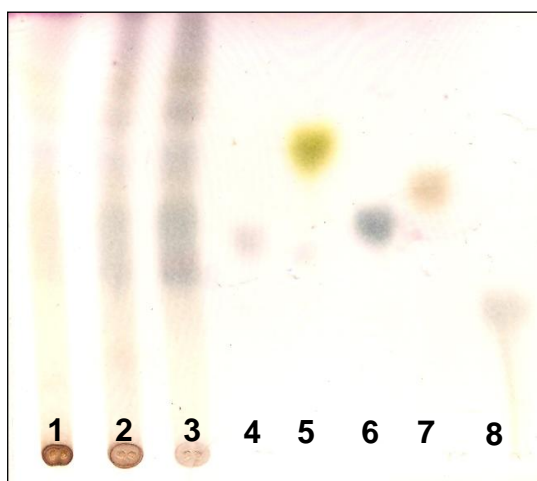
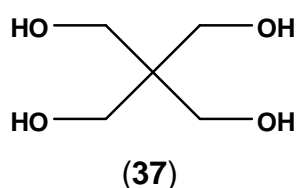


Figura 29 - Cromatograma obtido por CCD de sílica gel para monossacarídeos de referência, extrato e frações de *H. speciosa*. Eluente: clorofórmio:metanol:água (70:30:4); revelador: anisaldeído sulfúrico. 1, Extrato etanólico; 2, fração EtOAc:MeOH (1:1); 3, fração enriquecida em ciclitóis e flavonoides; 4, galactose; 5, ramnose; 6, glicose; 7, arabinose; 8, lactose.

5.4.3.3 Desenvolvimento da metodologia analítica

5.4.3.3.1 Desenvolvimento da condição analítica

O desenvolvimento da metodologia analítica para a quantificação de bornesitol em *H. speciosa* iniciou-se com avaliações preliminares da solução reacional (para obtenção da solução reacional, ver item 4.10.4.2), que indicaram que os produtos de interesse, bornesitol pertosilado (PTB) e pentaeritritol pertosilado (PPI – padrão interno) são eluídos com até 75% de metanol, em coluna de C18. Além disso, com o propósito de evitar o acúmulo de componentes lipofílicos na coluna cromatográfica, gerados pela inserção de grupos tosila em diversos constituintes da matriz, inseriu-se uma etapa de lavagem da coluna em todas as condições avaliadas, após eluição dos constituintes de interesse. Para tanto, o gradiente de eluição foi elevado até no mínimo 90% do modificador orgânico em cada condição avaliada, ao final da corrida.

Diversas condições analíticas foram avaliadas (**Tabela 8**, item 4.10.3.3.1, Parte Experimental), porém apenas as principais serão aqui apresentadas. É importante ressaltar que a avaliação de cada condição foi realizada considerando-se a resolução dos picos de interesse ($> 1,5$). A análise da pureza espectral dos picos não permitiu inferir sobre a seletividade durante o desenvolvimento do método, uma vez que a grande maioria dos constituintes da amostra são produtos tosilados, possuindo, dessa forma, espectros de absorção na região do UV muito similares. A seletividade foi então avaliada apenas na condição que apresentou adequada resolução dos picos do PTB e PPI.

A primeira condição avaliada (condição A) empregou concentração inicial de MeOH elevada (40%), uma vez que a tosilação resulta em derivados de baixa polaridade. Eluição em gradiente com baixa inclinação foi empregada nos primeiros minutos da corrida para permitir a eluição dos reagentes e derivados, além do solvente (piridina) presentes na solução reacional. O pico do PTB eluiu entre 16 – 18 min região que apresenta um gradiente suave de eluição ($0,714\% \text{ min}^{-1}$). A elevação da proporção de MeOH para 75% ($5\% \text{ min}^{-1}$), seguida de eluição isocrática até 32 min resultou em TR em torno de 30 min para PPI (**Figura 30**). Esta condição de análise apresentou resolução razoável para os picos de interesse; porém, para reduzir o tempo de

análise, a região de eluição em gradiente no início da corrida foi reduzida na condição B, mantendo-se a mesma inclinação do gradiente na região de eluição do pico de PTB, porém a inclinação do gradiente foi reduzida na região de eluição do pico de PPI ($2,14 \text{ min}^{-1}$). O cromatograma obtido (**Figura 30**) indica redução dos TR, porém com perda de resolução para o pico referente a PPI.

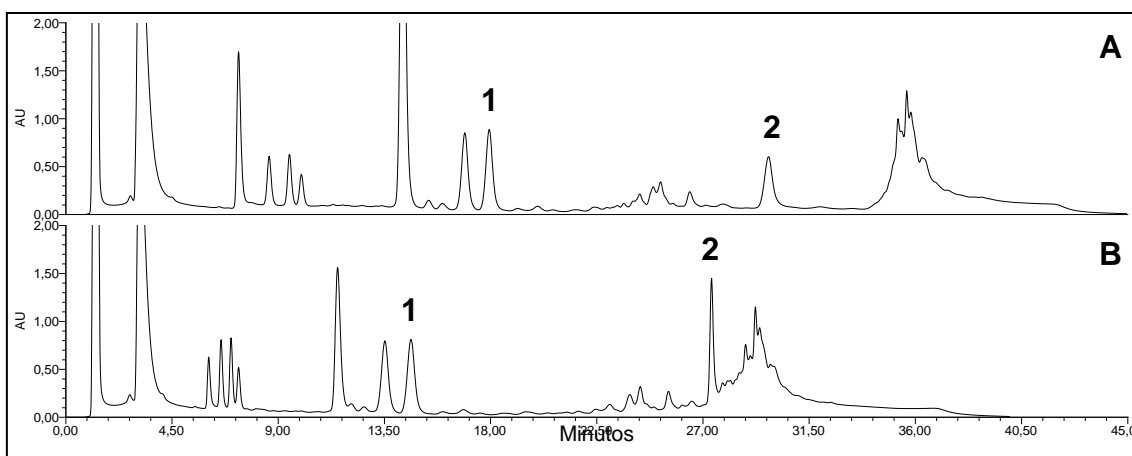


Figura 30 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as condições analíticas A e B. Para programas de eluição vide Tabela 8, item 4.10.3.3.1. (1) PTB e (2) PPI.

Na condição C buscou-se alterar a seletividade da fase móvel. Assim, partindo da condição A, substituiu-se MeOH por ACN, após ajuste da força da fase móvel. Pode-se observar que o pico de PPI apresentou-se mais fino e com melhor resolução, porém, em contrapartida, o pico de PTB se sobrepôs completamente aos picos vizinhos (**Figura 31**).

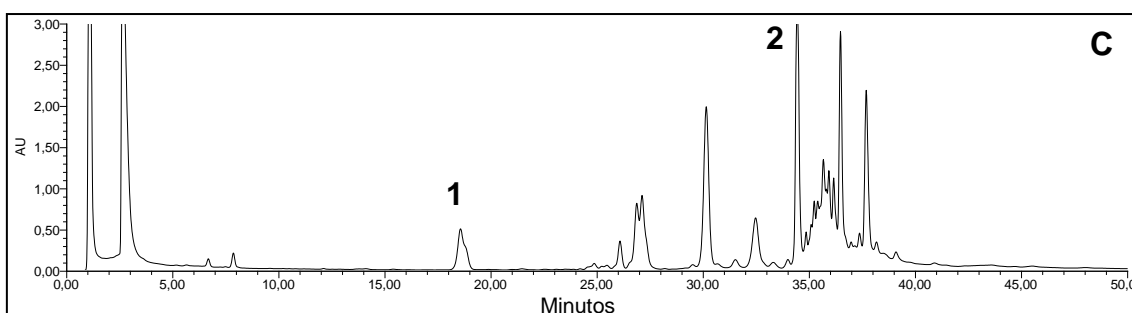


Figura 31 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD na condição analítica C. Para programa de eluição vide Tabela 8, item 4.10.3.3.1. (1) PTB e (2) PPI.

Considerando o comportamento dos picos de interesse frente aos modificadores orgânicos testados, decidiu-se avaliar a combinação de ambos, ACN e MeOH. Assim, na condição D utilizou-se um gradiente de eluição de MeOH, ACN e água, mantendo-se a temperatura de 25°C . Na região de eluição do pico de PTB (em torno

de 22 min) manteve-se uma maior concentração de MeOH e na sequência inverteu-se a proporção dos modificadores orgânicos, prevalecendo ACN na região de eluição do pico de PPI. Nesta condição observou-se o desdobramento do pico de PTB, indicando que haviam picos sobrepostos nas condições até então avaliadas. O pico de PPI apresentou-se sobreposto a outros, porém fino, prosseguindo-se com a adequação da força de eluição nesta região do cromatograma (**Figura 32**). Dessa forma, na condição E aumentou-se a porcentagem de ACN nesta região e alterou-se a temperatura da coluna para 40°C. É importante ressaltar que a alteração da temperatura do sistema é uma importante ferramenta para melhorar a resolução dos picos, uma vez que há alteração em k e possivelmente na seletividade. Observou-se melhor separação para ambos os picos, além da confirmação de que o pico de PPI estava sobreposto a outro nas condições anteriormente examinadas (**Figura 32**). Adicionalmente, foi observada uma redução da pressão total do sistema, importante para preservação do equipamento e coluna cromatográfica, optando-se por trabalhar na temperatura de 40°C.

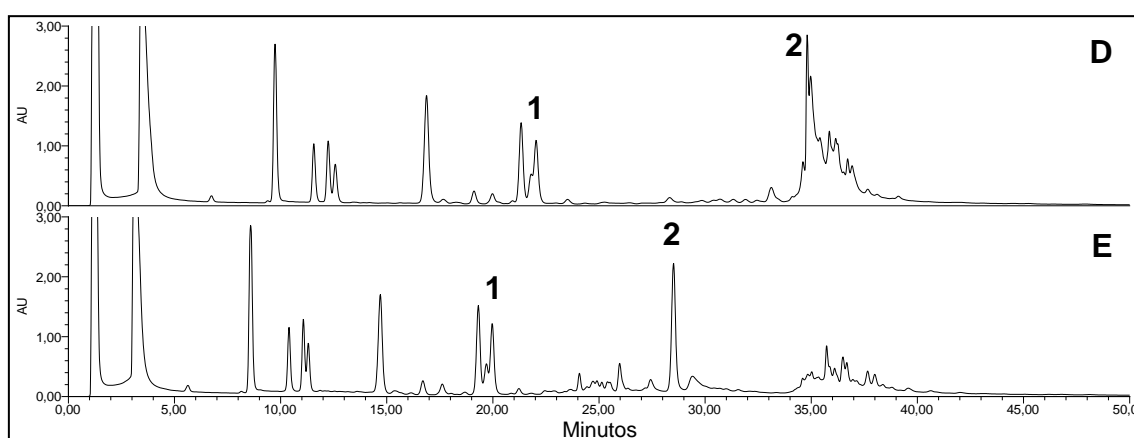


Figura 32 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as condições analíticas D e E. Para programas de eluição vide Tabela 8, item 4.10.3.3.1. (1) PTB e (2) PPI.

