

PATRÍCIA BAIER KREPSKY

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA QUANTITATIVA E AVALIAÇÃO DA
POTENCIAL ATIVIDADE VASODILATADORA DE *Cuphea
carthagenensis* (Jacq.) MacBride**

Tese submetida, como requisito parcial para obter grau de doutora em Ciências Farmacêuticas, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga

K92c

Krepky, Patricia Baier

Composição química quantitativa e avaliação da potencial atividade vasodilatadora de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) MacBride/ Patricia Baier Krepky. – 2011.

211 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Hipotensão – Teses. 2. Flavonoides – Teses. 3. Marcadores químicos – Teses. 4. *Cuphea carthagenensis* – Teses. 5. Espectrofotometria de absorção no ultravioleta – Teses. 6. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 7. Coeficiente de correlação de Spearman. I. Braga, Fernão Castro. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CD:615.327

FOLHA DE APROVAÇÃO

PATRÍCIA BAIER KREPSKY

**"COMPOSIÇÃO QUÍMICA QUANTITATIVA E AVALIAÇÃO DA
POTENCIAL ATIVIDADE VASODILATADORA DE *CUPHEA
CARTHAGENENSIS* (JACQ.) MACBRIDE"**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos - UFPR



Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello - UEM



Prof. Dra. Rachel Oliveira Castilho - UFMG



Prof. Dr. Christian Fernandes - UFMG



Prof. Dr. Fernão Castro Braga - UFMG

Belo Horizonte, 18 de fevereiro de 2011.

Dedico esta tese aos conhecedores tradicionais de plantas medicinais e àqueles que contribuem para que tal riqueza não seja menosprezada.

Agradeço...

... a Deus;

a minha mãe, pelo amor e incentivo;

ao orientador prof. Dr. Fernão Castro Braga, tenho muito a agradecer, pela disponibilidade, atenção, paciência e compreensão;

ao prof. Dr. Steyner F. Côrtes pela orientação na área de farmacologia cardiovascular e por possibilitar a realização dos experimentos *in vitro* e *in vivo* no laboratório de farmacologia cardiovascular;

ao prof. Dr. José Dias de Souza Filho pela orientação na área de espectroscopia de ressonância magnética nuclear assim como pela obtenção de todos os espectros;

a Loana Aparecida Johansson, responsável pelo laboratório de fitoterapia da Klabin do Paraná Produtos Florestais, pelo fornecimento do material vegetal;

às estudantes de iniciação científica Raquel Geralda Isidório e Natália Nunes de Melo, pela realização de diversas análises;

à mestranda em farmacologia Grazielle Caroline da Silva pela realização dos experimentos *in vivo* e auxílio na elaboração do texto sobre atividade hipotensora;

ao amigo e colega na UFBA Leandro Martins de Freitas por me ajudar discutir a relação entre dados químicos, genéticos e evolutivos de *Cuphea*.

a minha amiga Mauricélia Maria Costa pela amizade e apoio em Belo Horizonte;

ao amigos e colegas do Grupo Aroeira, com os quais realmente vivenciei o significado de multidisciplinaridade;

aos meus amigos e colegas do laboratório de fitoquímica, que me acolheram e me ajudaram desde os primeiros dias em Belo Horizonte, que são um exemplo de amizade e companheirismo, e tanto me ajudaram com suas sugestões e orientações;

aos amigos e colegas do Instituto Multidisciplinar em Saúde, UFBA, Campus de Vitória da Conquista, em especial Ana Carolina da Cunha Rodrigues, Angélica Ferraz Gomes, Andrea Karla A. dos Santos, Danielle de Souto Medeiros, Poliana Cardoso Martins e Regiane Yatsuda que me substituíram em atividades de ensino, pesquisa, extensão e administrativas, possibilitando meus afastamentos para o término deste trabalho, e aos demais por me oferecerem um ambiente de trabalho sensacional.

“Há um conselho que dou a vocês: não tenham medo. Porque se tiverem medo, nunca poderão criar nada de original. É preciso que não tenham medo de dizer alguma coisa que possa ser considerada como um erro. Porque tudo que é novo aparece aos olhos antigos como coisa errada. É sempre nessa violação do que é considerado certo que nasce o novo e há a criação.”

Mário Schenberg

Que em minha vida como professora,
pesquisadora, cidadã eu consiga perceber o que precisa
ser mudado e que eu tenha a coragem de apontar para o
novo.

Resumo

Cuphea carthagenensis (Jacq.) MacBride Lythraceae, denominada popularmente sete-sangrias, tem uso medicinal tradicional no tratamento de doenças cardiovasculares, entre outras. Como não foram encontrados estudos sobre a relação entre composição química quantitativa e atividade biológica, ou sobre identificação de metabólitos secundários polares, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a composição qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários da espécie e sua potencial atividade vasodilatadora e hipotensora, visando definir marcadores químicos e desenvolver métodos de análise. Foram obtidos extratos aquoso (EA) e etanólico bruto (EB) de partes aéreas, bem como frações derivadas de EB (*n*-butanólica, aquosa solúvel e insolúvel em metanol, e precipitado). Análises cromatográficas por CCD e CLAE dos derivados da droga vegetal obtidos, bem como a quantificação dos teores totais de flavonoides, taninos e proantocianidinas indicaram composição química diferenciada para os extratos e frações. Taninos foram os metabólitos majoritários ($75,0 \pm 0,9\%$ m/m) na fração *n*-BuOH, enquanto flavonoides e proantocianidinas foram mais abundantes no precipitado ($5,80 \pm 0,16$ e $37,9\%$ m/m, respectivamente). Os extratos e as frações obtidos foram avaliados em modelo *in vitro* de vasodilatação em preparações de aorta de ratos. Todos foram ativos, sendo o efeito vasodilatador das frações *n*-BuOH, aquosa solúvel em metanol, do precipitado e do EB estatisticamente equivalentes (pCl_{50} $4,98 \pm 0,06$ a $4,85 \pm 0,11$; $p \geq 0,05$). Os teores dos metabólitos e os valores de pCl_{50} foram submetidos a análise de correlação de Spearman. Observou-se correlação positiva forte entre a atividade biológica e os teores totais de flavonoides ($r = 0,90$), proantocianidinas ($r = 0,90$) e taninos ($r = 0,60$). A administração *per os* do extrato etanólico e da fração *n*-BuOH a camundongos normotensos (doses de 10 e 100 mg/kg) induziu hipotensão, com diferenças significativas entre as doses ($p < 0,05$). O estudo fitoquímico de *C. carthagenensis* resultou no isolamento de quercetina-3-sulfato, quercetina-5-O- β -glicopiranosídeo e quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo, sendo os dois últimos inéditos para a espécie. Estes flavonoides correspondem aos picos majoritários dos cromatogramas de *C. carthagenensis* registrados com detecção no UV em $\lambda = 350$ nm. Foi desenvolvido e parcialmente validado um método de CLAE para quantificar os flavonoides isolados em extratos de *C. carthagenensis*. Foram estabelecidas também as condições para a quantificação por CLAE simultânea de quercetina e dos ácidos gálico e elágico em extrato hidrolisado de *C. carthagenensis*. Porém, as condições de hidrólise avaliadas não apresentaram precisão satisfatória. Concluindo, os flavonoides isolados, assim como flavonoides, taninos e proantocianidinas totais são potenciais marcadores químicos de folhas de *Cuphea carthagenensis*.

Palavras-chave: hipotensão, flavonoides, marcadores químicos, espectrofotometria de absorção no ultravioleta, cromatografia líquida de alta eficiência, correlação de Spearman.

Abstract

Cuphea carthagenensis (Jacq.) MacBride Lythraceae is popularly known as sete-sangrias. It is traditionally employed to treat cardiovascular diseases, among other conditions. It was not found any research about the relationship between quantitative chemical composition and biological activity. Therefore the goal of the present work was to evaluate qualitative and quantitative chemical composition of the species and its potential vasodilating activity, along with to define chemical markers and develop analytical methods. The extraction of *C. carthagenensis* aerial parts afforded the aqueous (EA) and ethanol (EB) extracts, whereas fractionation of EB furnished *n*-BuOH, aqueous soluble and aqueous insoluble in MeOH fractions together with a precipitate. TLC and HPLC analysis of the extracts and fractions, along with spectrophotometric determination of the total contents of flavonoids, tannins and proanthocyanidins indicated different chemical compositions for the preparations. Tannis showed the highest contents, reaching $75.0 \pm 0.9\%$ w/w in the *n*-BuOH fraction, whereas flavonoids and proanthocyanidins were the major compounds in the precipitate ($5.80 \pm 0.16\%$ and $37.9\% \pm$ d.p. w/w, respectively). The potential vasodilator effect of the extracts and fractions were assayed *in vitro* using rat aortic rings pre-contracted with phenylefrine. All preparations were active and the vasodilatation elicited by some fractions (*n*-BuOH and aqueous soluble in MeOH), the precipitate and EB were statistically equivalents (pCl_{50} 4.98 ± 0.06 to 4.85 ± 0.11 ; $p \geq 0.05$). The contents of the assayed compounds and the of the biological assay were submitted to Spearman correlation analysis. Strong positive correlations were obtained between the vasodilator effect and the total contents of flavonoids ($r = 0.90$), proanthocyanidins ($r = 0.90$) and tannins ($r = 0.60$). Therefore, such groups of metabolites may constitute potential chemical markers for the species. The administration of EB and *n*-BuOH fraction to normotense mice (*per os*; doses of 10 and 100 mg/kg) induced hypotension, with significant differences among the doses ($p < 0.05$). The phytochemical study of *C. carthagenensis* afforded quercetin-3-sulfate and two flavonoids described for the first time for the species, quercetin-5-O- β -glucopyranoside and quercetin-3-O- α -arabinofuranoside. The above mentioned flavonoids are the major peaks found in the HPLC profiles of *C. carthagenensis* registered by DAD detector at 350 nm. An HPLC method was developed and partially validated to quantify the isolated flavonoids in the extracts of *C. carthagenensis*. The HPLC conditions for the simultaneous analysis of quercetin, gallic and ellagic acid in hydrolyzed extracts of *C. carthagenensis* was also established. However, the hydrolysis reaction did not present satisfactory precision for quantitative analysis. The isolated flavonoids as well total flavonoids, tannins and proanthocyanidins are potential chemical markers for *Cuphea carthagenensis* aerial parts.

Key-word: hypotension, flavonoid, chemical marker, ultraviolet spectrophotometry, high performance liquid chromatography, Spearman correlation.

LISTA DE FIGURAS

1 Partes aéreas de <i>C. carthagenensis</i>	30
2 Partes aéreas de <i>C. carthagenensis</i>	30
3 Inflorescências de <i>C. carthagenensis</i>	31
4 Partes aéreas de <i>C. carthagenensis</i>	31
5 Fluxograma do fracionamento do extrato bruto (EB) por partição entre solventes imiscíveis, gerando as frações hexânica (HE), diclorometânica (DC), em acetato de etila (AE), <i>n</i> -butanólica (BU), aquosa solúvel em metanol (AQsol), aquosa insolúvel em metanol (AQinsol) e precipitado (ppt).....	46
6 Cromatograma, obtido por CCD em sílica gel, para extratos e frações de <i>C. carthagenensis</i> . Eluição com acetato de etila / ácido fórmico / ácido acético / água (40: 4,4: 4,4: 10). Revelação com anisaldeído. Amostras analisadas: extrato bruto (EB), extrato aquoso (EA), precipitado (ppt), fração aquosa solúvel em metanol (AQsol), fração aquosa insolúvel em metanol (AQinsol), fração butanólica (BU), CC1, rutina (R), quercetina (Q).....	80
7 Cromatogramas, obtidos por CLAE para o extrato bruto, durante o desenvolvimento de perfil cromatográfico de <i>C. carthagenensis</i> . Condições cromatográficas: vide Tabela 4, p. 52.....	83
8 Gradiente de eluição segmentado empregado na condição D.....	85
9 Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, com detecção no UV em $\lambda = 210$ nm, para os extratos e frações de <i>C. carthagenensis</i> e CC1. Condições cromatográficas: vide Tabela 4, condição G, página 52. CC1, substância isolada; EB, extrato etanólico bruto; EA, extrato aquoso; BU; fração <i>n</i> -butanólica; AQsol., fração aquosa solúvel em metanol; AQinsol., fração aquosa insolúvel em metanol; ppt, precipitado.....	87
10 Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, com detecção no UV em $\lambda = 350$ nm, para os extratos e frações de <i>C. carthagenensis</i> . CC1, substância isolada; EB, extrato bruto; EA, extrato aquoso; BU; fração <i>n</i> -butanólica; AQsol., fração aquosa solúvel em metanol; AQinsol., fração aquosa insolúvel em metanol; ppt, precipitado.	88
11 Curvas analíticas de quercetina anidra para doseamento de flavonoides totais por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível, $n = 3$	90
12 Curvas analíticas de pirogalol obtidas por regressão linear, $n = 3$	96
13 Solvólise ácida da ligação interflavônica resultando em unidade inferior na forma livre e em carbocátion da unidade superior, que ao oxidar forma cianidina.....	101
14 Curvas concentração resposta cumulativa das porcentagens de relaxamento e pCl_{50} obtidos para frações e extratos de <i>C. carthagenensis</i> , em anéis de aorta com endotélio funcional, pré contraídos com fenilefrina. Cada ponto representa média e o desvio padrão de 4 replicatas. BU = fração <i>n</i> -butanólica; EB = extrato bruto; ppt = precipitado; AQsol. = fração aquosa solúvel em metanol; AQinsol. = fração aquosa insolúvel em metanol.....	104

15 Valores de pCl ₅₀ determinados no ensaio de vasodilatação para extratos e frações de <i>C. carthagenensis</i>	105
16 Variação da pressão arterial de camundongos normotensos após administração, por via oral, de extrato bruto de <i>Cuphea carthagenensis</i> nas doses de 10 e 100 mg/kg, n = 6.....	112
17 Variação da pressão arterial sistólica (Δ PAS) de camundongos normotensos após administração, por via oral, de fração <i>n</i> -butanólica (BU) de <i>Cuphea carthagenensis</i> nas doses de 10 e 100 mg/kg, em função do tempo em min, n = 6.....	113
18 Correlação entre os teores de flavonoides totais determinados por UV/Vis e CLAE, taninos totais e proantocianidinas, e a atividade vasodilatadora <i>in vitro</i> para extratos e frações de <i>C. carthagenensis</i> , e respectivos valores de coeficiente de correlação de Spearman (r).....	116
19 Processo de separação e isolamento de CC1 por Sephadex e CLAE do precipitado resultante da partição do extrato bruto, incluindo as massas obtidas.	120
20 Fluxograma do processo de fracionamento do extrato aquoso (EA) em coluna de Sephadex LH-20 e CLAE de ODS. As massas obtidas das frações estão discriminadas na figura.	122
21 Fluxograma de parte do processo de fracionamento da fração <i>n</i> -butanólica do extrato aquoso por Sephadex (coluna 6 e coluna 6), incluindo as massas aplicadas nas colunas e massas obtidas.....	123
22 Fluxograma dos processos de fracionamento da fração <i>n</i> -butanólica do extrato aquoso por CLAE em coluna ODS, incluindo as massas aplicadas nas colunas e massas obtidas.	124
23 Cromatograma, obtido por CLAE com detecção em $\lambda = 210$ nm, para o precipitado formado a partir da adição de metanol/ água 8:2 à fração <i>n</i> -butanólica. Condições cromatográficas: vide parte experimental, condição G (item 4.2.4.1).....	125
24 Espectro RMN de ¹³ C obtido para CC1 (100 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).	130
25 Subespectro DEPT-135 obtido para CC1 (100 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).....	131
26 Espectro de RMN de ¹ H obtido para CC1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).....	134
27 Espectro de RMN de ¹³ C obtido para CC3 (DMSO- <i>d</i> 6, 100 MHz).....	139
28 Subespectro DEPT-135 obtido para CC3 (DMSO- <i>d</i> 6, 100 MHz).....	140
29 Espectro de RMN de ¹ H obtido para CC3 (DMSO- <i>d</i> 6, 400 MHz).....	141
30 Resultado do experimento HSQC para CC3.....	143
31 Mapa de correlação HMBC para CC3.....	144
32 Espectro de RMN de ¹³ C obtido para CC4 (DMSO- <i>d</i> 6, 100 MHz).....	148
33 Subespectro DEPT-135 obtido para CC4 (DMSO- <i>d</i> 6, 100 MHz).....	149
34 Espectro de RMN de ¹ H obtido para CC4 (DMSO- <i>d</i> 6, 400 Mhz), com expansão.	

.....	150
35 Mapas de correlação HSQC obtidos para CC4.....	151
36 Cromatogramas, obtidos por CLAE, durante o desenvolvimento do método de análise quantitativa de flavonoides em <i>C. carthagenensis</i> . CC1, CC3, CC4 e quercetina, com espectros de absorção no UV característicos de flavonoides. Condições cromatográficas: vide Tabela 16, página 45.....	155
37 Curvas analíticas de quercetina diidratada utilizadas para doseamento de flavonoides por CLAE.....	159
38 Curvas analíticas de quercetina diidratada utilizadas para doseamento de flavonoides por CLAE.	160
39 Curvas analíticas de quercetina-3-sulfato.....	162
40 Curvas analíticas de quercetina-3-sulfato utilizadas para doseamento de flavonoides por CLAE.....	163
41 Cromatograma, obtido por CLAE, otimizado para análise de ácido gálico, ácido elágico e quercetina em extrato etanólico hidrolisado de <i>C. carthagenensis</i> Condições cromatográficas: condição 4 (Tabela 54 e item 4.8.3.1).....	171
42 Cromatograma, obtido por CLAE, para extrato hidrolisado. Condições cromatográficas: eluição em gradiente de 2 a 46% de metanol em ácido fosfórico a 0,1%, fluxo 1,0 ml/min, coluna ODS, temperatura de 40 °C, detecção no UV em $\lambda = 271$ nm.....	173
43 Cromatograma otimizado para análise de ácido gálico e seu derivado, ácido elágico e quercetina em extrato bruto etanólico de <i>C. carthagenensis</i>	173

LISTA DE TABELAS

1 Flavonoides isolados de folhas de <i>Cuphea</i> spp. por Santos, Salatino e Salatino (1995).	43
2 Rendimento e coloração das frações resultantes do fracionamento do extrato bruto de <i>C. carthagenensis</i> por partição entre solventes imiscíveis.....	46
3 Massa das frações resultantes da partição do extrato aquoso de <i>C. carthagenensis</i> e rendimento calculado em relação à massa da droga vegetal de partida.....	47
4 Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método de análise qualitativa de extratos e frações de <i>C. carthagenensis</i> por CLAE.....	50
5 Volume de solução mãe, volume final após diluição e concentração de quercetina empregadas na construção das curvas analíticas para o doseamento espectrofotométrico de flavonoides totais.....	53
6 Massa aproximada da tomada de amostra de extratos e frações para o doseamento de flavonoides totais por espectrofotometria no UV-Vis.....	53
7 Purificação do precipitado (ppt) em coluna de Sephadex	63
8 Fracionamento do extrato aquoso liofilizado em coluna de Sephadex.....	63
9 Fracionamento da fração <i>n</i> -butanólica em coluna de Sephadex.....	64
10 Fracionamento da fração <i>n</i> -butanólica em coluna de Sephadex. Repetição.....	64
11 Fracionamento da fração <i>n</i> -butanólica em coluna de Sephadex visando a obtenção de CC3.....	66
12 Fracionamento da fração <i>n</i> -butanólica em coluna de Sephadex visando a obtenção de CC3.....	67
13 Frações resultantes do racionamento da fração <i>n</i> -butanólica em CLAE, visando a obtenção de CC3.....	67
14 Frações resultantes do fracionamento da fração acetato de etila em CLAE preparativo para isolamento de CC4.....	68
15 Principais condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento de método para análise quantitativa por CLAE de flavonoides em extratos e frações de <i>C. carthagenensis</i>	71
16 Volumes de solução de quercetina diidratada injetadas para construção das curvas analíticas do método de doseamento de flavonoides por CLAE.....	72
17 Volumes e massas de quercetina-3-sulfato injetados para construção das curvas analíticas do método de doseamento de flavonoides por CLAE.....	73
18 Volumes e massas de quercetina-3- <i>O</i> - α -arabinofuranosídeo injetados para construção das curvas analíticas do método de doseamento de flavonoides por CLAE.....	73

19 Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento de método para análise quantitativa por CLAE de quercetina e ácidos gálico e elágico em extrato hidrolisado de <i>C. carthagenensis</i>	76
20 Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento de método para análise quantitativa por CLAE de quercetina, derivado do ácido gálico, ácido gálico e ácido elágico em extrato hidrolisado de <i>C. carthagenensis</i>	77
21 Resultados da análise por CCD de sílica gel de extratos e frações de <i>C. carthagenensis</i> empregando-se diferentes reveladores.....	80
22 Dados empregados na construção das curvas analíticas de quercetina anidra para doseamento espectrofotométrico de flavonoides totais.....	90
23 Teores de flavonoides totais em extratos e frações de <i>C. carthagenensis</i> , determinados por espectrofotometria no UV-Vis, n = 3.....	92
24 Teores de taninos totais determinados no extrato bruto de <i>C. carthagenensis</i> pelo método espectrofotométrico, empregando-se pó de pele e PVPP como adsorventes.....	94
25 Dados empregados na construção das curvas analíticas de pirogalol para doseamento de taninos totais.....	96
26 Teores médios de taninos totais em extratos e frações de <i>C. carthagenensis</i>	99
27 Teores médios de proantocianidinas totais em extratos e frações de <i>C. carthagenensis</i>	99
28 Teores totais de compostos polifenólicos em extratos e frações de <i>C. carthagenensis</i> , determinados por espectrofotometria no UV/Vis.....	102
29 Média dos logaritmos negativos da concentração inibitória a 50% (pCI ₅₀) calculados para extratos e frações de <i>C. carthagenensis</i> , seguida do desvio padrão, n = 4 a 5.....	105
30 Valores percentuais de dilatação máxima induzidos por extratos e frações de <i>C. carthagenensis</i> , n = 4.....	106
31 Resultados da análise do espectro de absorção no UV para CC1.....	127
32 Dados do espectro de RMN de ¹³ C obtido para CC1 e valores da literatura para quercetina e quercetina-3-sulfato.	131
33 Dados do espectro de RMN de ¹ H obtido para CC1 e valores relatados na literatura para quercetina 3-sulfato.....	132
34 Resultados da análise do espectro de absorção no UV para CC3.....	137
35 Manchas de correlação observadas no mapa de contornos HSQC obtido para CC3.	142
36 Manchas de correlação observadas no mapa de contornos HMBC obtido para CC3.	142
37 Dados do espectro de RMN de ¹ H obtidos para CC3 e valores relatados na literatura para quercetina-5-O-β-glicopiranosídeo.....	145

38 Dados do espectro de RMN de ¹³ C obtidos para CC3 e valores relatados na literatura para quercetina-5-O-β-glicopiranosídeo (TAMURA et al., 2002).	146
39 Resultados da análise do espectro de absorção no UV para CC4, com o uso de reagentes de deslocamento.....	147
40 Manchas de correlação observadas no mapa de contornos HSQC obtido para CC4.	152
41 Dados do espectro de RMN de ¹ H obtidos para CC4 e valores relatados na literatura para quercetina-3-O-α-arabinofuranosídeo.....	152
42 Dados do espectro de RMN de ¹³ C de CC4 e valores relatados na literatura para quercetina-3-O-α-arabinofuranosídeo (avicularina) (EK et al., 2006).....	153
43 Parâmetros cromatográficos avaliados durante o desenvolvimento do método de análise quantitativa de flavonoides em <i>C. carthagenensis</i>	158
44 Áreas dos picos obtidas da análise de soluções de quercetina diidratada por CLAE, empregadas na determinação das curvas analíticas.....	159
45 Áreas dos picos obtidas da análise de soluções de quercetina diidratada por CLAE, empregadas na determinação das curvas analíticas.....	160
46 Áreas dos picos obtidas da análise de soluções de quercetina-3-sulfato por CLAE, empregadas na determinação das curvas analíticas.....	162
47 Áreas dos picos obtidas da análise de soluções de quercetina-3-O-arabinofuranosídeo por CLAE, empregadas na determinação das curvas analíticas.....	163
48 Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) da concentração (porcentagem m/m) de cada flavonoide no extrato bruto de <i>C. carthagenensis</i> calculada como quercetina anidra para avaliação da precisão intradia do método quantitativo de CLAE, n = 3.	164
49 Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) da concentração (porcentagem m/m) de cada flavonoide no extrato bruto de <i>C. carthagenensis</i> calculada como quercetina anidra para avaliação da precisão interdia do método quantitativo de CLAE, n = 3.	165
50 Comparação entre os teores de flavonoides quantificados por CLAE, obtidos a partir de diferentes formas de cálculo.....	166
51 Resultados do ensaio de recuperação do método para quantificação de flavonoides por CLAE em <i>C. carthagenensis</i> , calculados como quercetina.....	167
52 Resultados de recuperação para o método de quantificação de flavonoides por CLAE em extrato bruto de <i>C. carthagenensis</i> , n = 3, calculados a partir da equação obtida por meio da curva analítica de cada flavonoide.....	168
53 Teores percentuais médios (n = 3) de flavonoides totais seguidos dos valores de desvio padrão e coeficiente de variação (entre parêntesis), determinados nos extratos e frações de <i>C. carthagenensis</i> , calculados como quercetina anidra por CLAE.....	169
54 Resumo das modificações efetuadas durante o desenvolvimento das condições cromatográficas para quantificação dos ácidos gálico e elágico, e quercetina por CLAE..	170

55 Parâmetros de adequabilidade de sistema obtidos para quantificação por CLAE de ácido gálico, ácido elágico e quercetina em extrato hidrolisado de <i>C. carthagenensis</i>	172
56 Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos para quantificação por CLAE de ácido gálico, galato de metila (derivado do ácido gálico), ácido elágico e quercetina em extrato hidrolisado de <i>C. carthagenensis</i>	174
57 Áreas dos picos correspondentes ao ácido gálico nos cromatogramas obtidos por CLAE para o extrato bruto hidrolisado de <i>C. carthagenensis</i> , seguido do desvio padrão e coeficiente de variação (%), n = 3.....	174
58 Áreas dos picos correspondentes ao ácido elágico nos cromatogramas obtidos por CLAE para o extrato bruto hidrolisado de <i>C. carthagenensis</i> , seguido do desvio padrão e coeficiente de variação (%), n = 3.....	175
59 Áreas dos picos correspondente à quercetina nos cromatogramas obtidos por CLAE para o extrato bruto hidrolisado de <i>C. carthagenensis</i> , seguido do desvio padrão e coeficiente de variação (%), n = 3.....	175
60 Área dos picos nos cromatogramas obtidos por CLAE correspondentes ao extrato bruto submetido à hidrólise com HCl 4M, seguida do desvio padrão e coeficiente de variação (%), n = 3.	176
61 Áreas dos picos de interesse nos cromatogramas, obtidos por CLAE, após hidrólise do extrato bruto de <i>C. carthagenensis</i> com ácido clorídrico 4 M, seguidas dos desvios padrão e coeficientes de variação (%), n = 3.	176
62 Áreas dos picos correspondentes ao ácido gálico em cromatogramas, obtidos por CLAE, com detecção em $\lambda = 271$ nm, para extrato de <i>C. carthagenensis</i> submetido a diferentes condições de hidrólise, com repetição da corrida cromatográfica após um dia.	177
63 Áreas dos picos correspondentes ao derivado do ácido gálico em cromatogramas, obtidos por CLAE, para extrato de <i>C. carthagenensis</i> com detecção em $\lambda = 271$ nm, submetido a diferentes condições de hidrólise, com repetição da corrida cromatográfica após um dia.....	177
64 Áreas dos picos correspondentes ao ácido elágico em cromatogramas, obtidos por CLAE, com detecção em $\lambda = 254$ nm, para extrato de <i>C. carthagenensis</i> submetido a diferentes condições de hidrólise, com repetição da corrida cromatográfica após um dia..	178
65 Áreas dos picos correspondentes a quercetina em cromatogramas obtidos por CLAE, com detecção em $\lambda = 254$ nm, para extrato de <i>C. carthagenensis</i> submetido a diferentes condições de hidrólise, com repetição da corrida cromatográfica após um dia.	178
66 Áreas dos picos nos cromatogramas obtidos por CLAE, com detecção em $\lambda = 271$ nm, para o extrato de <i>C. carthagenensis</i> submetido a hidrólise (ácido clorídrico 4 M, durante 8 h), em tubo de vidro com batoque e tampa.....	179