Visando aumentar a resolução do pico de PTB, na condição F aumentou-se a proporção inicial de ACN e reduziu-se, na mesma proporção, a concentração de MeOH. Um pequeno aumento da concentração de ACN foi adotado na região do pico de PTB. Observou-se melhoria da resolução de ambos os picos, porém ainda insuficiente para a finalidade do método (**Figura 33**). Uma abordagem importante e muito empregada para melhorar a resolução de sistemas cromatográficos é o aumento do número de pratos teóricos do mesmo e o aumento do comprimento da coluna constitui uma das estratégias mais simples neste sentido. Assim, na condição

G avaliou-se uma coluna com 250 mm de comprimento em substituição à de 125 mm. Os picos apresentaram melhor resolução de uma maneira geral, porém, devido ao previsível aumento nos tempos de retenção dos componentes, o pico de PPI eluiu na etapa de lavagem da coluna, sobrepondo-se a outros picos (**Figura 33**). Assim, as demais condições descritas a seguir foram avaliadas utilizando-se a coluna citada acima.

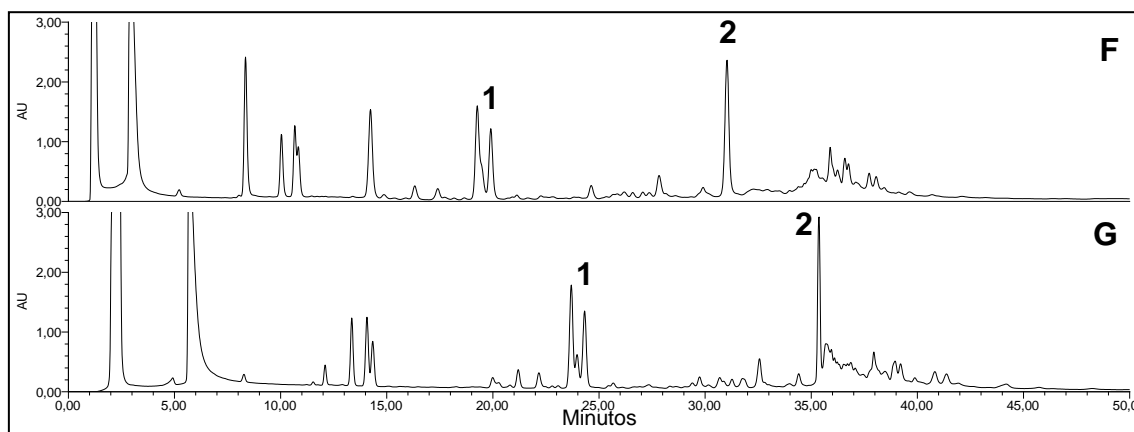


Figura 33 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as condições analíticas F e G. Para programas de eluição vide Tabela 8, item 4.10.3.3.1. (1) PTB e (2) PPI.

Na condição H inseriu-se uma pequena modificação na inclinação do gradiente na região de eluição do pico de PTB (de 1,43 para 0,83% min^{-1} de MeOH). Observou-se a eluição de picos finos, porém o pico de PPI continuou parcialmente sobreposto ao pico vizinho (**Figura 34**). Sucessivas modificações nas proporções dos modificadores orgânicos, bem como na inclinação do gradiente foram introduzidas, em especial na região de eluição do pico do PPI (condições I e J), sem sucesso. Na condição K empregou-se uma eluição isocrática na região de eluição do pico do PPI, resultando em uma resolução aceitável em relação ao pico vizinho, porém com prejuízos para a resolução do pico de PTB (**Figura 35**). A alteração na proporção dos modificadores orgânicos na região de eluição de PTB foi avaliada na condição L, sem melhorias significativas (**Figura 35**).

Ajustes finos nas condições K e L possibilitaram obter uma condição com ambos os picos adequadamente resolvidos e, então, a condição M foi estabelecida para condução da validação do método para quantificação de bornesitol em matrizes de *H. speciosa* (**Figura 36**).

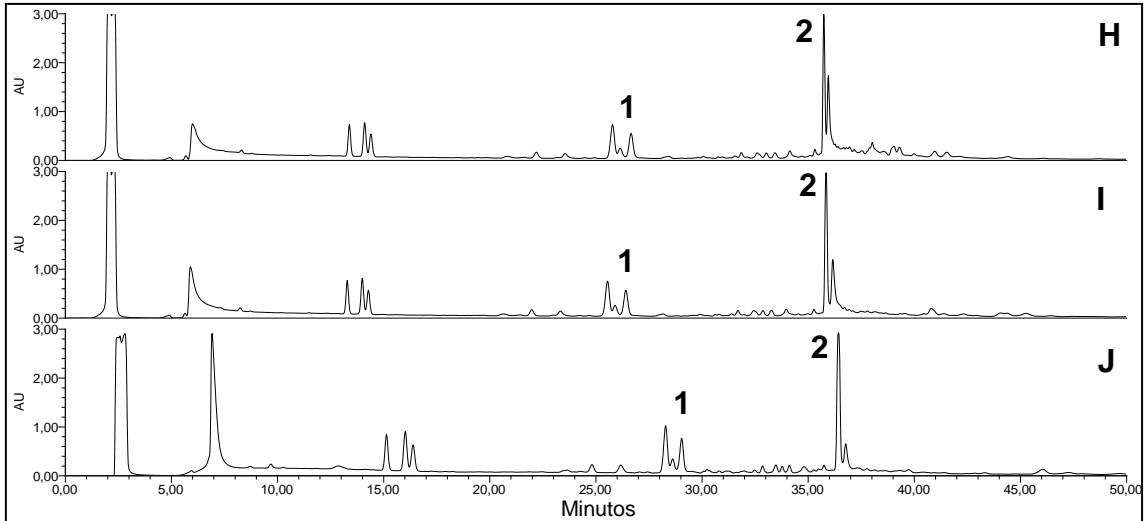


Figura 34 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as condições analíticas H, I e J. Para programas de eluição vide Tabela 8, item 4.10.3.3.1. (1) PTB e (2) PPI.

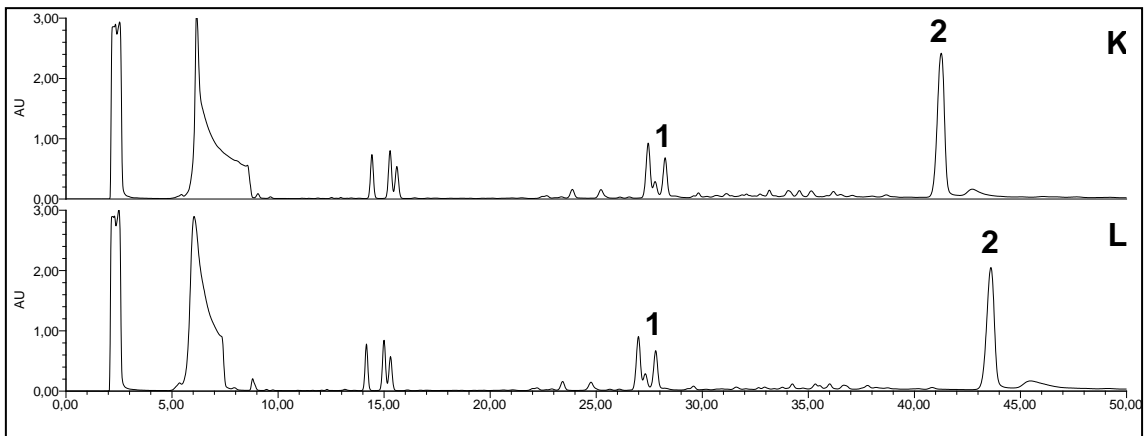


Figura 35 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as condições analíticas K e L. Para programas de eluição vide Tabela 8, item 4.10.3.3.1. (1) PTB e (2) PPI.

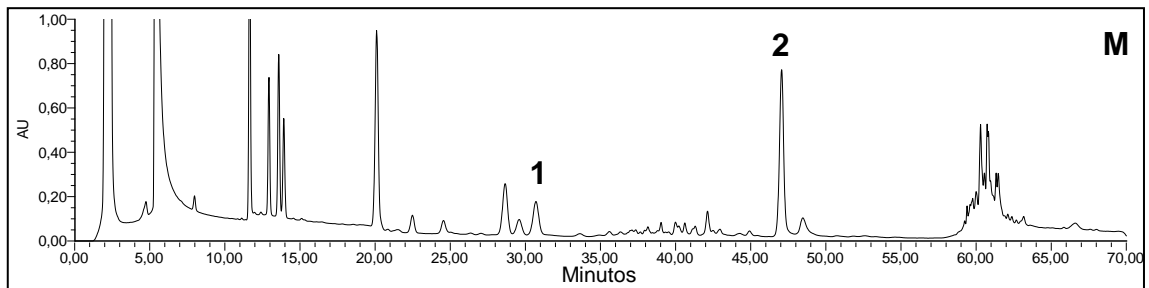


Figura 36 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD para a condição analítica estabelecida (M). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, Tabela 8, item 4.10.3.3.1. (1) PTB e (2) PPI.

A condição cromatográfica estabelecida incluiu uma etapa final para limpeza da coluna, na qual a proporção dos modificadores orgânicos atingiu 95%, e, após esse

período, um gradiente inverso para retorno à condição inicial de eluição, seguida de reequilíbrio por 15 minutos anteriormente à injeção subsequente.