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AQ insol.	Fração aquosa insolúvel em metanol
AQ sol.	Fração aquosa solúvel em metanol
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BU	Fração <i>n</i> -butanólica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CC1	Quercetina-3-sulfato
CC3	Quercetina-5-O- β -glicopiranosídeo
CC4	Quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo
CI ₅₀	Concentração inibitória a 50%
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfóxico hexadeuterado
DP	Desvio padrão
EA	Extrato aquoso
EB	Extrato bruto
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ICH	Internacional Conference on Harmonisation
IV	Infravermelho
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
MeOH	Metanol
ODS	Octadecilsilano

pCl ₅₀	Logaritmo negativo de base 10 da concentração inibitória a 50%
ppt	Precipitado
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
Q	Quercetina
Rf	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
r.p.m.	Rotações por minuto
UV-Vis	Ultravioleta e visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	28
2.1 Geral.....	28
2.2 Específicos.....	28
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1 <i>Cuphea carthagenensis</i>	29
3.1.1 Nomenclatura e descrição botânica.....	29
3.1.2 Origem e distribuição geográfica.....	31
3.1.3 Obtenção.....	32
3.1.4 Usos populares.....	32
3.1.5 Composição química.....	33
3.1.6 Atividades biológicas.....	35
3.1.7 Toxicologia.....	38
3.1.8 Composição química de outras espécies de <i>Cuphea</i>	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Obtenção dos extratos e fracionamento preliminar.....	44
4.1.1 Equipamentos.....	44
4.1.2 Materiais.....	44
4.1.3 Extração e partição.....	45
4.2 Análises cromatográficas qualitativas.....	47
4.2.1 Equipamento.....	47
4.2.2 Materiais.....	47
4.2.3 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	49
4.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	49
4.3 Doseamentos de taninos, flavonoides e proantocianidinas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível.....	51
4.3.1 Equipamentos.....	51
4.3.2 Materiais.....	51
4.3.3 Doseamento de flavonoides totais.....	52
4.3.4 Doseamento de taninos totais.....	54
4.3.5 Doseamento de proantocianidinas totais.....	56
4.4 Avaliação da atividade biológica.....	57
4.4.1 Ensaio <i>in vitro</i> de vasodilatação em anéis de aorta.....	57
4.4.2 Ensaio de atividade hipotensora <i>in vivo</i>	60

4.5	Correlação entre o teor de metabólitos secundários e a atividade biológica.....	61
4.6	Isolamento de metabólitos secundários.....	61
4.6.1	Equipamentos.....	61
4.6.2	Materiais.....	61
4.6.3	Isolamento de CC1.....	62
4.6.4	Isolamento de CC3.....	66
4.6.5	Isolamento de CC4.....	67
4.7	Elucidação estrutural	68
4.7.1	Equipamentos.....	68
4.7.2	Materiais.....	69
4.7.3	Espectrofotometria de absorção no infravermelho.....	69
4.7.4	Espectrofotometria de absorção no ultravioleta.....	69
4.7.5	Espectrometria de ressonância magnética nuclear.....	70
4.8	Quantificação de metabólitos secundários por cromatografia líquida de alta eficiência	70
4.8.1	Equipamento.....	70
4.8.2	Materiais.....	70
4.8.3	Quantificação de flavonoides.....	71
4.8.4	Tentativa de desenvolvimento de método de CLAE para quantificação simultânea de ácido gálico, elágico e quercetina em extrato hidrolisado.....	75
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	79
5.1	Análises cromatográficas qualitativas.....	79
5.1.1	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	79
5.1.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	82
5.2	Doseamentos de taninos, flavonoides e proantocianidinas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível.....	89
5.2.1	Doseamento de flavonoides totais.....	89
5.2.2	Doseamento de taninos totais.....	94
5.2.3	Doseamento de proantocianidinas totais.....	98
5.2.4	Análise conjunta dos perfis cromatográficos por CCD, CLAE e doseamento espectrofotométrico.....	101
5.3	Avaliação da atividade biológica.....	103
5.3.1	Ensaio <i>in vitro</i> de vasodilatação em anéis de aorta.....	103
5.3.2	Ensaio de atividade hipotensora <i>in vivo</i>	112
5.4	Correlação entre o teor de metabólitos secundários e a atividade biológica.....	115
5.5	Isolamento de metabólitos secundários.....	119
5.5.1	Isolamento de CC1.....	119
5.5.2	Isolamento de CC3.....	125

5.5.3 Isolamento de CC4.....	126
5.6 Elucidação estrutural.....	126
5.6.1 Elucidação estrutural de CC1.....	126
5.6.2 Quercetina-3-sulfato e importância taxonômica.....	135
5.6.3 Elucidação estrutural de CC3.....	136
5.6.4 Elucidação estrutural de CC4.....	147
5.7 Quantificação de metabólitos secundários por cromatografia líquida de alta eficiência.....	153
5.7.1 Quantificação de flavonoides.....	153
5.7.2 Tentativa de desenvolvimento de método de CLAE para quantificação simultânea de ácido gálico, elágico e quercetina em extrato hidrolisado.....	169
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	183
7 CONCLUSÃO.....	184
REFERÊNCIAS.....	186
APÊNDICE A.....	205
APÊNDICE B.....	207
APÊNDICE C.....	209
ANEXO A.....	211

1 INTRODUÇÃO

O emprego de plantas medicinais é a mais antiga e difundida forma de tratamento farmacológico (HALBERSTEIN, 2005). Evidências do uso medicinal de espécies vegetais remontam à época pré-histórica. Ao longo da evolução humana essas práticas terapêuticas têm se desenvolvido e foram incorporadas por diferentes sociedades, em todo o mundo (CALIXTO, 2000; HALBERSTEIN, 2005). Atualmente as plantas medicinais são utilizadas na forma de preparações caseiras a partir de plantas *in natura* ou drogas vegetais, e como medicamentos fitoterápicos¹ industrializados ou manipulados em farmácias magistrais.

O uso de plantas medicinais faz parte da medicina tradicional, ou seja, não convencional. Em 1978, os praticantes tradicionais foram reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), através da declaração de Alma-Ata, sendo a primeira instituição a reconhecê-los formalmente e incentivar a incorporação das suas práticas aos sistemas de saúde (OMS; UNICEF, 1978; ROUÉ, 2000). Naquele ano, na Alemanha, foi instituída a Comissão E, reconhecida internacionalmente, responsável pela revisão e avaliação de informações sobre plantas medicinais. Como resultado desse processo foram publicadas monografias relativas a 200 espécies medicinais. Portanto, a Alemanha foi um dos primeiros países ocidentais a oficializar o uso de plantas medicinais (CALIXTO, 2000). No Brasil, a 8ª Conferência Nacional de Saúde (1986) trouxe, entre suas recomendações, a “introdução de práticas alternativas de assistência à saúde no âmbito dos serviços de saúde, possibilitando ao usuário o acesso democrático de escolher a terapêutica preferida” (BRASIL, 2006a).

Nos últimos anos, tem-se observado, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, um aumento na utilização da fitoterapia (CALIXTO, 2000; OMS, 2002; MELZER; SALLER; MEIER, 2008; XU et al., 2009). Esta utilização pode acontecer, por exemplo, em substituição aos tratamentos convencionais ou de forma complementar. Dentre os motivos que levam os usuários à substituição podemos citar questões culturais ou ideológicas, preferência por tratamentos naturais e/ou alternativos; a busca de tratamento para doenças em que abordagens convencionais se mostraram inadequadas; a falta de acesso, o alto custo e o aparecimento de reações adversas graves, resultantes da utilização de medicamentos constituídos por substâncias quimicamente definidas. Quanto à fitoterapia

¹ Medicamento obtido com o emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. São caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2010b).

como complemento ao tratamento convencional, muitas vezes a associação acontece sem o conhecimento de profissionais da área da saúde (OMS; UNICEF, 1978; CALIXTO, 2000; CAPASSO et al., 2000; OMS, 2002; HEINRICH et al., 2004; HALBERSTEIN, 2005). Portanto, ainda que a medicina convencional² tenha avançado muito nas últimas décadas, as plantas medicinais ainda desempenham um papel importante nos cuidados com a saúde, sendo necessário portanto que profissionais da área de saúde estudem fitoterapia tanto o uso medicinal de preparações caseiras quanto medicamentos fitoterápicos. Essa necessidade se reflete nas mudanças que tem acontecido no ensino de farmacognosia no país, classicamente voltado às análises botânicas, químicas e à obtenção de fitofármacos, (RATES et al., 2001) e em outros locais do mundo, por exemplo, no Reino Unido (HEINRICH et al., 2004), buscando-se fortalecer os aspectos clínicos relacionado ao uso de fitoterápicos (RATES et al., 2001; HEINRICH et al., 2004) e plantas medicinais (HEINRICH et al., 2004). As modificações tem sido necessárias ao se considerar as demandas do sistema público de saúde, do mercado farmacêutico e de transformações no modo de pensar os recursos naturais por parte das sociedades, bem como pelo fato da maior parte dos fitoterápicos serem dispensados sem prescrição médica, o que confere ao farmacêutico a oportunidade de trabalhar com orientação (RATES et al., 2001) e indicação farmacêutica³. Como exemplos de estudos recentes que mostram a importância das plantas medicinais nos cuidados com a saúde podemos citar Hümer e colaboradores (2010), que mostraram que 85,5% dos entrevistados em pesquisa realizada na Alemanha, principalmente mulheres com boa situação financeira e educacional, ofereciam produtos derivados de plantas medicinais a suas crianças. Branquinho (1999), estudando o uso de plantas medicinais na cidade do Rio de Janeiro, conclui que essa prática não se restringe àqueles que não podem ter acesso à medicina convencional, sendo adotado em todas as classes sociais. Estudo realizado na Suíça demonstrou que pacientes tratados com médicos especialistas em fitoterapia estavam mais satisfeitos com o tratamento do que aqueles tratados com médicos convencionais (MELZER; SALLER; MEIER, 2008).

No tocante à população brasileira, é bastante documentada a utilização de plantas

² Nesta tese os fitoterápicos, conforme definidos na RDC 14, de 31 de março de 2010 (BRASIL, 2010b), serão considerados como parte da medicina tradicional.

³ Implica a ajuda ao paciente na correta tomada de decisões relacionada ao auto cuidado com sua saúde (ESPANHA, 2002). A Ordem dos Farmacêuticos de Portugal conceitua o termo como: “processo que conduz a que o doente assuma e se responsabilize pela melhoria da sua saúde, através da administração de medicamentos que não requerem receita, destinados à prevenção e ao alívio de queixas autolimitadas, sem recurso à consulta médica”. Durante esse processo o farmacêutico analisa as queixas do doente e recomenda o medicamento de venda sem prescrição obrigatória adequado ao estado fisiopatológico do mesmo, considerando ainda as preferências do doente (PORTUGAL, 2006). No Brasil, a indicação farmacêutica também tem sido incluída entre as atividades dos farmacêuticos (ANGONESI; SEVÁLHO, 2010).

medicinais em regiões urbanas e rurais, especialmente através estudos etnobotânicos (GALVANI; BARRENECHE, 1994; CARRARA, 1995; MARQUESINI, 1995; PAGLIANIRI, 1995; SIMÕES et al., 1998; LIMA et al., 2000; MARODIN; BAPTISTA, 2001; DI STASI et al., 2002; BRASIL, 2003b; VENDRUSCOLO, 2004; LIMA et al., 2007). Além disso, ampla tradição no uso da fitoterapia no Brasil foi relatada por Brandão e colaboradores (2008) em levantamentos de espécies medicinais descritas por naturalistas que percorreram o país no século 19, bem como na análise de monografias das plantas da primeira edição da Farmacopeia Brasileira, datada de 1929. Recentemente foi publicada a Farmacopeia Popular do Cerrado (2009), com parte dos resultados de pesquisa sobre a utilização de plantas medicinais na região do cerrado brasileiro, que contribui para a divulgação e validação dos conhecimentos populares sobre plantas medicinais através da sistematização do conhecimento de raizeiros e benzedeiros. A iniciativa tem o apoio do Ministério do Meio Ambiente e da Saúde (DIAS; LAUREANO, 2009). O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos destaca a importância das farmacopeias populares para o processo de validação de conhecimentos tradicionais e prevê outras publicação dessa natureza (BRASIL, 2007). Apesar de empregarem o termo farmacopeia, não são códigos oficiais como a Farmacopeia Brasileira.

A validação científica de plantas medicinais compreende estudos etnobotânicos associados a estudos farmacológicos *in vivo* e *in vitro*, fitoquímicos, bem como ensaios clínicos. No entanto, revisão realizada por Cravotto e colaboradores (2010) mostrou que para apenas 156 espécies medicinais existem estudos clínicos; a maior parte dos estudos de atividade biológica são ensaios *in vitro* e *in vivo* utilizando modelos animais.

O interesse da população brasileira em geral e dos profissionais da área de saúde por plantas medicinais e fitoterápicos também se torna evidente através das propostas elaboradas no Seminário Nacional sobre Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Assistência Farmacêutica (2003), assim como na Primeira Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica (2005). Esses eventos resultaram no estabelecimento de recomendações sobre diferentes temas. Dentre as recomendações para a pesquisa e desenvolvimento na área de plantas medicinais pode-se citar, entre outros, a priorização de plantas medicinais nativas e exóticas cultivadas, o atendimento às necessidades levantadas a partir de estudos epidemiológicos, a pesquisa com espécies já empregadas no setor público e em movimentos sociais (BRASIL, 2003b; BRASIL, 2005), o incentivo à pesquisa e produção de marcadores⁴ para o controle da qualidade. Também se propõe a

⁴ Marcador – composto ou classe de compostos químicos (ex.: alcaloides, flavonoides, ácidos graxos etc) presentes na matéria-prima vegetal, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico,

complementação de estudos já realizados e a melhoria na qualidade das matérias primas (BRASIL, 2003b), assim como a validação de plantas medicinais utilizadas popularmente e a padronização do controle da qualidade de matérias primas e fitoterápicos (BRASIL, 2005).

O Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006 estabeleceu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, apresentando diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações, por diferentes atores, para garantir o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no país, o desenvolvimento de tecnologias e inovações, bem como o fortalecimento de cadeias e arranjos produtivos, o uso sustentável da biodiversidade brasileira, a valorização, valoração e preservação do conhecimento tradicional associado às comunidades tradicionais. A política estabelece a possibilidade de utilização de plantas medicinais *in natura*, ou como drogas vegetais, medicamentos fitoterápicos manipulados e industrializados (BRASIL, 2006a). No entanto, até 2010, não havia regulamentação sobre drogas vegetais. A RDC número 10, de 09 de março de 2010 estabelece, pela primeira vez no país, a possibilidade de se notificar à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a comercialização de drogas vegetais, citadas em seu anexo I, onde constam também indicações, formas de uso e cuidados. A resolução torna oficial o reconhecimento do valor do uso tradicional⁵ no caso de drogas vegetais empregadas em preparações caseiras como infusos e decoctos (BRASIL, 2010a).

O crescimento na utilização de plantas medicinais e fitoterápicos tem despertado interesse também por parte das indústrias farmacêuticas, inclusive transnacionais, para a pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. Esse fato está relacionado, entre outros motivos, aos menores recursos financeiros necessários, comparando-se com o desenvolvimento de medicamentos quimicamente definidos. Assim, o menor investimento torna os fitoterápicos mais adequados à realidade das indústrias de países em desenvolvimento (CALIXTO, 2000; CALIXTO, 2005; BAKER et al., 2007). Além disso, fitoterápicos tem como vantagem a composição complexa que resulta em multiplicidade de mecanismos de ação, o que pode explicar sua eficácia no tratamento de doenças crônicas e degenerativas que são multifatoriais. Desta forma, fitoterápicos representam uma alternativa ao modelo de desenvolvimento de medicamentos baseado na interação com um único alvo molecular (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2009).

Em função da complexidade química de plantas medicinais e fitoterápicos, uma das

que é utilizado como referência para o controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico (Brasil, 2010b).

⁵ Uso alicerçado na tradição popular, sem evidências conhecidas ou informadas de risco à saúde do usuário, cujas propriedades são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização e documentações científicas (BRASIL, 2010a).

abordagens atuais para seu estudo é baseada em biologia de sistemas. Como exemplo, Verpoorte, Choi e Kim (2009) propõem uma abordagem sistêmica ou reversa para a questão, iniciada a partir de dados observacionais e não pelo levantamento de hipóteses, trabalhando com o maior número de parâmetros possível: estudos clínicos, tecnologias “ômicas”, avaliação de parâmetros fisiológicos, desenvolvimentistas e ambientais, associados a variados métodos quimiométricos, como análises de correlação, de componente principal e similares, para tratar grandes volumes de dados. Tais abordagens permitem identificar compostos que estão relacionados com a atividade, além de evidenciar relações de sinergismo e a presença de pró-fármacos.

Por outro lado, nas últimas décadas observa-se crescente desinteresse por parte das indústrias farmacêuticas pela pesquisa de novos fármacos quimicamente definidos a partir de espécies vegetais, animais e microorganismos. Muitas dessas empresas venderam seus bancos de extratos que haviam sido avaliados em ensaios biológicos. Empresas que continuam investindo em pesquisa com produtos naturais têm procurado explorar locais exóticos como profundezas oceânicas e regiões polares (BAKER et al., 2007; LI; VEDERAS, 2009), investir no desenvolvimento de fitoterápicos (BAKER et al., 2007), ou em pesquisas com peptídeos e proteínas (PINTO et al., 2002).

Uma das razões para esse desinteresse é a utilização pelas indústrias, desde a década de 1990, de ensaios biológicos automatizados (*high throughput screening*) para avaliar compostos obtidos por síntese (OJIMA, 2008; RISHTON, 2008; LI; VEDERAS, 2009). Essa abordagem seria motivada por diversos fatores, incluindo o interesse em obter retorno financeiro rápido; as dificuldades técnicas na aplicação de ensaios automatizados a produtos naturais, devido sua composição química complexa e variável; dificuldades no isolamento e elucidação estrutural das substâncias ativas; risco de extinção de espécies bioativas e possibilidade de que as substâncias ativas sejam conhecidas e não patenteáveis (LI; VEDERAS, 2009).

Para contornar os problemas Li e Veredas (2009) sugerem o uso de abordagens para acelerar as pesquisas relacionadas à obtenção das substâncias bioativas (aumento na eficiência de processos fermentativos, desenvolvimento de métodos de cultivo para espécies de micro-organismos ainda não cultiváveis, que podem representar 99% das espécies), aos ensaios biológicos *in vitro* (uso de ensaios com cultura de células devido a possibilidade de se avaliar múltiplos alvos, aumento na sensibilidade dos métodos, entre outras estratégias), e aos métodos químicos (uso de técnicas cromatográficas hífenadas, aumento na sensibilidade dos equipamentos de ressonância magnética nuclear, entre outras

técnicas). Apesar das dificuldades, produtos naturais na sua forma original, derivados ou análogos, continuam sendo fonte de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2007; RISHTON, 2008), com diversos registros aprovados pela agência regulatória FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos (OJIMA, 2008).

No que se refere à qualidade de drogas vegetais, muitas daquelas utilizadas para consumo domiciliar ou para aquisição por programas de fitoterapia e pela indústria farmacêutica não apresentam parâmetros compatíveis com sua finalidade. Além disso, frequentemente não existem evidências clínicas sólidas para assegurar eficácia e segurança, conforme mencionado anteriormente. Dentre os fatores que contribuem para a falta de qualidade botânica e química das drogas vegetais pode-se citar: classificação botânica incorreta; condições inadequadas de estabilização e armazenamento; período, horário da coleta ou colheita, grau de maturação inadequados e prazo de validade excessivamente longo. Alguns destes problemas estão associados ao fato de que a maior parte das plantas medicinais é obtida por extrativismo predatório (CALIXTO, 2000; CAPASSO et al., 2000; MING et al., 2002; OMS, 2002; GUPTA, 2004; MONTANARI, 2002; SCHEFFER, 2004). Duas estratégias podem ser empregadas como alternativa à coleta indiscriminada de espécies nativas: a domesticação e o manejo sustentável de mata nativa, coleta cíclica de material vegetal, buscando garantir a manutenção da variabilidade genética, a recuperação dos indivíduos coletados, e a manutenção das características ecológicas do ecossistema explorado (REIS; MARIOT; STEENBOOK, 2004).

Uma das abordagens iniciais para se avaliar a qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos é a definição dos marcadores químicos e o estabelecimento de métodos para sua análise (SONAGLIO et al., 2004). Deve ser estabelecido um teor mínimo, baseado em análises sistemáticas, considerando os parâmetros agronômicos de produção, colheita e pós-colheita do vegetal (FARIAS, 2004). Idealmente devem ser definidos marcadores relacionados com a atividade farmacológica (CALIXTO, 2000). O controle da concentração de marcadores químicos é fundamental devido à variabilidade química da droga vegetal e possibilidade da ocorrência de degradação durante os processos de pós-coleta ou pós-colheita, durante o período de armazenamento, em operações de extração, secagem e separação cromatográfica, por exemplo. A variação na concentração de marcadores pode resultar de fatores genéticos (AHENE; O'BRIEN, 2002; ROBARDS, 2003; HALBERSTEIN, 2005) e ambientais, incluindo época do ano, hora do dia e estágio de desenvolvimento da planta, ataque por herbívoros, altitude, latitude, composição do solo, fotoperíodo, regime pluviométrico e eólico, diferenças de temperatura e nível de poluição (EDWARDS, 1992;

SOUZA et al., 2008; CUTLAN et al., 2000; VALLADARES et al., 2002; DONG et al., 2003; FARIAS, 2004; DOUGLAS et al., 2004; HALBERSTEIN, 2005; MONTEIRO et al., 2005; GOBBO-NETO; LOPES, 2009). Os teores de marcadores químicos também podem ser influenciados pelas operações de beneficiamento, tais como local e temperatura de secagem (PEREIRA et al., 1996; PERRY et al., 2000; ROBARDS, 2003; HALBERSTEIN, 2005). De maneira geral é grande a carência de dados sobre a variabilidade química de plantas medicinais, o que repercute diretamente na dificuldade de se estabelecer parâmetros de qualidade para drogas vegetais.

Nesse contexto se insere o presente trabalho, o qual visa contribuir para a padronização futura da espécie medicinal *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) MacBride Lythraceae. A espécie foi selecionada para pesquisa com base em algumas premissas:

- a) Trata-se de espécie nativa e de ampla distribuição no Brasil (LOURTEIG, 1969);
- b) Estudos de atividade biológica em diferentes modelos (BRAGA et al., 2000; SCHULDT et al., 2000; SCHULDT et al., 2004) sugerem a potencial atividade da espécie como anti-hipertensiva, o que já havia sido apontado em estudos etnobotânicos (PAGLIANIRI, 1995; FREIRE, 1996; MARODIN; BAPTISTA, 2001);
- c) A relevância social da hipertensão arterial, que afeta cerca de um quarto da população brasileira (BRASIL, 2004);
- d) O controle inadequado da pressão arterial em porcentagem significativa dos usuários de anti-hipertensivos (COSTA et al., 2002);
- e) A provável baixa toxicidade no uso da espécie, baseada em avaliação toxicológica *in vivo* (BIAVATTI, 2004), e na ausência de relatos de problemas associados ao uso tradicional.

Com esta pesquisa objetiva-se contribuir para a geração de dados sobre a composição química e a atividade biológica de *C. carthagenensis*, assim como com métodos de análise química relevantes para o desenvolvimento futuro de fitoterápicos a partir de partes aéreas da espécie e o controle de qualidade da droga vegetal.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a composição micromolecular qualitativa e quantitativa de partes aéreas de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) MacBride Lythraceae e sua atividade farmacológica, visando a definição de marcadores químicos e o desenvolvimento de métodos de análise.

2.2 Específicos

- a) Avaliar a atividade farmacológica de extratos, frações e substâncias isoladas utilizando modelo *in vitro* (vasodilatação de aorta) e *in vivo* (hipotensão em camundongos);
- b) Determinar teores totais de flavonoides, taninos e proantocianidinas em extratos e frações;
- c) Correlacionar os teores dos metabólitos secundários quantificados com a atividade farmacológica;
- d) Definir perfil cromatográfico para a espécie por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em camada delgada (CCD);
- e) Isolar metabólitos secundários;
- f) Desenvolver método de CLAE para quantificar as substâncias isoladas e/ou outros metabólitos secundários em extratos e frações;
- g) Definir marcadores químicos relacionados com a atividade farmacológica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Cuphea carthagenensis*

3.1.1 Nomenclatura e descrição botânica

O gênero *Cuphea* pertence à família Lythraceae, sendo o maior, com cerca de 260 espécies (GRAHAM; FREUDENSTEIN; LUKER, 2006).

Diversas espécies de *Cuphea* inclusive *Cuphea carthagenensis*, são definidas pela presença de estames com filetes muito curtos, profundamente inseridos no tubo floral. A morfologia floral é muito semelhante entre as espécies desta seção: as flores apresentam entre 4 e 6 mm de comprimento, com tubo floral quase regular, verde a purpúreo e seis pétalas de igual tamanho. Entre as espécies que ocorrem no Brasil pode-se citar: *Cuphea aperta* Koehne, *C. calophylla* Cham. & Schltdl. (sinonímias: *C. anisophylla*, *C. mesostemon*, *C. microstyla*, *C. orthodisca*, *C. plumbaginea*, *Parsonsia calophylla*), *C. carthagenensis* (Jacq.) MacBride, *C. circaeoides* Sm. ex Sims, *C. fuscinervis* Koehne, *C. micrantha* Kunth (sinonímias: *C. hirta*, *C. rapunculoides*, *C. valerii*), *C. repens* Koehne, *C. tenuissima* Koehne (GRAHAM, 1998; MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2010).

Cuphea carthagenensis (Jacq.) MacBride (INTERNATIONAL PLANT NAME INDEX, 2010; MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2010) é denominada popularmente no Brasil de sete-sangrias (FARIAS et al., 1998; SIMÕES et al., 1998; DI STASI et al., 2002), cueca-de-velho, gervão (MARQUESINI, 1995) e guaxuma (MARONI; DI STASI; MACHADO, 2006); já na Nicarágua é conhecida como pica mano (COE, 2008). Diversas sinonímias científicas são descritas para a espécie: *Balsamona pinto* Vand., *Cuphea balsamona* Cham. & Schltdl., *Cuphea divaricata* Pohl ex Koehne, *Cuphea elliptica* Koehne, *Cuphea peplidioides* Martel ex Koehne, *Cuphea pinto* Koehne, *Lythrum carthagenense* Jacq., *Parsonsia balsamona* (Cham. & Schltdl.) Standl. e *Parsonsia pinto* (Vand.) A. Heller (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2010).

Outras espécies também são conhecidas como sete-sangrias: *Cuphea aperta* Koehne; *C. glutinosa* Cham. et Schl.; *C. ingrata* Cham. et Sch.; *C. ligustrina* Cham. et Schl.; *C. lysimachioides* Cham.; *C. organifolia* Cham. et Schl.; *C. spicata* Cav.; *Heliotropium clausenii* DC (Borraginaceae); *H. lanceolatum* Lofgr.; *Lihospermum officinale* L.; *Lithrum hyssopifolia* L.; *Symplocos platyphylla* Benth (Symplocaceae); *S. pubescens* Klotsch (CORRÊA, 1984). Algumas delas apresentam semelhanças morfológicas com *C.*

carthagenensis como, por exemplo, *C. calophylla* (MARODIN; BAPTISTA, 2001). Essa espécie também é considerada medicinal (MARQUESINI, 1995; SIMÕES et al., 1998), assim como *C. mesostemon* Koehne (LIMA et al., 2000), sinonímia de *C. calophylla*, e *C. aperta* Koehne. Esta última foi selecionada pelo Ministério da Saúde, através do Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais, da extinta Central de Medicamentos (CEME), como uma das prioritárias para pesquisas farmacológicas (BRASIL, 2006b). *C. aperta* é sinônimo de *C. carthagenensis* var. *aperta* (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2010). Portanto, *C. aperta* não é sinônimo de *C. carthagenensis*.

C. carthagenensis é uma espécie de porte herbáceo (**Figura 1**), de caule avermelhado lenhoso na base (**Figura 2**) e herbáceo na parte superior, ramificado, com 20 a 80 cm de altura (GRAHAM, 1930; MARONI; DI STASI; MACHADO, 2006), de ciclo vegetativo perene. Os caules são ligeiramente geniculados. As folhas medem de 15-40 a 5-20 mm, são elípticas, lanceoladas ou ovadas. Frequentemente, as folhas dos ramos são 2 a 3 vezes menores que as dos caules. Os pecíolos medem de 1 a 10 mm nas folhas inferiores, sendo as folhas superiores sésseis. As inflorescências apresentam-se em racimos foliosos com flores inconspícuas, 1 a 4 por nó, com pedicelos de 0,5 a 2 mm, tubo floral com 4 a 7 pétalas de 1 a 2 mm, púrpuras, com onze estames, profundamente incluídos (**Figura 3** e **Figura 4**) (GRAHAM, 1930). Apresenta muitas pilosidades glandulosas e ásperas no caule (MARONI; DI STASI; MACHADO, 2006).



Figura 1: Partes aéreas de *C. carthagenensis*. Disponível em: <http://www.plantatlas.usf.edu/>

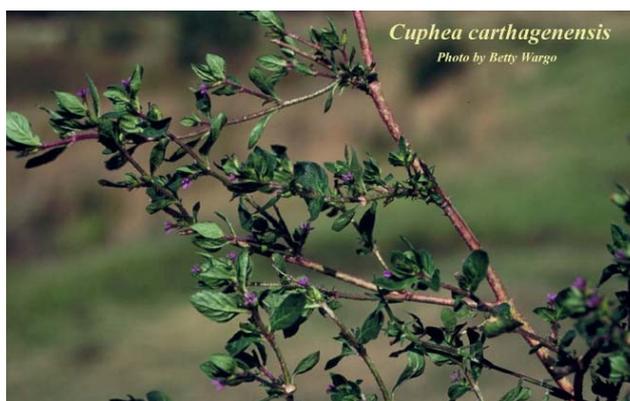


Figura 2: Partes aéreas de *C. carthagenensis*. Disponível em: <http://www.plantatlas.usf.edu/>



Figura 3: Inflorescências de *C. carthagenensis*. Disponível em: <<http://www.plantatlas.usf.edu/>>



Figura 4: Partes aéreas de *C. carthagenensis*. Disponível em: <<http://www.ib.unicamp.br/plant-ag-SP/familias/Lythraceae.html>>

3.1.2 Origem e distribuição geográfica

C. carthagenensis é endêmica do novo mundo (GRAHAM; FREUDENSTEIN; LUKER, 2006), sendo encontrada em diversos países das Américas: Argentina, Belize, Brasil, Caribe, Colômbia, Costa Rica, Equador, Estados Unidos, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname e Venezuela (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2010). A espécie é amplamente distribuída na América do Sul, especialmente na floresta atlântica (INSTITUTE OF PACIFIC ISLANDS FORESTRY, 2006). No Brasil, ocorre nos domínios fitogeográficos da amazônia, caatinga, cerrado, mata atlântica, pampa e pantanal (CAVALCANTI; GAHAM, 2010). É descrita como nativa em matas na Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Panamá e Peru; já nas ilhas do oceano Pacífico é considerada espécie invasora e introduzida (INSTITUTE OF PACIFIC ISLANDS FORESTRY, 2006).