5.4.3.3.2 Otimização das condições da reação de tosilação

A influência de diferentes parâmetros reacionais na recuperação de PTB e PPI foi avaliada, incluindo temperatura, tempo de reação, quantidade de cloreto de *p*-toluenossulfonila (TsCl) e volume de piridina. Também foi avaliada a eficiência de extração dos produtos de interesse (PTB e PPI) pela ACN ao final da reação.

Os ensaios foram conduzidos variando-se os parâmetros supracitados e descritos na **Tabela 9**, totalizando 13 diferentes condições reacionais (Parte Experimental, item 4.10.3.3.2). O teor de bornesitol foi calculado em cada condição avaliada a partir da relação de áreas PTB/PPI e considerando a relação de áreas obtida pela solução de referência (item 4.10.4.2.2). Os resultados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$) e as médias dos teores de cada condição foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados mostraram que tempos de reação superiores a 2 h não resultam em maior teor de PTB, bem como volumes de piridina superiores a 50 μL (condições CR1, CR2, CR3, CR4 e CR5; **Tabela 9**; **Figura 37**). Dessa forma, o tempo de três horas foi definido para reação e o volume de piridina anidra de 50 μL .

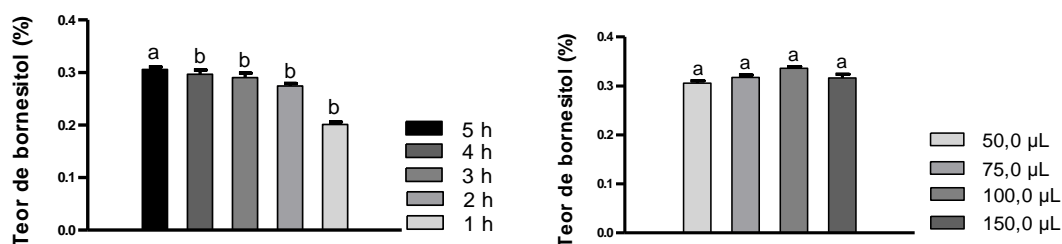


Figura 37 - Efeito do tempo de reação e volume de piridina no teor de bornesitol pertosilado (PTB), expresso como a média da relação de áreas entre PTB e o produto de tosilação do P.I. (PPI) \pm D.P. ($n=3$). As condições avaliadas estão sumarizadas na Parte Experimental, Tabela 9, item 4.10.3.3.2.

Foram avaliadas três diferentes massas de TsCl na reação de derivatização. O emprego de 25 mg do reagente resultou em teor inferior ao observado quando se utilizou 50 mg de TsCl (condições CR3, CR9; **Tabela 9**; **Figura 38**). Esta condição

não diferiu estatisticamente daquela obtida com 75 mg do reagente (CR10; **Tabela 9**). Portanto, 50 mg de TsCl foi definido para o método.

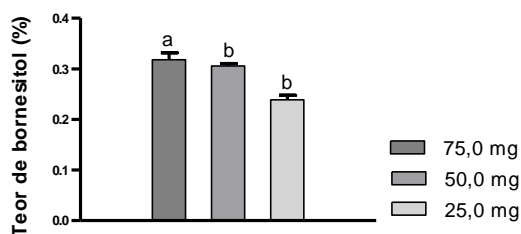


Figura 38 - Efeito da massa de TsCl no teor de bornesitol pertosilado (PTB), expresso como média da relação de áreas PTB/PPI \pm D.P. ($n=3$). As condições avaliadas estão sumarizadas na Parte Experimental, Tabela 9, item 4.10.3.3.2.

As temperaturas analisadas (50 °C e 60 °C) para o desenvolvimento da reação não diferiram estatisticamente em termos dos teores de bornesitol obtidos (condições CR3 e CR13; **Tabela 9**; **Figura 39**). A menor temperatura (50°C) foi definida para a reação, a fim de prevenir a evaporação da piridina.

Avaliou-se a extração de PTB e PPI ao fim da reação de derivatização empregando-se diferentes volumes de ACN. O volume de 2,0 mL foi estabelecido para o método, visto que volumes inferiores resultaram em menores teores de PTB (condições CR3, CR 11 e CR12; **Tabela 9**; **Figura 39**).

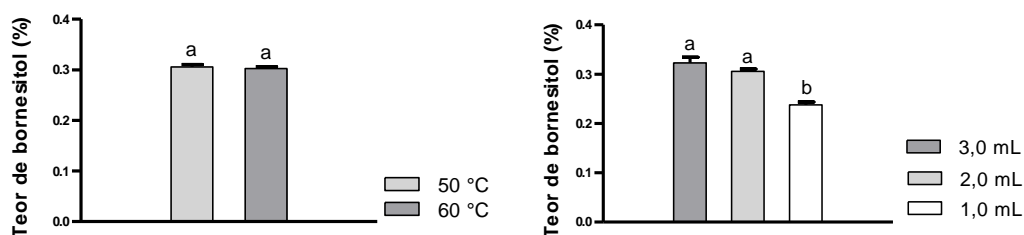


Figura 39 - Efeito dos parâmetros temperatura e volume de ACN no teor de PTB, expresso como média da relação de áreas entre PTB/PPI \pm D.P. ($n=3$). As condições avaliadas estão sumarizadas na Parte Experimental, Tabela 9, item 4.10.3.3.2. Para cada condição, colunas com diferentes letras são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Com base nesses resultados, foi possível estabelecer as condições reacionais para a derivatização: 50,0 μ L de piridina, 50,0 mg de TsCl, por 3 h em agitador automático (800 rpm) com controle de temperatura a 50 °C; após esse período, o volume final foi aferido para 2,0 mL com ACN grau CLAE.

5.4.3.4 Validação do método analítico para quantificação de bornesitol em *H. speciosa*

5.4.3.4.1 Seletividade

A seletividade da condição cromatográfica estabelecida (item 4.10.4.1) foi avaliada para a solução reacional obtida conforme condição reacional otimizada (item 4.10.4.2). Na **Figura 40** é ilustrado o ensaio de seletividade realizado para os picos de interesse, empregando-se a extração do espectro na região do UV em diferentes regiões de ambos os picos. A seletividade do método foi inicialmente avaliada pela homogeneidade espectral dos picos de PTB e PPI. No entanto, conforme já ressaltado, esta análise tem validade limitada, visto que outros produtos tosilados na matriz apresentam máximos de absorção bastante semelhantes.

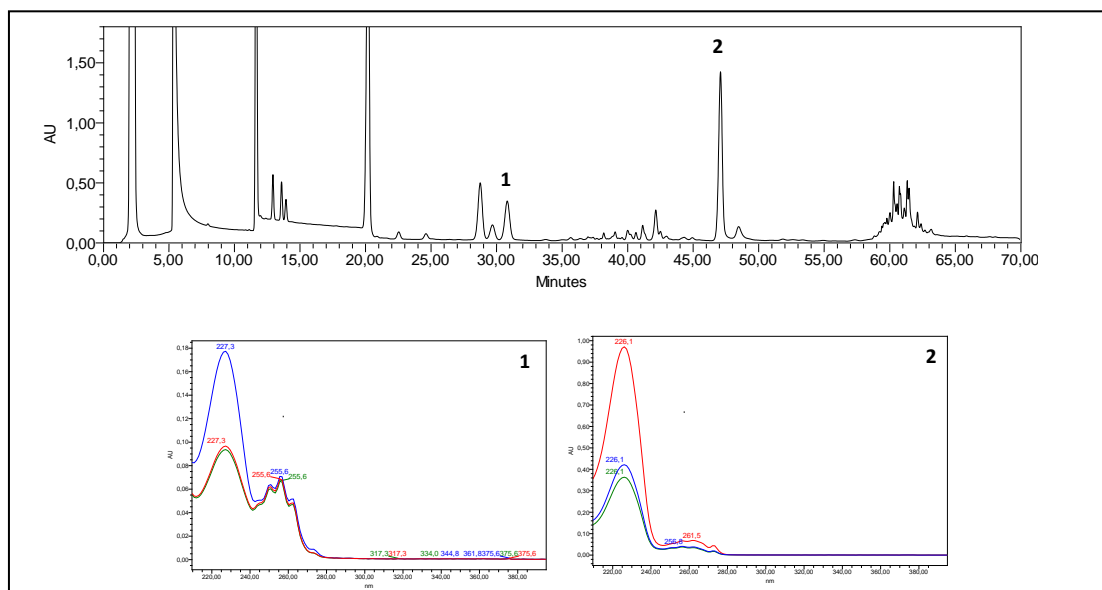


Figura 40 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD para o extrato MFA de *H. speciosa* após reação de derivatização. Condição cromatográfica: vide Parte Experimental, item 4.10.4.1. Detecção em 230 nm. Picos: 1, PTB; 2, PPI. Os espectros no UV foram obtidos *on-line* pelo detector DAD nas regiões apical, ascendente e descendente dos picos.

A fim de avaliar melhor a seletividade do método, foram obtidas soluções reacionais empregando-se: a) apenas o P.I.; b) apenas o extrato MFA de *H. speciosa* e c) apenas os reagentes de derivatização (cloreto de *p*-toluenossulfonila e piridina). Avaliou-se, também, o extrato MFA sem prévia derivatização, nas mesmas condições cromatográficas. O método foi seletivo para os picos de PTB e PPI em

todas as soluções descritas. Na **Figura 41** estão representados os cromatogramas obtidos, sendo possível verificar a ausência de picos com tempos de retenção próximos a PTB (32 min) e PPI (47 min).