A espécie geralmente ocorre em áreas pantanosas, mas também em terrenos rochosos com água corrente e costas arenosas (LOURTEIG, 1969). É abundante em áreas degradadas cobertas com vegetação secundária⁶ (RONDON NETO; GAMA, 2003). Trata-se de espécie ruderal, o que pode ser explicado pela grande produção de sementes, alta capacidade de adaptação e resistência (BOVE, 2003). Em Minas Gerais, ocorre em áreas

⁶ Considera-se vegetação secundária a que se desenvolve em terras que foram abandonadas depois que a cobertura original foi removida pela atividade humana (RONDON NETO; GAMA, 2003).

de campos rupestres, ecossistema localizado em altas altitudes caracterizado por solos arenosos e rochosos cobertos por vegetação herbácea (SANTOS; SALATINO; SALATINO, 1995). Em Porto Alegre, RS, pode ser encontrada na beira de estradas e campos (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006).

3.1.3 Obtenção

No Brasil, *C. carthagenensis* é obtida por extrativismo. Outras espécies do gênero são cultivadas em diversos países para produção de óleo fixo, a partir das sementes.

A farmacêutica responsável pelo laboratório de fitoterapia da Klabin do Paraná Produtos Florestais Ltda, Loana Aparecida Johansson, informou, através de comunicação pessoal, que a espécie é obtida na empresa por manejo de populações nativas e destinada à produção de formulações farmacêuticas. A coleta é realizada de outubro a fevereiro, sendo que apenas 50% dos exemplares são coletados, pois a espécie apresenta pouca produção e baixa dispersão de sementes, contrariando a descrição de Bove (2003). Os exemplares não coletados servem como porta-sementes e mantêm a sustentabilidade do sistema. O cultivo encontra-se em fase de experimentação, sendo a propagação realizada por sementes e por estaquia. Também devido a pouca produção de sementes, apenas 20% do total de plantas cultivadas são obtidas por sementeira.

Foram desenvolvidos estudos agrônômicos sobre quebra de dormência de sementes da espécie (MATHIONI et al., 2005) e influência do substrato, irrigação e da poda no desenvolvimento e produção de flavonoides em *C. carthagenensis*, obtida por sementeira. O estudo indicou que a retirada de 2/3 das folhas se mostrou adequado para melhorar a produção de biomassa, sem alterar a produção destes metabólitos secundários (DEZANET et al., 2007).

3.1.4 Usos populares

Devido ao seu uso tradicional, a espécie é citada na *Lista Não-Exaustiva de Nomes Associados à Biodiversidade de Uso Costumeyro no Brasil*, que tem como objetivo evitar registros indevidos de espécies de uso comum no país (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR, 2006).

C. carthagenensis é uma das espécies mais utilizadas com finalidades etnomédicas no Rio Grande do Sul (SIMÕES et al., 1998; GALVANI, BARRENECHE 1994). A espécie é

tradicionalmente usada para tratar doenças cardiovasculares (PAGLIANIRI, 1995; FREIRE, 1996; SIMÕES et al., 1998; MARODIN; BAPTISTA, 2001; VENDRUSCOLO, 2004), tais como hipertensão (GRENAND; MORETTI; JACQUEMIN, 1987; LIMA et al., 2007), aterosclerose e palpitação cardíaca, sendo também empregada no tratamento do diabetes (LIMA et al., 2007), como antipirético (OLIVEIRA, 1854; MOREIRA, 1971; FARIAS et al., 1998), laxante, diurético (FARIAS et al., 1998), diaforético (D'AVILA, 1910; HOEHNE, 1939; MACEDO et al., 1996; FARIAS et al., 1998), para tratar sífilis (D'AVILA, 1910; HOEHNE, 1939; GONZÁLEZ et al., 1994), malária (GONZÁLEZ et al., 1994; TOURSARKISSIAN, 1980), gota, indigestão, diarreia, infecção intestinal, varizes (VENDRUSCOLO, 2004), menstruação irregular, cólicas em bebês e picada de cobra (MARQUESINI, 1995).

No sul do Brasil *C. carthagenensis* é empregada no tratamento de mastite bovina (AVANCINI et al., 2008) e obesidade humana (DICKEL et al., 2007); em Minas Gerais como diurética e hipotensora (MACEDO et al., 1996). Na Guatemala, a espécie é usada para tratar gonorreia (GONZÁLEZ et al., 1994); já na Guiana Francesa, a infusão da planta inteira é utilizada popularmente como anti-hipertensivo e no tratamento de outras doenças cardiovasculares (GRENAND; MORETTI; JACQUEMIN, 1987). Na Nicarágua, de acordo com estudo etnobotânico, é incluída entre aquelas empregadas por parteiras para reduzir febre, tratar infecção vaginal, fraqueza e anemia; no entanto, foi uma das plantas medicinais menos citadas (COE, 2008).

Quanto à parte da planta utilizada, Paglianiri (1995), Freire (1996), Simões e colaboradores (1998), Dickel, Rats e Ritter (2008) e Vendruscolo (2007) relatam uso das partes aéreas; Lima e colaboradores (2007), das folhas. Schuldt e colaboradores (2000) e Macedo e colaboradores (1996) citam o emprego da planta inteira. Quanto a forma de uso Lima e colaboradores (2007) citam o infuso, e Coe (2008), o decocto.

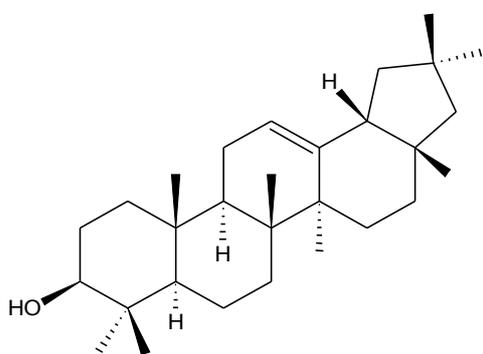
3.1.5 Composição química

Poucos trabalhos estão descritos na literatura sobre a química da espécie e os compostos responsáveis pela atividade anti-hipertensiva ainda não foram identificados, apesar de existirem indícios sobre sua natureza, baseado na composição química das frações bioativas, as quais contêm predominantemente substâncias polares (item 3.1.6).

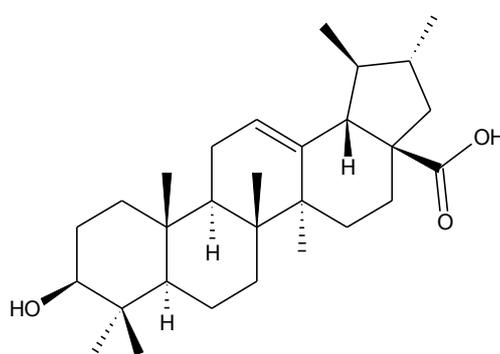
A prospecção fitoquímica de frações obtidas por partição do extrato bruto das folhas revelou a presença de triterpenos (fração diclorometânica), flavonoides e taninos (frações em acetato de etila e *n*-butanólica) e flavonoides (fração aquosa) (SCHULDT et al., 2000). Resultados semelhantes foram obtidos em outro estudo; no entanto, não foi detectada a

presença de taninos (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005).

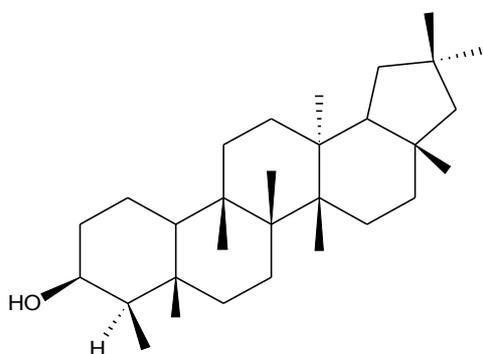
Estudo fitoquímico de partes aéreas de *C. carthagenensis* resultou no isolamento de triterpenos [derivados do oleanano, beta-amirina (**1**) e ácido ursólico (**2**); derivados do ursano, friedelan-3 β -ol (**3**) e ácido betulínico (**4**); cartagenol (**5**)], esteróides [ergosterol (**6**), beta-sitosterol (**7**), estigmasterol (**8**)], ácidos graxos saturados [ácidos láurico (**9**) e mirístico (**10**)] e insaturados [ácido linolênico (**11**)] e carboidrato [manitol (**12**)] (GONZÁLEZ et al., 1994). O flavonoide quercetina-3-sulfato (**13**) foi isolado como principal componente das folhas da espécie (FARIAS et al., 1998).



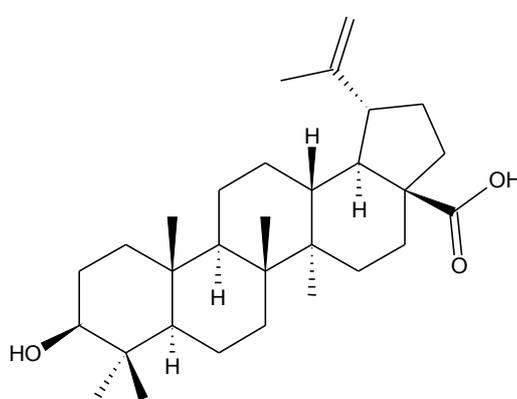
1



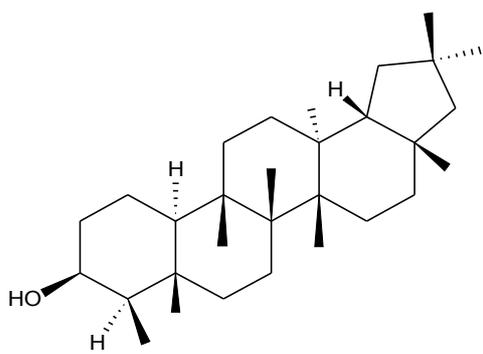
2



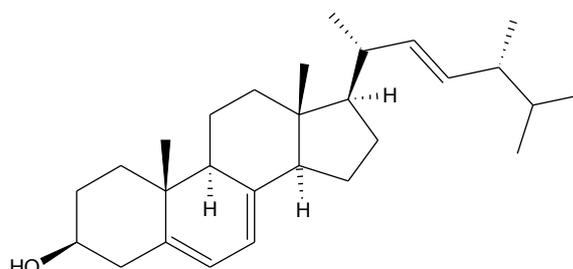
3



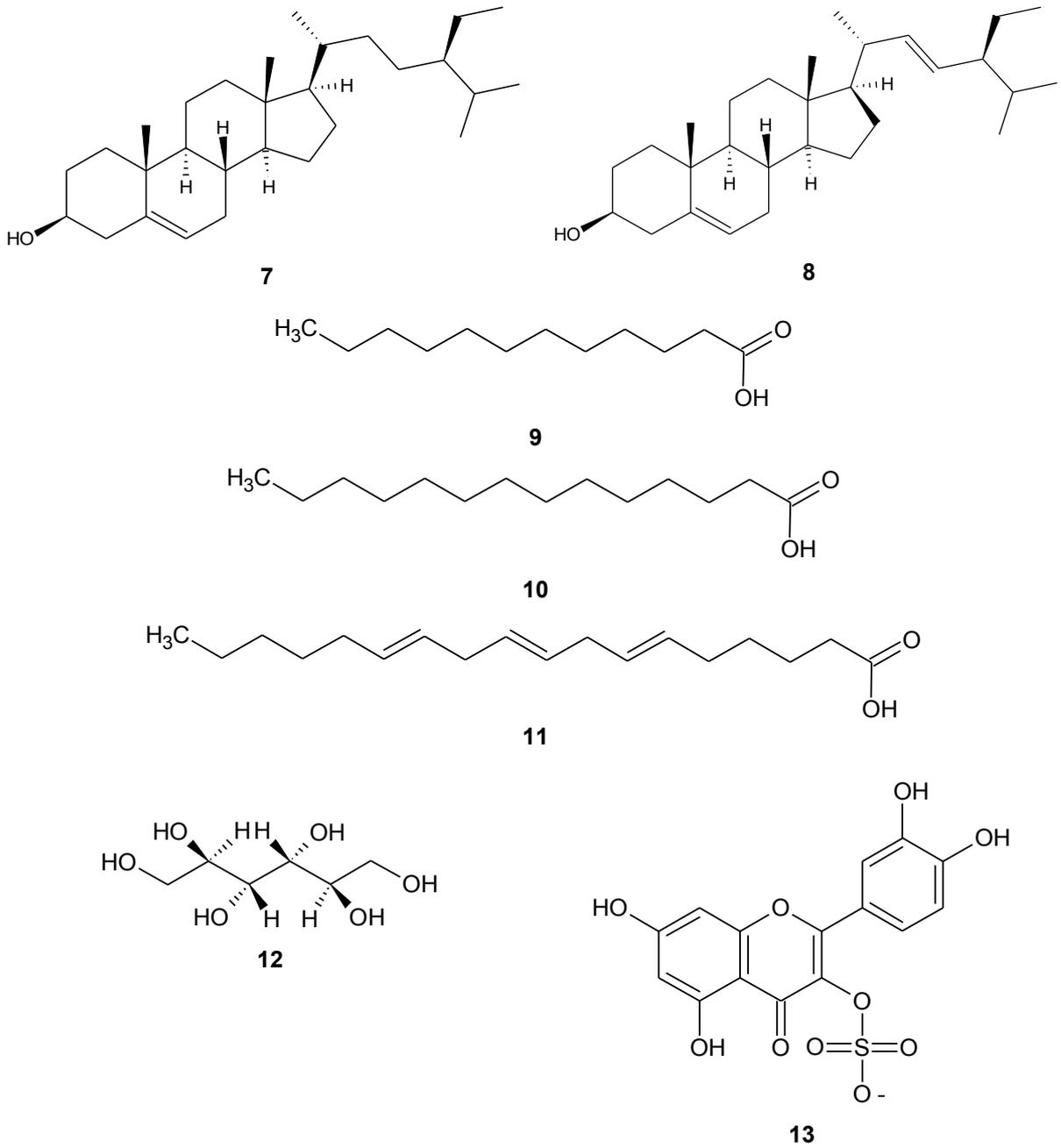
4



5



6



3.1.6 Atividades biológicas

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a potencial atividade anti-hipertensiva da espécie (BRAGA et al., 2000; OSSES, 2000; SCHULDT et al., 2000; SCHULDT et al., 2004) conforme descrito nos primeiros dois tópicos a seguir.

Atividade vasodilatadora

O extrato etanólico a 70% de partes aéreas de *C. carthagenensis* e suas frações *n*-butanólica e em acetato de etila induziram vasodilatação em preparações de anéis de aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina. A fração *n*-butanólica foi identificada como a mais ativa. Constatou-se que o pré-tratamento das preparações com N-nitro-L-arginina (L-NAME), um inibidor da óxido nítrico (NO) sintase, bloqueia a vasodilatação induzida pela fração *n*-butanólica. Além disso, a L-arginina, substrato da NO sintase, inibe competitivamente a capacidade da L-NAME de bloquear a produção de NO estimulada pela fração *n*-butanólica. Como a vasodilatação provocada pelo NO ocorre via ativação da guanilato ciclase, foi avaliado o efeito de substâncias que inibem a ativação da guanilato ciclase, neste caso, azul de metileno e 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3- α]quinoxalin-1-ona. As substâncias testadas antagonizaram o efeito vasodilatador da fração *n*-butanólica, reforçando a hipótese de que a vasodilatação causada pela fração *n*-butanólica é mediada por NO. Foi demonstrada, também, a capacidade de substâncias doadoras de NO em potencializar a ação vasodilatadora da fração *n*-butanólica (SCHULDT et al., 2000).

Atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina (ECA)

O extrato bruto em diclorometano:metanol (1:1) de folhas da espécie produziu 50% de inibição da ECA, quando avaliado na concentração de 0,33 mg/ml (BRAGA et al., 2000).

Por outro lado, a administração do extrato aquoso de partes aéreas da espécie a ratas normotensas e hipertensas não evidenciou a inibição da ECA como mecanismo da atividade hipotensora. Observou-se redução da pressão arterial a partir do sétimo dia de tratamento, não sendo detectada alteração significativa da atividade da ECA plasmática (OSSES, 2000).

Atividade antioxidante

Outra evidência do possível efeito benéfico de *C. carthagenensis* em doenças cardiovasculares é a atividade antioxidante *in vitro* relatada para o extrato hidroalcoólico a 70% de partes aéreas da espécie e para algumas frações derivadas deste (acetato de etila e *n*-butanólica). O extrato e as frações protegeram de dano oxidativo tanto em membranas fosfolipídicas de homogenatos de fígado de ratos quanto a desoxirribose. Também apresentaram atividade sequestradora de radical superóxido (O_2^-) e inibidora da enzima xantina oxidase, que produz radicais superóxido durante a transformação de xantina em ácido úrico (SCHULDT et al., 2004).

Estudos *in vitro* demonstram que compostos fenólicos como flavonoides, isoflavonas,

flavonas, antocianidinas e catequinas possuem atividade antioxidante superior às vitaminas C, E e β -caroteno (RICE-EVANS et al., 1997; KÄHKÖNEN et al., 1999). Tais atividades antioxidantes resultam da capacidade destes metabólitos secundários de atuar como agentes redutores, doar elétrons, e atuar como quelantes de metais (RICE-EVANS et al., 1997; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). No caso dos flavonoides, o flavanoil formado é estável e capaz de interagir com membranas celulares, possuindo a estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo mais efetivos que as vitaminas C e E (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Atividade hipocolesterolêmica

A atividade hipocolesterolêmica do infuso de folhas, administrado por 30 dias, foi demonstrada em estudos com ratos recebendo dieta hipercalórica. Não foi observada alteração significativa nos níveis de glicose e triacilglicerídeos (BIAVATTI et al., 2004).

Atividade antiviral

A atividade antiviral do extrato das partes aéreas de *C. carthagenensis* foi relatada para uma fração em acetato de etila da espécie, avaliada em ensaios *in vitro* frente ao vírus HSV-1, agente etiológico do herpes (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005).

Atividade antimicrobiana

O decocto de partes aéreas da plantas floridas inibiu *in vitro* o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*, agentes etiológicos da mastite bovina (AVANCINI et al., 2008).

Já o extrato em diclorometano / metanol 1:1 das partes aéreas, na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$, inibiu em $22,22 \pm 3,61\%$ o crescimento *in vitro* do *Trypanosoma cruzi*, resultado considerado negativo (SÜLSEN et al., 2006).

Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória

O extrato aquoso de partes aéreas inibiu parcialmente as contrações induzidas por ácido acético em camundongos, mas não o edema de pata causado por carragenina (FERNANDES et al., 2002).

Atividade ansiolítica

A atividade ansiolítica do extrato aquoso e de um precipitado obtido dele, não caracterizado quimicamente, foi demonstrada em camundongos no modelo de labirinto em

cruz elevado. O pré-tratamento dos animais com antagonistas de receptores nicotínicos neuronais foi capaz de reverter o efeito ansiolítico, o que sugere envolvimento destes receptores no efeito observado (LORENZO, 2000).

Outra evidência do envolvimento de receptores da acetilcolina na atividade biológica do extrato aquoso de *C. carthagenensis* foi apresentada em estudos com preparações de diafragma de camundongo. O extrato aquoso da espécie e suas frações revertem o bloqueio da transmissão neuromuscular produzido pelos antagonistas da acetilcolina, indicando possível interação dessas substâncias com o receptor nicotínico e o canal iônico associado (VIEL, 1998). Estudos posteriores indicaram que a reversão observada não é devida à interação com sítio de ligação da acetilcolina; porém, a interação com sítios alostéricos do receptor não foi descartada (VIEL, 2003).

3.1.7 Toxicologia

Em teste de toxicidade crônica⁷ (90 dias), a administração de infuso da planta inteira não alterou o peso corpóreo de ratos que ingeriram dieta calórica. As funções renal e hepática também não foram afetadas, observando-se, entretanto, aumento na vascularização hepática. Este dado poderia sugerir toxicidade, mas os autores recomendam estudos adicionais, pois esse efeito provavelmente se relaciona ao processo de detoxificação do extrato, comumente realizado pelo metabolismo hepático para diversos fitoterápicos (BIAVATTI et al., 2004).

A administração crônica do extrato aquoso (2% m/v, 72 °C, 30 min) de partes aéreas da espécie para ratas, durante 15 dias, não interferiu nos índices de fertilidade, gestação e viabilidades da prole (SANTOS et al., 1998).

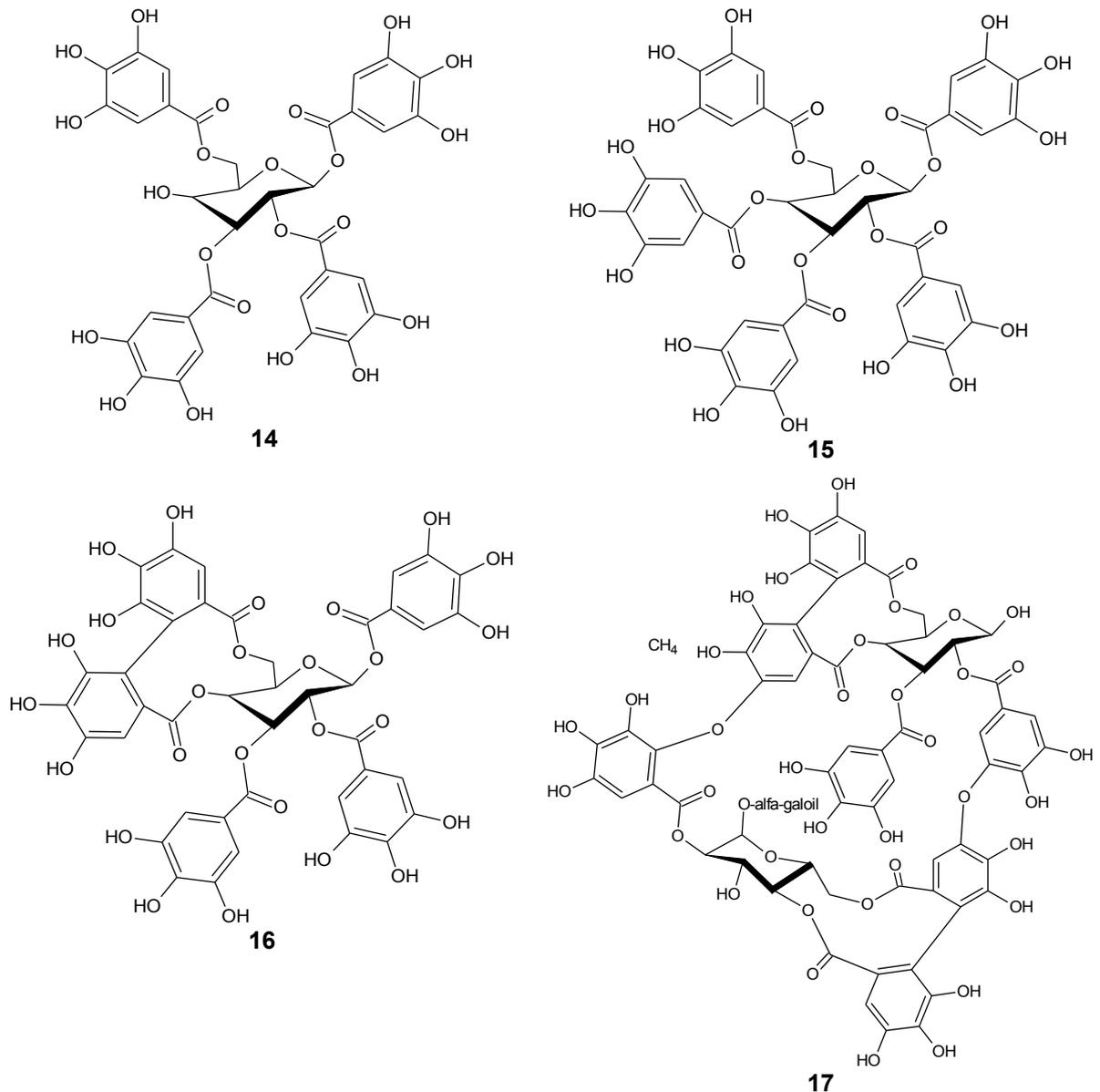
3.1.8 Composição química de outras espécies de *Cuphea*

Tendo em vista a possibilidade de ocorrência de metabólitos secundários em comum entre espécies do mesmo gênero, realizou-se levantamento bibliográfico sobre a química do gênero *Cuphea*.

Das partes aéreas de *C. hyssopifolia* foram isolados três taninos hidrolisáveis, 1,2,3,6-tetra-O-galoil-beta-D-glicose (**14**), 1,2,3,4,6-penta-O-galoil-beta-D-glicose (**15**) e telimagrandina II (**16**), quatro dímeros de taninos hidrolisáveis, woodfordina C (**17**),

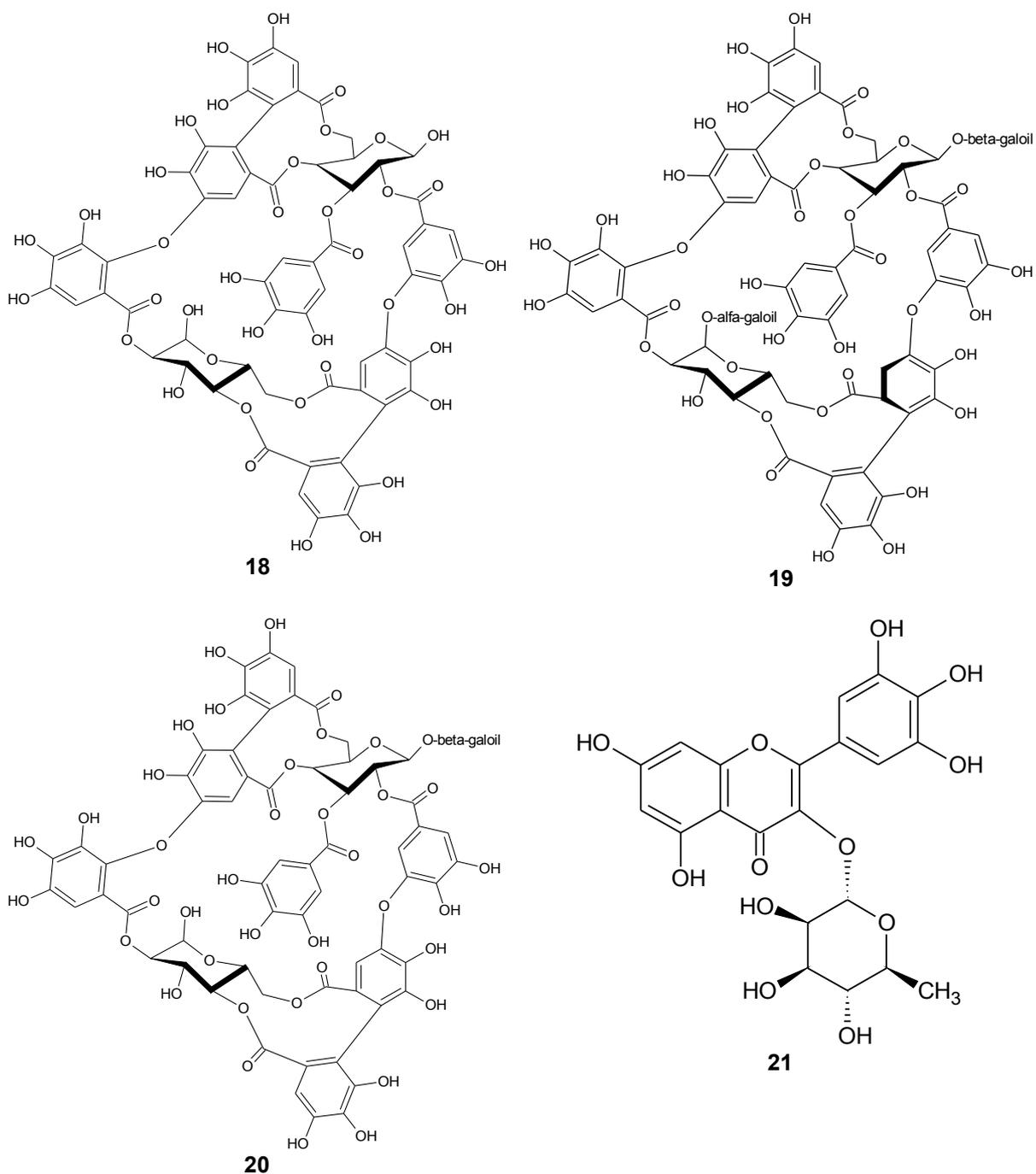
⁷ De acordo com a RDC 90 de 16 de março de 2004, da ANVISA.

oenoteína B (**18**), cufiina D1 (**19**), cufiina D2 (**20**), além do flavonoide miricitrina (**21**) (CHEN et al., 1999). Para os taninos **17**, **18**, **19** e **20** foi demonstrada atividade antitumoral *in vitro* (WANG; CHEN; YANG, 1999), assim como para **19** e **20** (WANG; CHEN; YANG, 2000; WANG; CHEN; YANG, 2002a; WANG; CHEN; YANG, 2002b).