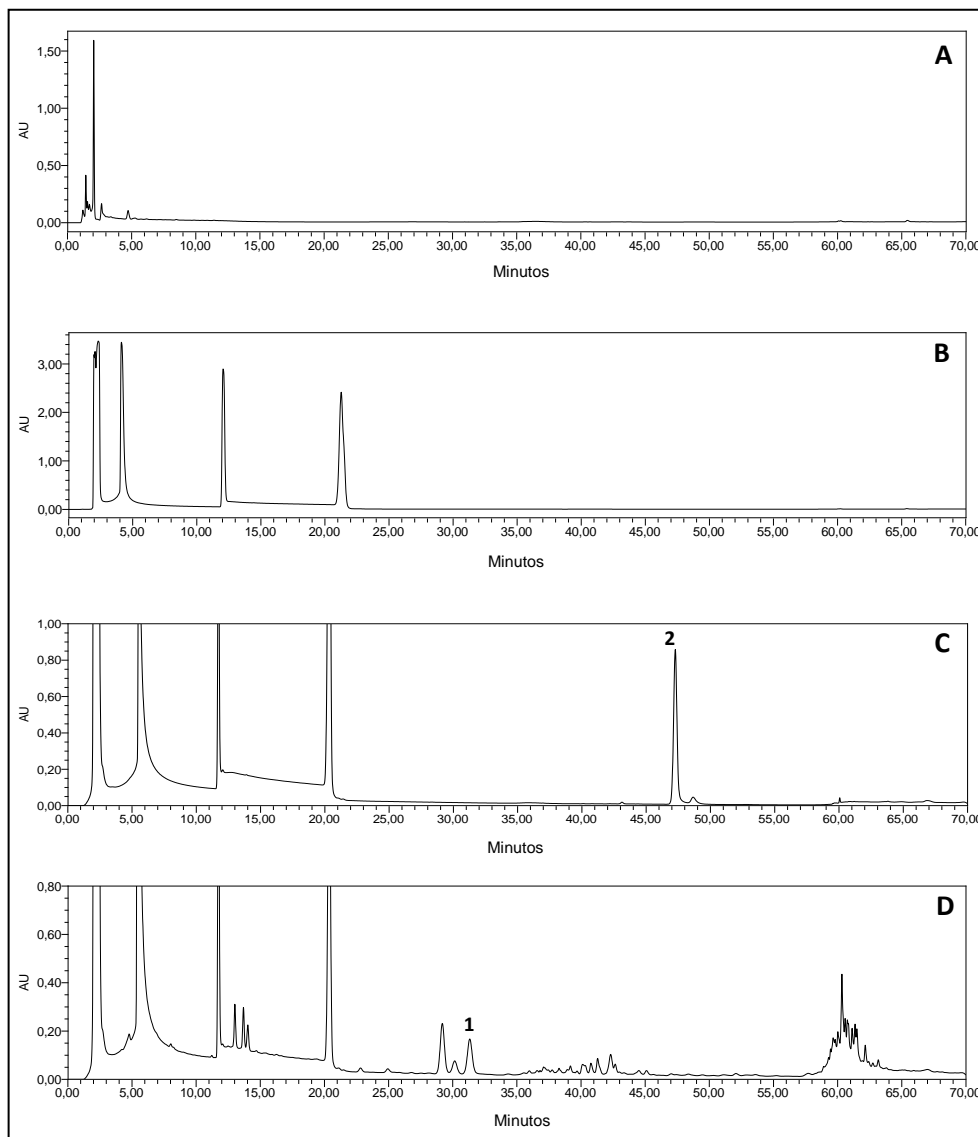


Figura 41 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD nos ensaios para avaliar a seletividade do método. a) Extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* MFA sem prévia derivatização; b) piridina anidra e cloreto de *p*-toluenossulfonila; c) reação de derivatização contendo apenas o P.I.; d) reação de derivatização contendo apenas o extrato MFA. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.10.4.1. Detecção em 230 nm Picos: 1, PTB; 2, PPI.

5.4.3.4.2 Teste de adequabilidade do sistema

Para avaliar a confiabilidade dos resultados obtidos na condição cromatográfica estabelecida, testes de adequação do sistema foram realizados, analisando-se os

parâmetros: resolução, fator de cauda, número de pratos teóricos, fator de retenção e repetibilidade da resposta dos picos, avaliada pelo DPR do tempo de retenção de seis determinações para cada pico de interesse.

Os resultados dos testes de adequação do sistema (**Tabela 27**) estão de acordo com as recomendações do FDA, com exceção da resolução de PTB (FDA, 2000). No entanto, conforme discutido anteriormente, valores de resolução inferiores a 2,0 são aceitos para testes de adequação do sistema em matrizes biológicas e análise de traços (DONG *et al.*, 2001).

Tabela 27 - Parâmetros de adequação do sistema determinados para os picos PTB e PPI no extrato MFA de *H. speciosa*, empregando a condição cromatográfica estabelecida*.

Parâmetros	R_s	T	N	k	RT	RSD (RT, n = 6)
Produtos						
PTB	1,72	1,03	31.786	23,52	30,87	0,20
PPI	4,76	1,04	146.357	36,50	47,21	0,08
Valores recomendados pelo FDA (FDA, 2000)	$R_s > 2$ $R_s > 1.5$	$T \leq 2$	$N > 2.000$	$k > 2.0$	-	RSD $\leq 1\%$. para $n \geq 5$

***Condição cromatográfica:** vide Parte Experimental 4.10.4.1.

**DONG *et al.*, 2001

5.4.3.4.3 Linearidade

A partir de ensaios preliminares com extratos de *H. speciosa* de diferentes origens, foi proposta uma faixa de concentração ampla, no intervalo de 0,06-0,3 mg/mL, para contemplar as possíveis variações no teor de bornesitol das amostras a serem analisadas.

Duas curvas analíticas foram construídas em dois dias consecutivos. A **Tabela 28** apresenta as massas de bornesitol injetadas e suas respectivas áreas e valores de desvio padrão relativo, para os dois dias de análise. Uma mesma solução de bornesitol e padrão interno, em piridina, foi utilizada para a construção das curvas.

Ambas as curvas analíticas apresentaram relação linear entre a massa injetada de bornesitol (μg) *versus* a relação de áreas dos picos correspondentes a PTB/PPI, sendo obtidos coeficientes de determinação (r^2) com valores superiores a 0,99. Os

dados da análise de regressão linear, dos dois dias de análise, e a curva analítica obtida pela média das duas curvas são apresentados na **Figura 41 e Tabela 29**.

Tabela 28 - Massa injetada, áreas médias de PTB e PPI ($n = 3$) e valores de desvio padrão relativo (DPR) obtidos para as curvas analíticas, nos dois dias de análise.

Volume injetado (μL)	Massa injetada (μg)	Dia 1		Dia 2	
		Área média	DPR (%)	Área média	DPR (%)
BORNESITOL					
Solução de referência (6,04 mg/mL)					
20,0	0,60	1472724	1,16	1276766	0,12
20,0	1,21	3099000	0,49	3198547	1,19
20,0	1,81	4726709	0,21	4727675	0,74
20,0	2,42	6356349	0,27	6292482	0,15
20,0	3,02	8195922	0,35	8113461	2,08
PADRÃO INTERNO					
Solução de referência (2,04 mg/mL)					
20,0	1,00	13496589	2,08	14844665	1,25
20,0	1,00	14836020	0,68	15454445	2,23
20,0	1,00	15416255	0,49	15293369	4,53
20,0	1,00	16115727	0,40	15482279	0,70
20,0	1,00	16737835	0,38	16706828	0,63

As curvas obtidas nos dois dias consecutivos não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). Portanto, dentro da faixa de concentração estudada para o analito, o método apresentou linearidade adequada.

Tabela 29 - Resultados da regressão linear para as curvas analíticas de bornesitol, em dois dias consecutivos de análise.

Parâmetros estatísticos	Bornesitol	
	Dia 1	Dia 2
Faixa linear ($\mu\text{g/ml}$)	60.4-302.0	
Coefficiente de determinação (r^2)	0,9998	0,9942
DPR da curva (%)	0,80	4,64
Inclinação	0,1567	0,1653
Erro padrão da inclinação ($\times 10^{-2}$)	0,1265	0,7262
Intercepto ($\times 10^{-1}$)	0,1696	-0,0067
Erro padrão do intercepto ($\times 10^{-2}$)	0,2534	1,4550

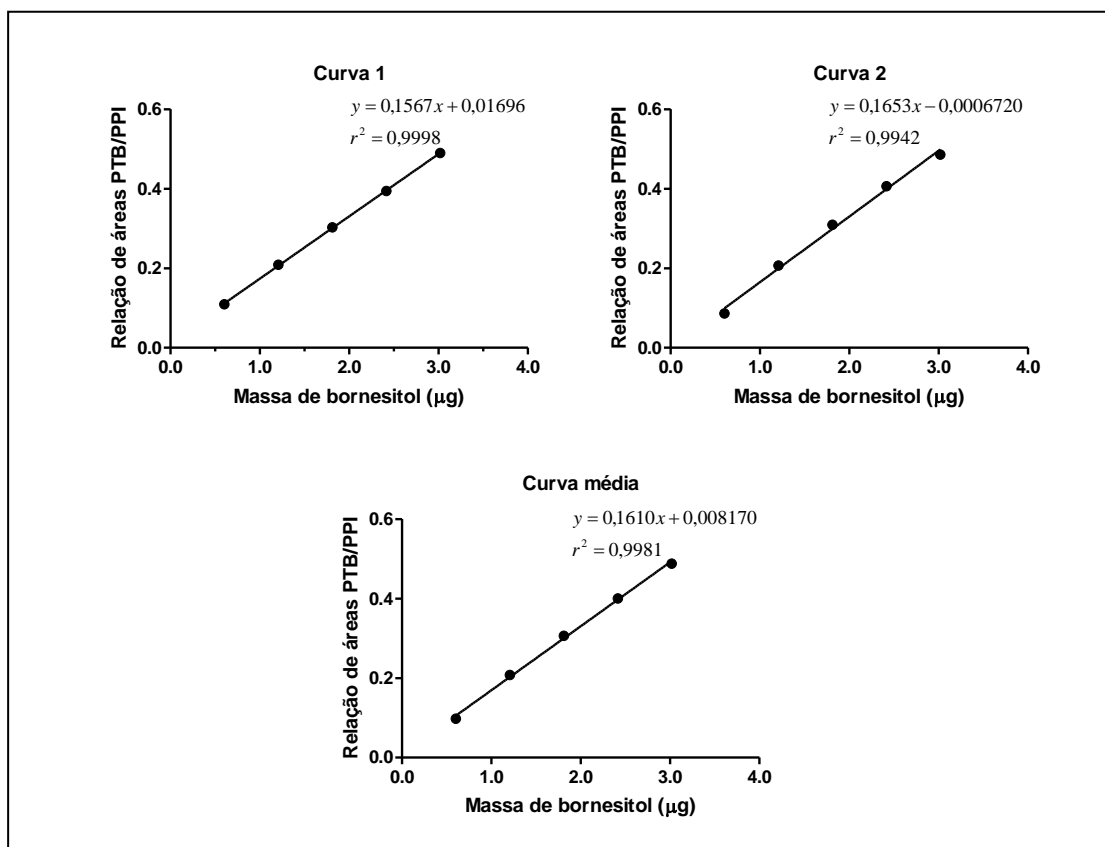


Figura 42 - Curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD em dois dias de análise e curva média resultante para a quantificação de bornesitol em *H. speciosa*.