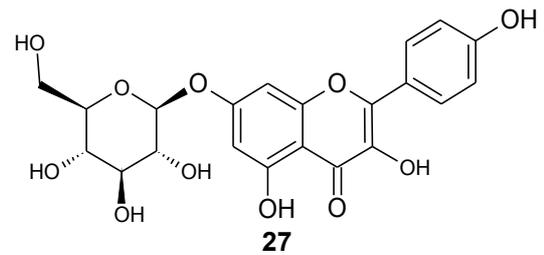
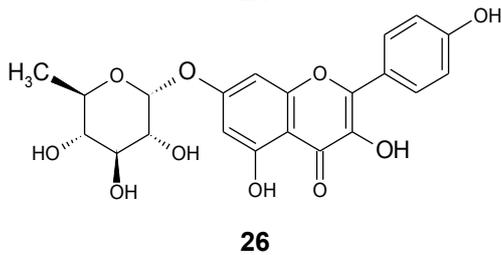
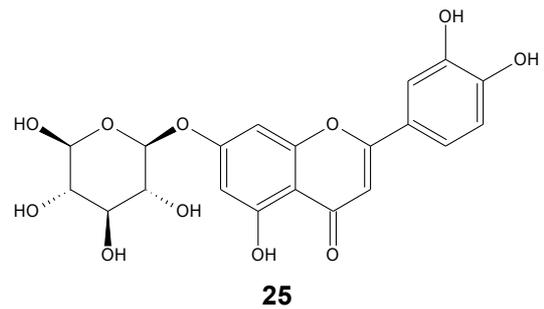
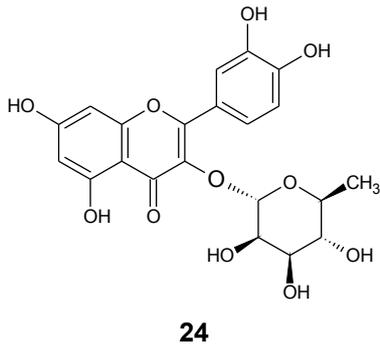
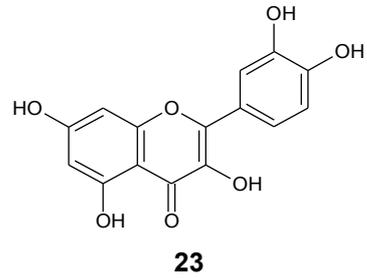
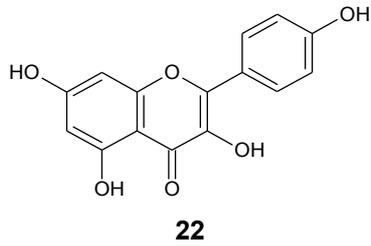


Na mesma planta podem ocorrer, simultaneamente, taninos hidrolisáveis e condensados, predominando um destes tipos. Taninos hidrolisáveis são característicos de dicotiledôneas, herbáceas e lenhosas e tem distribuição taxonômica restrita a algumas famílias. Quanto aos taninos condensados, têm sido identificados em todos os grupos

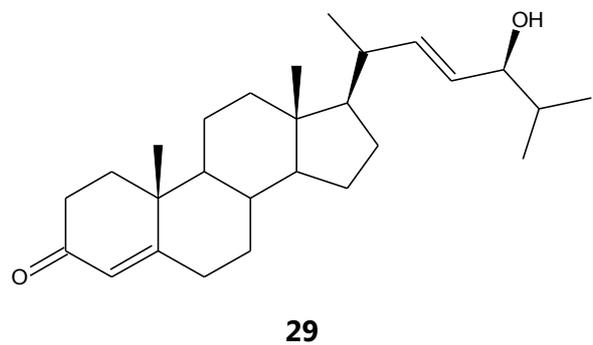
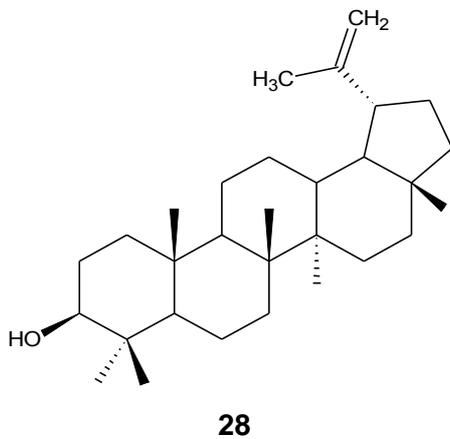
vegetais, inclusive gimnospermas e pteridófitas (CUNHA, 2005).



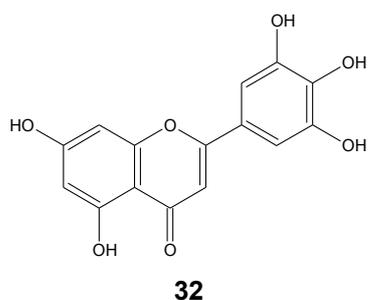
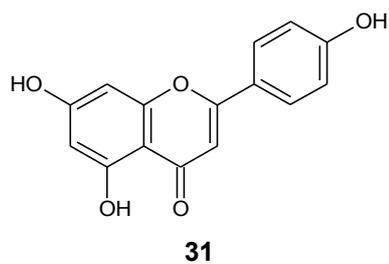
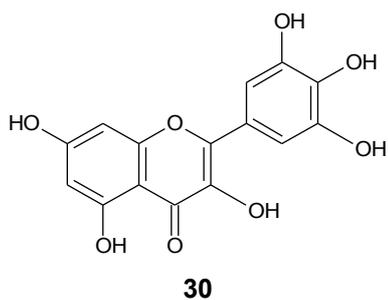
Das raízes de *C. pinetorum* foram isolados canferol (**22**) e quercetina (**23**) e, das partes aéreas, quercetina-3-O-alfa-ramnopiranosídeo (**24**), luteolina-7-O-beta-D-glicopiranosídeo (**25**), apigenina-7-O-alfa-ramnopiranosídeo (**26**), apigenina-7-O-beta-D-glicopiranosídeo (**27**), esqualeno e beta-sitosterol (**7**) (CALZADA, 2005).



Do extrato aquoso de *C. aperta* foram isolados os flavonoides canferol e quercetina, assim como ácido gálico, seu éster metílico e ácido 3,4-di-hidroxibenzóico. O extrato hexânico forneceu α e β -amirina (1), lupeol (28), estigmasterol (8), sitosterol (7), campestenona (29) (MARTINS; ROQUE, 1995).



A **Tabela 1** lista vários flavonoides isolados de folhas de diferentes espécies de *Cuphea*, estando representadas somente as estruturas químicas das agliconas correspondentes, canferol (**22**), quercetina (**23**), miricetina (**30**), apigenina (**31**) e luteolina (**32**) (SANTOS; SALATINO; SALATINO, 1995).



Do extrato de *C. wrightii* (toda a planta) foram isolados os flavonoides luteolina-7-O-glicosídeo e hiperina (quercetina-3-O-galactosídeo), assim como os triterpenos friedelan-3 β -ol (**3**), germanicol (**33**), ácido ursólico (**2**) e fernenol (**34**) (PEREZ-CASTORENA; MALDONADO, 2003).

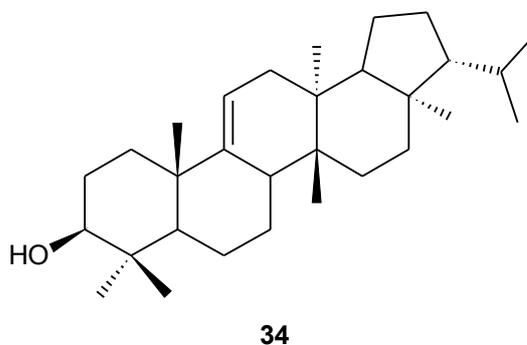
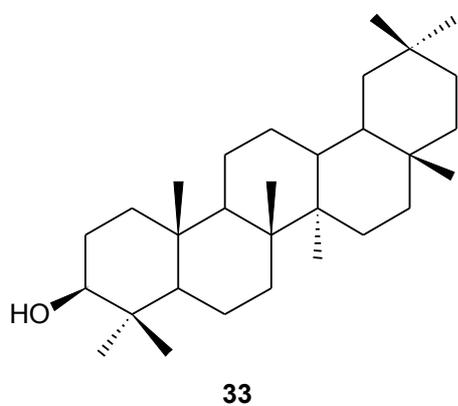


Tabela 1: Flavonoides isolados de folhas de *Cuphea* spp. por Santos, Salatino e Salatino (1995).

Flavonoide	Espécie
Apigenina-C-glicosídeo	<i>C. acinos</i> St.-Hill; <i>C. disperma</i> Koehne
Luteolina-7-O-galactosídeo	<i>C. sclerophylla</i> Koehne
Luteolina, glicose, ácido glicurônico*	<i>C. sclerophylla</i> Koehne
Canferol-3-O-galactosídeo	<i>C. ericoides</i> Cham. & Schlechd var <i>ericoides</i>
Canferol, galactose, glicose*	<i>C. pseudovaccinium</i> St.-Hill
Canferol, galactose, ramnose*	<i>C. pseudovaccinium</i> St.-Hill
Quercetina-3-O-arabinosídeo	<i>C. adenophylla</i> T. Cav.; <i>C. disperma</i> Koehne; <i>C. cruisiana</i> Koehne; <i>C. pulchra</i> Moric; <i>C. teleandra</i> Lourt.; <i>C. sessilifolia</i> Mart.
Quercetina-3-O-galactosídeo	<i>C. diosmifolia</i> St.-Hill; <i>C. disperma</i> Koehne; <i>C. pseudovaccinium</i> St.-Hill; <i>C. sclerophylla</i> Koehne; <i>C. rubrovirens</i> T. Cav.; <i>C. lutescens</i> Koehne; <i>C. ericoides</i> Cham. & Schlechd var <i>ericoides</i> ; <i>C. sessilifolia</i> Mart.
Quercetina-3-O-glicosídeo	<i>C. adenophylla</i> T. Cav.; <i>C. teleandra</i> Lourt.; <i>C. lutescens</i> Koehne
Quercetina-3-O-glicosídeo, arabinose, glicose*	<i>C. lutescens</i> Koehne
Quercetina-3-O-galactosilgalactosídeo	<i>C. adenophylla</i> T. Cav.; <i>C. pulchra</i> Moric;
Quercetina, galactose, glicose*	<i>C. rubrovirens</i> T. Cav.; <i>C. sessilifolia</i> Mart.
Quercetina, galactose, ácido glicurônico*	<i>C. sessilifolia</i> Mart.
Quercetina, galactose, ramnose*	<i>C. pseudovaccinium</i> St.-Hill
Quercetina, glicose, glicose*	<i>C. sessilifolia</i> Mart.; <i>C. adenophylla</i> T. Cav.;
Quercetina, glicose, ácido glicurônico*	<i>C. diosmifolia</i> St.-Hill.; <i>C. sessilifolia</i> Mart.
Quercetina, glicose, ramnose*	<i>C. cruisiana</i> Koehne; <i>C. teleandra</i> Lourt.
Quercetina-3-O-ramnosilglicosídeo	<i>C. sessilifolia</i> Mart.; <i>C. pulchra</i> Moric
Quercetina-3-di-O-glicosilglicosídeo	<i>C. disperma</i> Koehne
Ramnetina-3-O-galactosídeo	<i>C. diosmifolia</i> St.-Hill.; <i>C. rubrovirens</i> T. Cav.
Ramnetina-3-O-glicosídeo	<i>C. cruisiana</i> Koehne; <i>C. pulchra</i> Moric
Isoramnetina-3-O-arabinosídeo	<i>C. cruisiana</i> Koehne
Isoramnetina-3-O-galactosídeo	<i>C. acinos</i> St.-Hill; <i>C. cipoensis</i> T. Cav.; <i>C. teleandra</i> Lourt.
Isoramnetina-3-O-xilosídeo	<i>C. pulchra</i> Moric
Isoramnetina, glicose, ramnose*	<i>C. lutescens</i> Koehne
Miricetina-3-O-arabinosídeo	<i>C. lutescens</i> Koehne
Miricetina-3-O-galactosídeo	<i>C. cipoensis</i> T. Cav.; <i>C. diosmifolia</i> St.-Hill.; <i>C. sperguloides</i> St.-Hill.; <i>C. lutescens</i> Koehne; <i>C. sessilifolia</i> Mart.
Miricetina-3-O-glicosídeo	<i>C. diosmifolia</i> St.-Hill.; <i>C. linarioides</i> Koehne; <i>C. sclerophylla</i> Koehne
Miricetina-3-O-ramnosídeo	<i>C. linarioides</i> Koehne
Miricetina-3-O-arabinosilarabinosídeo	<i>C. ericoides</i> Cham. & Schlechd var <i>ericoides</i>
Miricetina, arabinose, galactose*	<i>C. lutescens</i> Koehne
Miricetina, glicose, ramnose*	<i>C. linarioides</i> Koehne
Miricetina-3-O-glicosilgalactosilgalactosídeo	<i>C. ericoides</i> Cham. & Schlechd var <i>ericoides</i>
Quercetina	<i>C. diosmifolia</i> St.-Hill.; <i>C. pseudovaccinium</i> St.-Hill.; <i>C. sclerophylla</i> Koehne; <i>C. cruisiana</i> Koehne
Miricetina	<i>C. pseudovaccinium</i> St.-Hill.; <i>C. pulchra</i> Moric

* Posição de ligação e sequência dos açúcares não determinada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos extratos e fracionamento preliminar

4.1.1 Equipamentos

- Percolador com 45 cm de altura e 38 cm de diâmetro (volume: 17 litros)
- Liofilizador FreeZone, modelo 77500, Labconco

4.1.2 Materiais

4.1.2.1 Material vegetal

O material vegetal foi doado pela empresa Klabin do Paraná Produtos Florestais Ltda, através da farmacêutica Loana Johansson, responsável pelo laboratório fitoterápico. A coleta das partes aéreas de *C. carthagenensis* foi realizada na mata nativa da empresa, localizada na Fazenda Monte Alegre, município de Telêmaco Borba, Paraná, sendo o manejo de plantas medicinais certificado pelo *Forest Stewardship Council* (SMARTWOOD, 2003).

A espécie foi identificada pela Prof^a. Dr^a. Cássia Mônica Sakuragui na Universidade Estadual de Maringá (UEM), no Paraná, em cujo herbário encontra-se depositada uma exsicata de referência, sob número 147 HKLABIN.