5.4.3.4.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação do analito foi inicialmente calculado empregando-se a equação que considera os parâmetros das curvas analíticas (**Tabela 30**).

Tabela 30 - Limites de quantificação (LQ) do bornesitol calculados pela equação de regressão e determinados experimentalmente.

Forma de determinação	LQ (µg/mL)
Curva analítica média*	52,1
LQ experimental**	5,0

* Calculado pelos parâmetros das curvas analíticas obtidas em dois dias de análise, conforme item 4.9.6.6.

** DPR < 3,00 % (SNYDER et al., 1997)

Posteriormente, o limite de quantificação foi determinado pela injeção, em quintuplicata, de soluções reacionais obtidas pela reação de massas decrescentes de bornesitol (40,0 a 10,0 µg), sendo o valor obtido relatado na **Tabela 30**.

5.4.3.4.5 Limite de detecção

LD foi inicialmente calculado a partir dos dados da curva analítica (**Tabela 31**). Para a determinação experimental foram realizadas injeções de soluções reacionais obtidas pela reação de massas decrescentes de bornesitol (10 a 0,05 µg), considerando-se a relação sinal/ruído > 3 (**Tabela 31**).

Tabela 31 - Limite de detecção (LD) para o método de quantificação de bornesitol em *H. speciosa* calculado pela equação de regressão linear e determinado experimentalmente pela razão sinal/ruído.

Forma de determinação	LD (µg/mL)
Curva analítica média*	17,2
LD experimental**	1,67

*Calculado pelos parâmetros das curvas analíticas obtidas em dois dias de análise, conforme item 4.9.6.7.

**Relação S/N > 3.

5.4.3.4.6 Estabilidade dos produtos tosilados PTB e PPI

A estabilidade do analito pertosilado (PTB) e do padrão interno pertosilado (PPI) foi avaliada à temperatura ambiente (23 ± 2 °C), em diferentes intervalos de tempo (0, 12, 24, 36 e 48 h). Os teores médios de bornesitol calculados para cada intervalo avaliado não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (análise de variância e teste de Tukey; $p > 0,05$) (**Figura 43**).

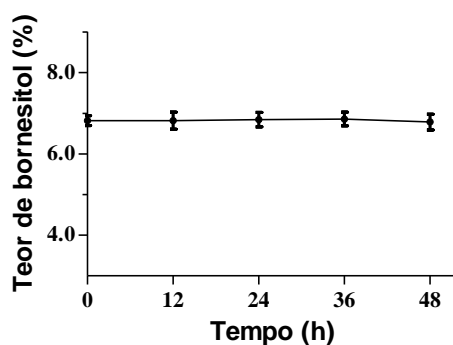


Figura 43 - Teores médios ($n = 6$) de bornesitol em estudo de estabilidade dos produtos de tosilação do analito (PTB) e do padrão interno (PPI) nas soluções reacionais obtidas para o extrato MFA de *H. speciosa*, mantidos à temperatura ambiente (23 ± 2 °C). Os dados são expressos como teor médio de seis determinações ($n = 6$). As médias dos teores de bornesitol entre os períodos analisados não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.4.3.4.7 Precisão

5.4.3.4.7.1 Precisão intradia

A partir dos teores de bornesitol obtidos para as seis soluções reacionais preparadas com o extrato MFA de *H. speciosa*, calculou-se o desvio padrão relativo e determinou-se a precisão intradia, cujos dados são apresentados na **Tabela 32**.

Segundo critérios da ANVISA (BRASIL, 2003), valores de DPR menores que 5,00 % indicam que o método apresenta precisão intradia adequada.

Tabela 32 - Teores percentuais de bornesitol no extrato MFA de *H. speciosa* e valores de DPR utilizados para a determinação da precisão intradia do método.

Amostra	Teor de bornesitol (%)
1	7,14
2	6,96
3	6,87
4	6,76
5	6,68
6	6,85
Teor médio (%)	6,88
DPR (%)	2,37

5.4.3.4.7.2 Precisão interdia

A precisão interdia foi avaliada por meio de seis determinações dos teores de bornesitol no extrato selecionado de *H. speciosa* (MFA), em dois dias consecutivos, com analistas diferentes ($n = 12$). O desvio padrão relativo dos teores também foi calculado e os valores obtidos estão dispostos na **Tabela 33**.

Os valores de desvio padrão relativo abaixo de 5,00% indicam que o método desenvolvido apresenta precisão interdia adequada, segundo critérios da ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 33 - Teores percentuais de bornesitol no extrato MFA de *H. speciosa* e valores de DPR utilizados para determinação da precisão interdia do método.

Dia	Amostra	Teor bornesitol (%)
1	1	7,14
	2	6,96
	3	6,87
	4	6,76
	5	6,68
	6	6,85
2	1	6,84
	2	6,61
	3	7,04
	4	7,36
	5	6,76
	6	7,14
Teor médio (%)		6,92
DPR (%)		3,17

Os teores de bornesitol não diferiram entre o primeiro e o segundo dias de análises pelo teste *t* de Student ($p > 0,05$).

5.4.3.4.8 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir de testes de recuperação com amostras fortificadas do extrato MFA, contendo massas conhecidas de bornesitol. Na **Erro!**

Fonte de referência não encontrada. estão apresentados os resultados para o ensaio, em cada um dos três níveis de concentração.

Tabela 34 – Valores obtidos para o ensaio de recuperação de bornesitol no extrato MFA de *H. speciosa* (média, $n = 3$).

Nível de fortificação	Massa na droga vegetal (μg)	Massa fortificada (μg)	Massa teórica (μg)	Massa experimental (μg)	DPR (%)	Recuperação (%)
1	0,75	0,4	1,15	1,14	2,50	99,13
2	0,75	1,2	1,95	1,80	1,08	92,31
3	0,75	2,0	2,75	2,58	3,94	93,82

A recuperação do analito se deu na faixa de 92,31 a 99,13%. Estes valores atendem aos preconizados pela AOAC (2002), considerando-se um teor de bornesitol de 1 a 10% para *H. speciosa*, que implicariam em recuperação do analito de 92 a 105%.

5.4.3.4.9 Robustez

A robustez do método foi avaliada a partir de análises comparativas de soluções reacionais provenientes do extrato MFA obtidas e quantificadas nas condições analíticas estabelecidas e com alterações deliberadas nesta, como temperatura da coluna (38 e 42 °C), lote da coluna e fluxo da fase móvel (0,9 e 1,1 mL/min).

A **Figura 44** apresenta graficamente os resultados obtidos no estudo de robustez do método para quantificação de bornesitol.

Os resultados da análise de variância e do teste de Tukey indicaram não haver diferenças estatísticas entre as médias obtidas pela quantificação do analito nas diferentes condições cromatográficas avaliadas ($p > 0,05$). Esses dados indicam que o método desenvolvido é robusto frente a pequenas alterações das condições cromatográficas estabelecidas, sem comprometer a confiabilidade dos resultados.

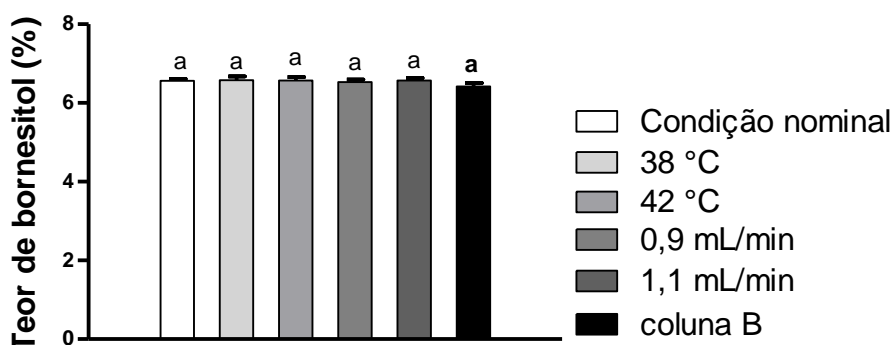


Figura 44 - Influência do fluxo, lote de coluna e temperatura no teor de bornesitol em *H. speciosa* (média, $n = 6$). As médias identificadas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.5 Avaliação da composição química de diferentes acessos de *Hancornia speciosa*

O desenvolvimento de um fitoterápico apresenta como um dos maiores desafios a variabilidade química da droga vegetal resultante de variações edafoclimáticas e genéticas, técnicas de cultivo, dentre outras, o que frequentemente afeta a atividade biológica do produto final. Assim, materiais vegetais provenientes de diferentes acessos da espécie devem ser avaliados a fim de estabelecer critérios para padronização da droga vegetal em termos dos teores de seus constituintes.

Um total de oito acessos de *H. speciosa* foi cedido pela Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA-Pb), João Pessoa, oriundos de plantas com bases genéticas distintas, cultivadas na estação experimental daquela empresa (item 4.5). Foram obtidos extratos etanólicos dos materiais vegetais por percolação exaustiva e os resultados dos rendimentos extrativos constam da **Tabela 35**.

Os teores de flavonoides totais, ácido clorogênico, bornesitol, rutina e FlavHS foram quantificados nos extratos obtidos empregando-se os métodos desenvolvidos e validados neste trabalho (**Tabela 36**). Adicionalmente, foram registrados perfis cromatográficos por CLAE-DAD para cada extrato (**Figura 45**), utilizando as condições cromatográficas descritas no item 4.9.6.1 da Parte Experimental.

Tabela 35 - Rendimentos extrativos (%) para extratos de folhas de *H. speciosa* provenientes de diferentes acessos da espécie.

<i>H. speciosa</i> (código acesso)	Massa folhas (g)	Massa extrato (g)	Extrativos (%)
SPA	100,0	32,45	32,45
CFOF	30,0	10,71	35,70
ASM	27,8	7,24	26,04
EMSA	30,0	9,08	30,27
JSA	30,0	9,74	32,39
MFA	25,9	9,05	34,94
MBN	30,0	7,81	26,03
RVB	30,0	9,51	31,68
Média (%)			28,07

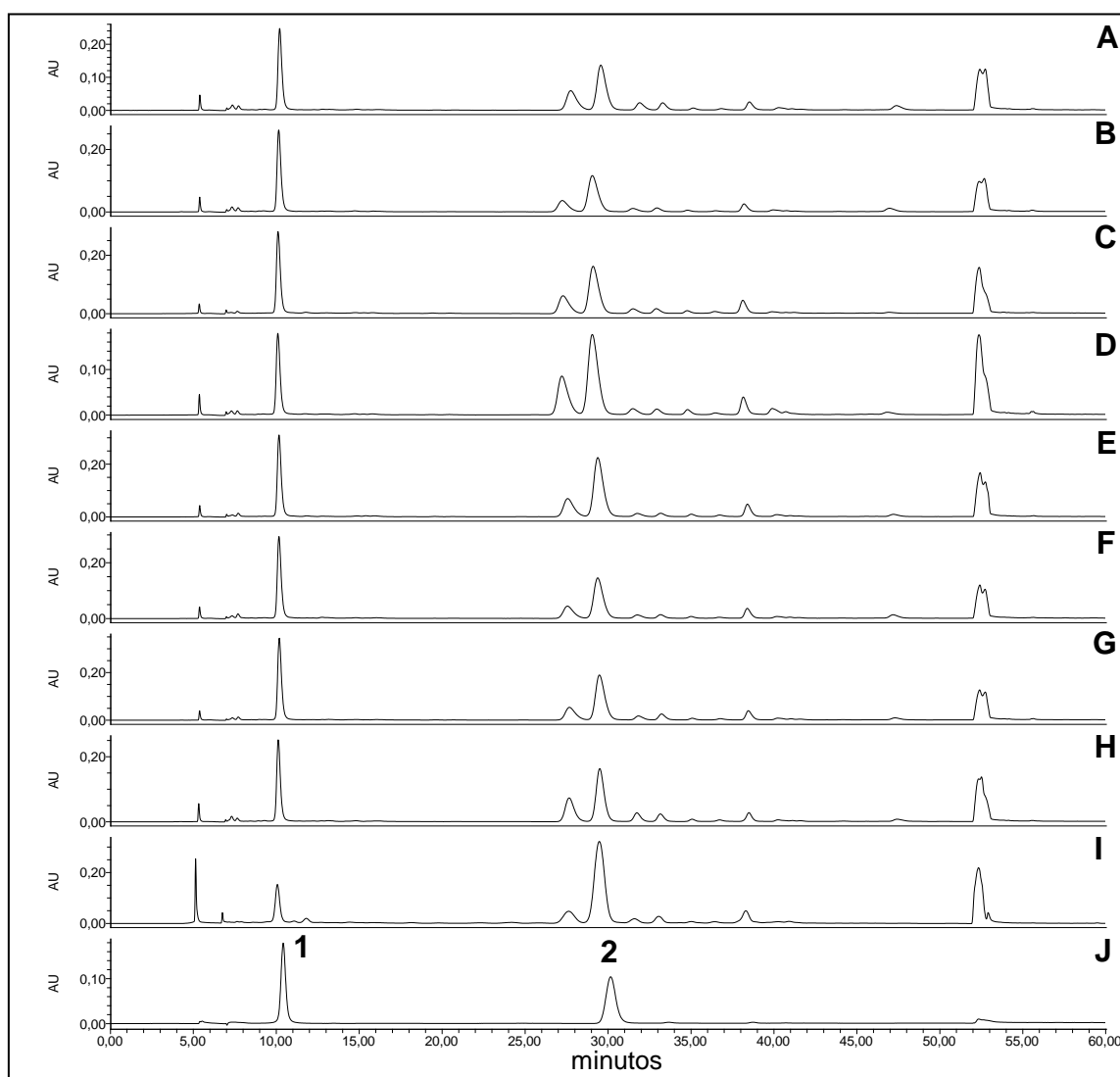


Figura 45 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR para os extratos etanólicos de folhas de *H. speciosa* e para substâncias de referência. A – JSA; B – RVB; C – MBN; D – SPA; E – ASM; F – CFOF; G – EMSA; H – MFA; I – HFET; J – Substâncias de referência: ácido clorogênico (1) e rutina (2). Para condições cromatográficas, vide Parte experimental, item 4.9.6.1. Detecção em 210 nm.

Os dados da **Tabela 35** indicam um rendimento extrativo médio em torno de 28%, estando os valores compreendidos na faixa de aproximadamente 26-36%.

Tabela 36 – Teores de marcadores químicos em extratos etanólicos de folhas de *H. speciosa* provenientes de oito acessos da espécie fornecidos pela EMEPA-Pb.

<i>H. speciosa</i> (acessos)	Flavonoides totais (% m/m ± D.P.)	Teor de bornesitol (% m/m ± D.P.)	Teor de rutina (% m/m ± D.P.)	Teor de ácido clorogênico (% m/m ± D.P.)	Teor de FlavHS (% m/m ± D.P.)
SPA	4,76 ± 0,09 ^a	6,85 ± 0,17 ^c	1,71 ± 0,01 ^b	0,80 ± 0,01 ^e	0,84 ± 0,004 ^a
MFA	4,17 ± 0,06 ^{c,d}	6,88 ± 0,16 ^c	1,24 ± 0,02 ^e	1,15 ± 0,01 ^d	0,63 ± 0,01 ^{b,c}
CFOF	3,35 ± 0,10 ^e	6,69 ± 0,05 ^c	1,29 ± 0,01 ^e	1,33 ± 0,02 ^b	0,42 ± 0,004 ^f
MBN	4,31 ± 0,15 ^{b,c}	8,75 ± 0,10 ^a	1,54 ± 0,03 ^d	1,25 ± 0,02 ^c	0,61 ± 0,01 ^c
EMSA	4,45 ± 0,06 ^b	8,10 ± 0,05 ^b	1,61 ± 0,03 ^c	1,52 ± 0,02 ^a	0,48 ± 0,01 ^e
ASM	4,84 ± 0,12 ^a	8,78 ± 0,14 ^a	2,00 ± 0,03 ^a	1,33 ± 0,06 ^b	0,64 ± 0,01 ^b
RVB	1,83 ± 0,09 ^f	5,35 ± 0,24 ^e	1,05 ± 0,004 ^g	1,14 ± 0,03 ^d	0,32 ± 0,001 ^g
JSA	3,95 ± 0,14 ^d	5,77 ± 0,09 ^d	1,16 ± 0,02 ^f	1,12 ± 0,02 ^d	0,55 ± 0,01 ^d
Média dos teores (% ± D.P.)	3,96 ± 0,98	7,31 ± 1,09	1,45 ± 0,32	1,21 ± 0,21	0,56 ± 0,16

As médias identificadas com a mesma letra, para colunas do mesmo marcador químico, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Na **Figura 45** estão representados os perfis cromatográficos obtidos para os extratos etanólicos dos oito acessos da espécie, provenientes da EMEPA-Pb, e para o extrato de *H. speciosa* obtido por Endringer (2007) (HFET, vide item 4.5.2), bem como para rutina e ácido clorogênico, utilizando as condições cromatográficas descritas no item 4.9.6.1.

A análise dos perfis cromatográficos obtidos indica grande semelhança na composição qualitativa dos extratos preparados com materiais vegetais de diferentes acessos de *H. speciosa*. Esses acessos correspondem a exemplares com bases genéticas distintas e aparentemente esta diversidade não se reflete na impressão digital química registrada nos cromatogramas. Destaca-se, também, a grande semelhança entre os perfis cromatográficos das plantas provenientes do EMEPA-Pb com aquele do extrato etanólico preparado por Endringer (2007) a partir de espécimes nativos de *H. speciosa*. Este extrato foi utilizado por nosso grupo de

pesquisa para o estudo fitoquímico e de atividades biológicas da espécie e a semelhança nos perfis cromatográficos sugere não haver diferenças marcantes na composição química de plantas nativas e cultivadas de *H. speciosa*, com bases genéticas distintas, o que é de especial relevância no caso da produção industrial futura de um fitoterápico.

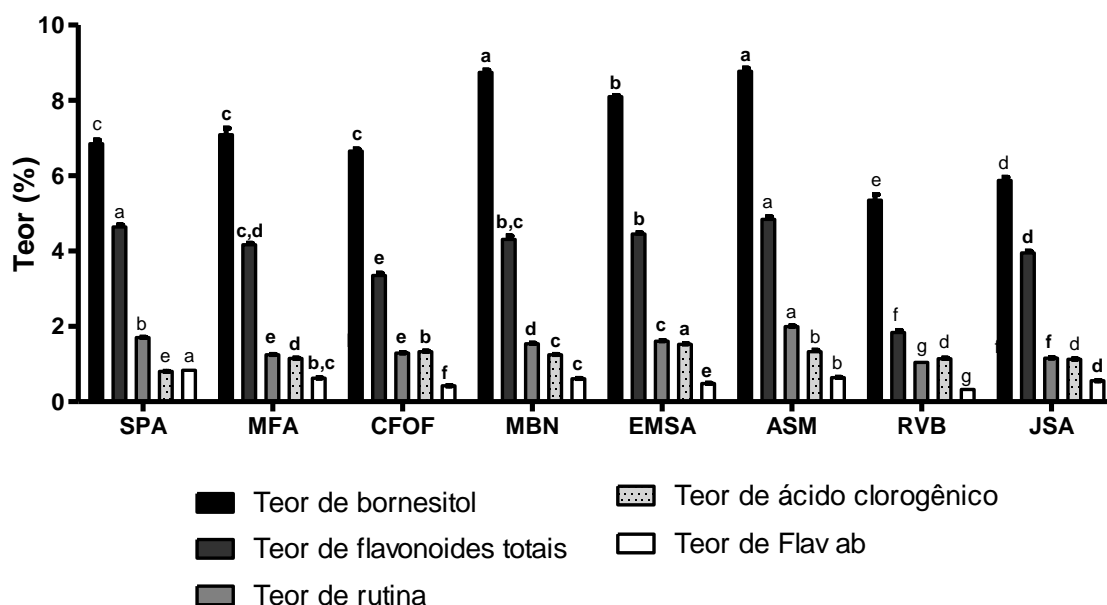


Figura 46 - Teores de marcadores químicos em extratos etanólicos de folhas de *H. speciosa* (média \pm d.p., $n = 3$), provenientes de acessos distintos da espécie, cultivadas no EMEPA-PB. As médias identificadas com a mesma letra, para colunas do mesmo marcador químico, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A análise dos teores dos marcadores químicos da espécie evidencia que, apesar da semelhança qualitativa indicada pelos perfis cromatográficos por CLAE-DAD, existem diferenças marcantes na composição quantitativa dos extratos avaliados. Os teores de bornesitol variaram entre $5,77 \pm 0,09\%$ a $8,78 \pm 0,14\%$, os de rutina entre $1,05 \pm 0,004\%$ a $2,00 \pm 0,03\%$, os de flavonoides totais entre $1,83 \pm 0,09\%$ a $4,84 \pm 0,12\%$, os de ácido clorogênico de $0,80 \pm 0,01\%$ a $1,52 \pm 0,02\%$ e os de Flavanol entre $0,32 \pm 0,001\%$ a $0,84 \pm 0,004\%$. Observa-se, pela análise gráfica dos teores dos marcadores químicos (**Figura 46**) que, com exceção dos extratos SPA e ASM, os teores de ácido clorogênico e rutina apresentam uma relação próxima a 1:1. Além disso, para a maioria dos extratos, os teores de bornesitol e flavonoides totais possuem uma relação aproximada de 2:1. Em todos os extratos o teor de bornesitol foi o mais elevado, seguido de flavonoides totais. Os marcadores químicos quantificados representam aproximadamente 15% m/m da composição dos extratos.

Cabe ressaltar que a composição química quantitativa de folhas de *H. speciosa* é descrita pela primeira vez no presente trabalho. Apesar do uso etnomédico da espécie, e do amplo consumo de seus frutos com finalidades alimentícias, os teores dos principais constituintes eram desconhecidos.

Futuramente, os teores de marcadores químicos de *H. speciosa* deverão ser avaliados em conjunto com dados de atividade biológica de cada extrato, objetivando-se investigar o efeito da composição química quantitativa na atividade anti-hipertensiva da espécie. Estes resultados fornecerão subsídios para a padronização químico-biológica de *H. speciosa*.

6 CONCLUSÕES

- 1) O método para quantificação de flavonoides totais em matrizes de *H. speciosa* por espectrofotometria no UV-Vis foi validado e apresentou linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez adequadas.
- 2) Foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE-DAD para quantificação simultânea de ácido clorogênico, rutina e FlavHS em matrizes de *H. speciosa*. O método apresentou linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez adequadas.
- 3) Foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE-DAD empregando derivatização prévia da amostra com cloreto de *p*-toluenossulfonila e pentaeritritol como padrão interno para quantificação de bornesitol em matrizes de *H. speciosa*. O método apresentou linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez adequadas.
- 4) Extratos etanólicos preparados com materiais vegetais de oito acessos de *H. speciosa* apresentaram impressões digitais químicas semelhantes, sugerindo não haver diferenças marcantes na composição qualitativa de espécimes com bases genéticas distintas.
- 5) Um flavonoide presente em extratos de *H. speciosa* foi identificado como um triglicosídeo da quercetina, constituído por uma hexose e duas ramnosos.
- 6) A composição química quantitativa de extratos de *H. speciosa*, preparados com drogas vegetais provenientes de acessos distintos, apresentou diferenças marcantes nos teores dos marcadores químicos. Bornesitol foi o constituinte majoritário, seguido de flavonoides totais, rutina e ácido clorogênico, que apresentaram teores semelhantes, e, por fim, do triglicosídeo da quercetina, que apresentou o menor teor dentre os marcadores quantificados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTIS-GORETTA, L.; OTTAVIANI, J.I.; FRAGA, C.G. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.229-234, 2006.
- AL-MAGHREBI, M.; BENTER, I.F.; DIZ, D.I. Endogenous angiotensin-(1-7) reduces cardiac ischemia-induced dysfunction in diabetic hypertensive rats. *Pharmacological Research*, v.59, p.263-268, 2008.
- ALMEIDA, E.R. *Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos*. Hemus, 1993. 341p.
- ANSELM, E.; SOCORRO, V.F.M.; DAL-ROS, S.; SCHOTT, C.; BRONNER, C.; SCHINI-KERTH, V.B. Crataegus special extract ws 1442 causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of endothelial NO synthase but not via activation of estrogen receptors. *Journal Cardiovascular Pharmacology*, v.53, p.253-260, 2009.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2002. <http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf> Acesso em: 05/12/2011
- BARBOSA-FILHO, J.M.; MARTINS, V.K.M.; RABELO, L.A.; MOURA, M.D.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; SOUZA, M.F.V.; ALMEIDA, R.N.; MEDEIROS, I.A. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980 – 2000. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, p.421-446, 2006.
- BARROS, I.M.C. *Contribuição ao estudo químico e biológico de Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae)*. Brasília: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, 2008. 194p.
- BASSO, L.A.; SILVA, L.H.P.; FETT-NETO, A.G.; JUNIOR, W.F.A.; MOREIRA, I.S.; PALMA, M.S.; CALIXTO, J.B.; FILHO, S.A.; SANTOS, R.R.; SOARES, M. B.P.E.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – A Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.100, p.575-606, 2005.
- BLUMENTHAL, M. *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide To Medicines*. Massachusetts/Austin: Integrative Medicine Communications/The American Botanical Council, 1998. 684p.
- BRAGA, F.C.; ENDRINGER, D.C.; SILVA, G.C.; CORTÊS, S.F. *Extrato e fração padronizados de folhas de Hancornia speciosa e sua composição farmacêutica*. Patente, n. PI0802004-3 A2, 2009.
- BRAGA, F.C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, A.B. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitions activity. *Phytomedicine*, v.7, n.3, p.245-250, 2000.
- BRASIL. Boletim Agropecuário - n.º 67 - p. 1-12 Lavras/MG GOVERNO DO BRASIL 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29.05.03. Determina a Publicação do “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. *Diário Oficial da União*, 02.06.03.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Avaliação do plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao diabetes melitus no Brasil / Ministério da saúde, Organização Pan-Americana da saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 64p.

CHAPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F. *Carbohydrate Analysis. A Practical Approach*. 2 Ed. Oxford: Oxford University Press, 1994. 324p.

CHAVÉZ-SERVÍN, J.L.; CASTELLOTE, A.I.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A*, v.1043, p.211-215, 2004.

CHEN, Z.Y.; ZHANG, Z.S.; KWAN, K.Y.; ZHU, M.; HO, W.K.K.; HUANG, Y. Endothelium-dependent relaxation induced by Hawthorn extract in rat mesenteric artery. *Life Sciences*, v.63, p.1983-1991, 1998.

CHOBANIAN, A.V.; BAKRIS, G.L.; BLACK, H.R.; CUSHMAN, W.C.; CREEN, L.A.; IZZO, J.L.; JONES, D.W.; MATERSON, B.J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J.T. Jr.; ROCELLA, E. J. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *JAMA*, v.289, n.19, p.2560-2572, 2003.

COSTA, E.S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; LIMA, E.O.; SUCUPIRA, G.C.; BERTOLIN, A.O.; LOLIS, S.F.; ANDRADE, F.D.P.; VILEGAS, W.E.; SOUZA-BRITO, A.R.M. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the cerrado, Brazil. *Phytotherapy Research*, v.22, p.705-707, 2008.

DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. *Methods in plant biochemistry*. Vol. 1. London: Academic Press Limited, 1989., 558p.

DONG, M.; PAUL, R.; GERSHANOV, L. Getting the peaks perfect: System Suitability for HPLC. *Today's chemist at work [on-line]*, v.10, n.9, p.38–40, 2001. Disponível em: <http://pubs.acs.org/subscribe/journals/tcaw/10/i09/html/09dong.html>. Acesso em: 02 dez 2011.

DUCHEK, J.; ADAMS, D.R.; HUDLICKY, T. Chemoenzymatic synthesis of inositols, conduritols, and cyclitol analogues. *Chemical Review*, v.111, p.4223-4258, 2011.

ENDRINGER, D.C. *Química e atividades biológicas de Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 260p.

ENDRINGER, D.C.; PEZZUTO, J.M.; BRAGA, F.C. NF- κ B inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. *Phytomedicine*, v.16, p.1064-1069, 2009.

FERREIRA, H.C.; SERRA, C.P.; ENDRINGER, D.C.; LEMOS, V.S.; BRAGA, F.C.; CORTES, S.F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. *Phytomedicine*, v.14, p.473-478, 2007a.

FERREIRA, H.C.; SERRA, C.P.; LEMOS, V.S.; BRAGA, F.C.; CORTES, S.F. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidylinositol-3-kinase. *Journal of Ethnopharmacology*, v.109, n.1, p.161-164, 2007b.

FERRERES, F.; PEREIRA, D.M.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; SOTTOMAYOR, M. New phenolic compounds and antioxidant potential of *catharanthus roseus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.9967-9974, 2008.

FERRERES, F.; SOUSA, C.; JUSTIN, M.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; LLORACH, R.; RODRIGUES, A.; SEABRA, R.M.; LEITÃO, A. Characterisation of the phenolic profile of *Boerhaavia diffusa* L. by HPLC-PAD-MS/MS as a tool for quality control. *Phytochemical Analysis*, v.16, p.451-458, 2005.

FLATTERY, M. Herbal therapies and cardiac side effects. *Prog Cardiovasc Nurs*, v.23, p.187-90, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for industry: analytical procedures and methods validation. 2000. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122858.pdf>> Acesso em: 05 dez 2011.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.1, p.171-178, 2006.

GARCIA E. F. *Quantificação de marcadores químicos e avaliação da atividade anti-inflamatória de Echinodorus grandiflorus (cham & schldt) Micheli (chapéu-de-couro)*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2011. 260p.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; BERG, C.D.V. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Megadiversidade*, v.1, 2005.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use - ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/96)*. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996.

JOUAD, H.; LACAILLE-DUBOIS, M.A.; LYOUSSI, B.; EDDOUKS, M. Effects of the flavonoids extracted from *Spergularia purpurea* Pers. on arterial blood pressure and renal function in normal and hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.76, p.159-163, 2001.

KAPLAN, N.M.; OPIE, L.H. Controversies in hypertension. *Lancet*, v.367, p.168-76, 2006.

KIM, S.H.; KANG, K.W.; KIM, K.W.; KIM, N.D. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sciences*, v.67, p.121-131, 2000.

KLEIN, A. Ação hipoglicemiante da *Hancornia* SP em diabetes induzido por aloxana. In: *SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL*, 14, Florianópolis. Resumos...Florianópolis: Universidade Federal do Paraná, p. 133, 1996 *apud* ENDRINGER, D. C. *Química e atividades biológicas de Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 260 p.

KOCYILDIZ, Z.C.; BIRMAN, H.; OLGA, V.; AKGUN-DAR, K.; MELIKOGLU, G.; MERICLI, A.H. *Crataegus tanacetifolia* Leaf Extract Prevents L-NAME-induced Hypertension in Rats: a Morphological Study. *Phytotherapy Research*, v.20, p.66-70, 2006.

KOZUMA, K.; TSUCHIYA, S.; KOHORI, J.; HASE, T.; TOKIMITSU, I. Antihypertensive Effect of Green Coffee Bean Extract on Mildly Hypertensive Subjects. *Hypertension Research*, v.28, n.9, p.711-718, 2005.

KREFT, S.; STRUKELJ, B.; GABERSCIK, A.; KREFT, I. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *Journal of Experimental Botany*, v.53, p.1801-1804, 2002.

LAMARI, F.N.; KUHN, R.; KARAMANOS, N.K. Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis *Journal of Chromatography B*, v.793, p.15-36, 2003.

LEITE, J.P.V. *Estudo fitoquímico de folhas de Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss e variação sazonal e intra-específica de polifenóis em populações nativas. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. 299p

LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T. *Screening* farmacológico de plantas medicinais utilizadas popularmente como antiinflamatória. In: *SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL*, 14, Florianópolis. Resumos...Florianópolis: Universidade Federal do Paraná, p.89, 1996 *apud* ENDRINGER, D. C. *Química e atividades biológicas de Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 260 p.

LOIZZO, M.R.; SAID, A.; TUNDIS, R.; RASHED, K.; STATTI, G.A.; HUFNER, A.; MENICHINI, F. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae). *Phytotherapy Research*, v.21, p.32-36, 2007.

LUENGAS-CAICEDO, P.E. *Contribuição para a padronização de extratos de folhas de Cecropia glaziovii* Sneathl.: estudos de variação sazonal e intra-específica de flavonoides e proantocianidinas, de metodologias de extração e de atividade vasorelaxante. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2005. 259p.

MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.L.G.; GALINDO, J.C.G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry*, v.68, p.2917-2936, 2007.

- MALMONGE, J.A.; CAMILLO, E.C.; MORENO, R.M.B.; MATTOSO, L.H.C.; MCMAHAN, C.M. Comparative study on the technological properties of latex and natural rubber from *Hancornia speciosa* Gomes and *Hevea brasiliensis*. *Journal of Applied Polymer Science*, v.111, p.2986-2991, 2009.
- MANCIA, G.; BACKER, G.; DOMINICZAK, A.; CIFKOVA, R.; FAGARD, R.; GERMANO, G.; GRASSI, G.; HEAGERTY, A.M.; KJELDSEN, S.E.; LAURENT, S.; NARKIEWICZ, K.; RUILOPE, L.; RYNKIEWICZ, A.; SCHMIEDER, R.E.; BOUDIER, H.A.J.S.; ZANCHETTI, A. Guidelines for the management of arterial hypertension. The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of Hypertension*, v.25, p.1105-1187, 2007.
- MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. *Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. Uso do Cloreto de Alumínio na Quantificação de Flavonoides em Amostras de Própolis*. Disponível em: <http://www.bichoonline.com.br/artigos/apa0014.htm>. Acesso em: 29/11/2011
- MARINHO D.G.; ALVIANO, D.S.; MATHEUS, M.E.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.135, p.530-537, 2011.
- MASUDA, R.; KANEKO, K.; YAMASHITA, I. Sugar and cyclitol determination in vegetables by HPLC using postcolumn fluorescent derivatization. *Journal of Food Science*, v. 61, p. 1186-1190, 1996.
- MAURI, P.; MIGLIAZZA, B.; PIETTA, P. Liquid chromatography/electrospray mass spectrometry of bioactive terpenoids in *Ginkgo biloba* L. *Journal of Mass Spectrometry*, v.34, p.1361-1367, 1999.
- MONTELES, R.; PINHEIRO, C.U.B. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica *Revista de Biologia e Ciências da Terra*,v.7, 2007.
- MORAES, T.M.; RODRIGUES, C.M.; KUSHIMAA, H.; BAUABC, T.M.; VILLEGAS, W.; PELLIZZON, C.H.; BRITO, A.R.M.S.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. *Journal of Ethnopharmacology*, v.120, p.161-168, 2008.
- MOREIRA, Y.A. *As plantas que curam*. v.1, LI-BRA, 1984. 410p.
- NAKANO, A.; HATTORI, Y.; AOKI, C.; JOJIMA, T.; KASAI, K. Telmisartan inhibits cytokine-induced nuclear factor-kappa B activation independently of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Hypertension Research*, v.32, p.765-769, 2009.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the ast 25 years. *Journal of Natural Products*, v.70, p.461-477, 2007.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.E; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Report*, v.17, p.215-234, 2000.

PÉREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J.; JIMENEZ, R.; SANTOS-BUELGA, C.; OSUNA, A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacological Reports*, v.61, p.67-75, 2009.

PIGMAN, W. *The Carbohydrates: chemistry, biochemistry, physiology*. 1957, 902 p.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos *Química Nova*, v.27, p.771-780, 2004.

RIGELSKI, J.M.; SWEET, B.V. Hawthorn: Pharmacology and therapeutic uses. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v.59, p.417-422, 2002.

RODRIGUES, C.M. *Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais*. Araraquara: Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, 2007. 199p.

RODRIGUES, C.M.; BRITO, A.R.M.S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W. Constituintes químicos das cascas de *Hancornia speciosa* Gom. (Apocynaceae) In: *REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA*, 29, Águas de Lindóia. Resumos...São Paulo, 2006.

RODRIGUES, C.M.; RINALDO, D.; SANTOS, L.C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, A.R.M.S.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. *Rapid Communication Mass Spectrometry*, v.21, p.1907-1914, 2007.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. *Plantas Medicinais no domínio dos Cerrados*. UFLA. 2001, 65p.

RUFINO, M.S.M.; FERNANDES, F.A.N.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. *Food Chemistry*, v.114, p.693-695, 2009.

RUIZ-MATUTE, A.I.; MONTILLA, A.; CASTILLO, M.D.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; SANZ, M.L. A GC method for simultaneous analysis of bornesitol, other polyalcohols and sugars in coffee and its substitutes. *Journal of Separation Science*, v.30, p.557-562, 2007.

RUSAK, G.; KUSTRAK, D.; MALES, Z.; PLESE, N. The determination of the content of the polyphenols in aerial parts of species *Centaurea rupestris* L. and *C. fritschii* Hayek (Asteraceae). *Acta Pharmaceutica*, v.43, p.121-125, 1993.

SAMPAIO, T.S.; NOGUEIRA, P.C.L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. *Food Chemistry*, v.95, p.606-610, 2006.

SANTOS, E.A.; SAMPAIO, T.S.; FEITOSA, J.G.R.; RIBEIRO, A.O.; NOGUEIRA, P.C.L. Constituintes voláteis das folhas de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae). In *REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA*, 29, Águas de Lindóia. Resumos...São Paulo, 2006.

SANZ, M.L.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; MORENO-ARRIBAS, M.V. Identification of the origin of commercial enological tannins by the analysis of monosaccharides and polyalcohols. *Food Chemistry*, v. 111, p. 778-183, 2008.

SERRA, C.P.; CORTES, S.F.; LOMBARDID, J.A.; OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. *Phytomedicine*, v.12, p.424-432, 2005.

SILVA, G.C. *Efeito hipotensor e vasodilatador de uma fração padronizada de Hancornia speciosa Gomes (mangaba) em camundongos*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2010. 87p.

SILVA, G.C.; BRAGA, F.C.; LIMA, M.P.; PESQUERO, J.L.; LEMOS, V.S.; CORTES, S.F. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. *Journal of Ethnopharmacology*, v.137, p.709-713, 2011.

SILVA, M.A.B.; MELO, L.V.L.; RIBEIRO, R.V.; SOUZA, J.P.M.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O.; SILVA, R.M. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20, p.549-562, 2010a.

SILVA, T.F.; COELHO, M.R.; VOLLÚ, R.E.; DE VASCONCELOS GOULART, F.R.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; SELDIN L. Bacterial community associated with the trunk latex of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) grown in the northeast of Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.99, p.523-532, 2010b.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, p.35-40, 2002.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. *Practical HPLC Method Development*, 2 Ed., New York: A Wiley-Interscience Publication, 1997. 765p.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Botânica Brasileira*, v.20, p.135-142, 2006.

STREETER, J.G.; STRIMBU, C.E. Simultaneous extraction and derivatization of carbohydrates from green plant tissues for analysis by gas-liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, v.259, p.253-257, 1998.

SUZUKI, A.; KAGAWA, D.; OCHIAI, R.; TOKIMITSU, I.; SAITO, I. Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*, v.25, n.1, p.99-107, 2002.

THE UNITED States pharmacopeia: USP29-NF24. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2006. Chromatography, p. 2644-2649; chap. <621>.

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. *Revista Hipertensão*, v.13, n°01, p.1-68, 2010.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis*. 2.ed. Verlag/ Berlin/ Heidelberg/ New York: Springer, 1996. 384 p.

WAGNER, H.E; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, v.16, p.97-110, 2009.

WALKER, A.F.; MARAKIS, G.; MORRIS, A.P.; ROBINSON, P.A. Promising hypotensive effect of hawthorn extract: a randomized double-blind pilot study of mild, essential hypertension. *Phytotherapy. Research*, v.16, p.48-54, 2002.

WHO. World Health Organization. *Prevention of Cardiovascular Disease Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk*, 2007.

WHO. World Health Organization. International Society of hypertension Writing Group 2003. WHO/ISH statement on management of hypertension. *Journal of Hypertension*, v.21, p.1983-1992, 2003.