O material coletado foi seco em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 40 °C. Na sequência, foi fragmentado e armazenado em saco plástico. No total foram recebidos 6,35 kg de plantas secas de *C. carthagenensis*. Deste material, 3,15 kg foram moídos em moinho de facas e tamisado (850 µm/20 mesh).

4.1.2.2 Solventes

- Etanol comercial 96 ° GL;
- Solventes grau P.A: hexano, diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol, acetona, metanol, etanol absoluto (Quimex e F. Maia).

4.1.3 Extração e partição

Extrato bruto

Foi preparado extrato etanólico por percolação exaustiva das partes aéreas, secas e pulverizadas (1 kg), com etanol comercial 96 °GL. O solvente foi removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida, à temperatura máxima de 50 °C e o resíduo seco resultante constituiu o extrato bruto (EB, 171 g). O etanol destilado no evaporador rotatório sob pressão reduzida foi novamente adicionado ao percolador, sendo desta forma, reaproveitado. O extrato bruto foi empregado no processo de isolamento de flavonoides, foi caracterizado qualitativamente e quantitativamente, teve sua capacidade de dilatar aorta de rato determinada, sendo portanto um dos extratos utilizados para verificação da correlação entre composição química e atividade biológica.

Extrato aquoso

O extrato aquoso (EA) foi preparado por decocção das partes aéreas secas e pulverizadas. A proporção droga vegetal / água destilada foi de 2% m/v (BIAVATTI et al., 2004), sendo usados 18 g da droga vegetal para 900 ml de água. A droga foi deixada em contato com água quente à temperatura de 70 a 80 °C, sob agitação magnética, durante 10 min. O extrato foi liofilizado e o resíduo obtido denominado EA, sendo quimicamente caracterizado e empregado nos ensaios biológicos *in vitro*. Foram obtidas 3,30 g do extrato liofilizado.

Partição a partir do extrato bruto

Em função da massa de extrato bruto obtido (171 g) o procedimento de partição foi realizado em cinco repetições. O extrato bruto (EB, cerca de 30 g) foi ressuspenso em água destilada (cerca de 300 ml) e particionado sequencialmente com porções (3 × 50 ou 100 ml) de hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc) e *n*-butanol (BuOH). Durante a partição aconteceu formação de precipitado quando da adição de hexano e diclorometano, sendo apenas este último separado por centrifugação. Cada fração foi seca em evaporador rotatório sob pressão reduzida, com auxílio de etanol absoluto, quando necessário. A fração aquosa (AQ) resultante da partição foi tratada com metanol, sendo separada a fração aquosa solúvel em metanol (AQsol) daquela insolúvel (AQinsol). Na **Figura 5** está representado o fluxograma do fracionamento preliminar.

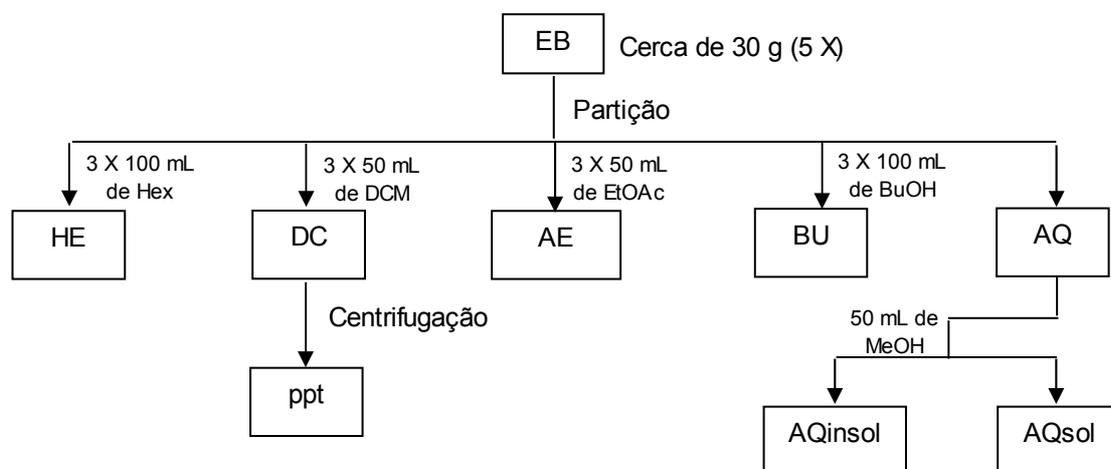


Figura 5: Fluxograma do fracionamento do extrato bruto (EB) por partição entre solventes imiscíveis, gerando as frações hexânica (HE), diclorometânica (DC), em acetato de etila (AE), *n*-butanólica (BU), aquosa solúvel em metanol (AQsol), aquosa insolúvel em metanol (AQinsol) e precipitado (ppt).

O rendimento das frações resultantes da partição e sua coloração encontram-se na **Tabela 2**.

Tabela 2: Rendimento e coloração das frações resultantes do fracionamento do extrato bruto de *C. carthagenensis* por partição entre solventes imiscíveis.

Fração	Massa total (g)	Extrativos (%) em relação ao extrato bruto	Coloração
Aquosa	84,21	55,9	Avermelhada
<i>n</i> -butanólica	13,89	9,2	Amarelada
Acetato de etila	3,00	2	Castanha avermelhada
Ppt diclorometano/água	1,72	5,5	Castanha
Diclorometânica	2,64	1,8	Verde
Hexânica	23,00	23	Verde escuro

Extrato aquoso para isolamento:

O extrato aquoso utilizado para isolamento dos constituintes químicos (item 4.6.3) foi preparado por decocção. Foram pesados 172,9 g da droga vegetal, transferidos para béquer de 1000 ml. O volume foi completado com água destilada. A extração aconteceu durante 10 min à temperatura de 70 a 80 °C sob agitação magnética. O extrato foi filtrado em algodão e, sem ter sido previamente seco, foi submetido à partição com 50 ml de hexano (para eliminação de substâncias menos polares), duas porções de 50 ml de acetato de etila e duas porções de 50 ml de *n*-butanol, resultando nas respectivas frações, cujos rendimentos constam da **Tabela 3**.

Tabela 3: Massa das frações resultantes da partição do extrato aquoso de *C. carthagenensis* e rendimento calculado em relação à massa da droga vegetal de partida.

Fração	Massa (mg)	Rendimento (% p/p)
<i>n</i> -butanólica	1.456	0,581
Acetato de etila	279	0,161

4.2 Análises cromatográficas qualitativas

A fim de verificar a eficiência dos processos de extração e partição na obtenção de preparações com composição química diferenciada, os extratos e frações obtidos foram caracterizados por análises de CCD e CLAE. Como o objetivo do trabalho era investigar apenas os componentes solúveis em solventes com polaridade igual ou superior ao *n*-butanol, as frações hexânica, diclorometânica e em acetato de etila não foram caracterizadas nem submetidas ao ensaio de vasorelaxação.

Essas análises também objetivaram o desenvolvimento de perfis cromatográficos para auxiliar na identificação química da espécie, como complemento a identificação botânica, fornecendo subsídios ao controle de qualidade de extratos de *C. carthagenensis*.

4.2.1 Equipamento

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Waters, com injetor automático 2695, degaseificador em linha AF, detector de arranjo de diodos (DAD) 2996, bomba modelo L-6200A e software Waters Empower para análise e processamento de dados.

4.2.2 Materiais

4.2.2.1 Solventes

- Solventes grau HPLC: acetonitrila e metanol, Tedia.
- Ácido fosfórico grau P.A, Merck.
- Solventes grau P.A: acetato de etila, ácido acético glacial e ácido fórmico, Quimex.

4.2.2.2 Soluções reveladoras para cromatografia em camada delgada

- Solução de anisaldeído: misturaram-se 0,5 ml de anisaldeído, 10 ml de ácido acético glacial, 85 ml de metanol e 5 ml de ácido sulfúrico a 98% v/v, nesta ordem, sob resfriamento.
- Solução de cloreto férrico a 10% em água. Solubilizaram-se 10 g de cloreto férrico em 100 ml de água destilada.
- Reagente de Liebermann-Buchard: adicionaram-se 5 ml de anidrido acético e 5 ml de ácido sulfúrico a 98% v/v à 50 ml de álcool etílico absoluto, sob resfriamento.
- Solução de reagente para produtos naturais (NP/PEG): dissolveu-se 0,1 g de difenilboriloxietilamina em 10 ml de metanol (NP). Solução de polietilenoglicol (PEG): dissolveu-se 0,5 g de polietilenoglicol 4000 (PEG) em 10 ml de etanol. No momento da revelação, a placa foi borrifada inicialmente com NP e em seguida com PEG.
- Vanilina clorídrica: solução etanólica de vanilina a 1%. No momento da revelação, a placa foi borrifada inicialmente com vanilina a 1% e em seguida com ácido clorídrico concentrado.
- Solução de cloreto de alumínio hexa-hidratado a 5% em metanol: dissolveram-se 5 g de cloreto de alumínio em 100 ml de metanol, em capela (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984).

4.2.2.3 Substâncias de referência

- Quercetina diidratada (Sigma).
- Rutina (Maxpharma).
- Isovitexina (Extrasynthese).
- Galocatequina (Sigma).
- Epigalocatequina (Sigma).
- Galato de epigalocatequina (Sigma)
- Catequina (Sigma).

4.2.2.4 Outros materiais de consumo

- Placas de sílica gel 60 G (Merck) com 0,25 mm de espessura, confeccionadas no

próprio laboratório de fitoquímica, com espalhadores, tendo como suporte placas de vidro

- Coluna analítica para CLAE, Agilent, LiChrospher 100, octadecilsilano (ODS), partículas de 5 µm, dimensões internas 125 × 4 mm, com pré-coluna LiChrospher 100 ODS, 5 µm, 4 × 4 mm de diâmetro interno

4.2.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foi empregado sistema para heterosídeos de flavonoides de acordo com Wagner, Bladt e Zgainski (1984), cuja fase móvel é constituída por acetato de etila / ácido fórmico / ácido acético / água (40: 4,4: 4,4: 10). Foram utilizadas placas de vidro cobertas por sílica gel como fase estacionária e como reveladores cloreto de alumínio, NP/PEG, anisaldeído, Lieberman-Buchard, vanilina clorídrica e cloreto férrico (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984). Rutina, quercetina e CC1, cujo isolamento e elucidação estrutural encontram-se descritos nos itens 4.6 e 4.7, foram empregadas como substâncias de referência.

Cada amostra foi preparada pesando-se 1 mg, que foi solubilizado ou suspenso em 0,5 ml de metanol. Procurou-se aplicar volumes iguais de cada extrato ou fração.

4.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.2.4.1 Desenvolvimento das condições de análise

Preparo das amostras

O extrato bruto na concentração de 1,0 mg/ml foi utilizado no desenvolvimento das condições de análise. Pesou-se 1,0 mg diretamente em frasco plástico do tipo *safe-lock*, adicionou-se 1 ml de metanol grau HPLC, e deixou-se o extrato em banho de ultrassom, por cerca de 1 min, até completa solubilização. Centrifugou-se em microcentrífuga (10.000 r.p.m., 10 min) e, finalmente, transferiu-se o sobrenadante para *vial* utilizado em sistema de amostrador automático para CLAE. Foi realizado um branco das corridas cromatográficas a partir da injeção do metanol empregado na solubilização das amostras.

Foram empregadas, como substâncias de referência, quercetina, isovitexina, galocatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina e catequina; solubilizados em metanol.

Condições avaliadas

A eluição foi realizada com gradiente de acetonitrila e água purificada por sistema Milli Q, ambos contendo 0,1% de ácido fosfórico, com fluxo de 1,0 ml/min e temperatura da coluna de 40 ± 5 °C (**Tabela 4**, condição A). Após o término de cada corrida foi realizado procedimento para limpeza e estabilização da coluna. Este compreendeu aumento na proporção do modificador orgânico para 95% em 2 min, manutenção desta proporção por 7 min, seguido de gradiente reverso de 95% de CH₃CN até a proporção inicial da análise seguinte em 2 min. Para estabilização da coluna manteve-se a composição inicial da fase móvel por 10 min.

Inicialmente foi obtido perfil cromatográfico para o extrato bruto, utilizando-se gradiente exploratório, conforme especificado na **Tabela 4**, condição A. As principais condições cromatográficas avaliadas também estão descritas nesta tabela.

As condições foram avaliadas conforme sua capacidade de separar os componentes do extrato para análise qualitativa; não se buscou, nessa etapa, obter separação em nível de linha de base dos picos, necessária para quantificação. Considerou-se que quanto maior o número de picos obtidos melhor a condição.

Tabela 4: Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método de análise qualitativa de extratos e frações de *C. carthagenensis* por CLAE.

Condição	CH ₃ CN (%)	Tempo (min)	Tipo de gradiente	Inclinação do gradiente (%CH ₃ CN / min)
A	5 – 95	60	Linear	1,5
B	5 – 35	40	Linear	0,75
C	0 – 40	60	Linear	0,67
D	5 – 10	2	Linear segmentado	2,5
	10 – 20	10		1
	20 – 25	2		2,5
E	5 – 12	2	Linear segmentado	3,5
	12 – 24	14		0,85
	24 – 28	2		2,0
F	5 – 12	2	Linear segmentado	3,5
	12 – 24	24		0,5
	24 – 28	2		2,0
G	5 – 12	2	Linear segmentado	3,5
	12 – 20	16		0,5
	20 – 28	2		4,0

4.2.4.2 Perfil cromatográfico dos extratos e frações

Preparo das amostras e condição cromatográfica

Pesou-se 1 mg de cada extrato ou fração diretamente para frasco plástico do tipo

safe-lock, adicionou-se 1,0 ml de metanol grau HPLC, deixando-se os frascos em banho de ultrassom, cerca de 1 minuto, até completa solubilização ou suspensão, no caso do extrato aquoso e da fração aquosa insolúvel em metanol. Centrifugou-se em microcentrífuga (10.000 r.p.m., 10 min) e, finalmente, transferiu-se o sobrenadante para *vial* utilizado em amostrador automático para sistema de CLAE.

As condições de análise foram aquelas descritas na **Tabela 4**, "condição G"; CC1, CC3 e CC4, substâncias uso isolamento está descrito no item 4.6, foram utilizada como substância de referência. A identificação, nos cromatogramas dos extratos e frações, dos picos correspondentes às substâncias de referência aconteceu por comparação entre tempo de retenção e espectro de absorção no ultravioleta.

4.3 Doseamentos de taninos, flavonoides e proantocianidinas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível

4.3.1 Equipamentos

- Espectrofotômetro de absorção no ultravioleta e visível, Perkin Elmer, modelo Lambda 20.

4.3.2 Materiais

4.3.2.1 Reagentes e solventes

- Reagente de Folin-Denis: a 75 ml de água adicionar 10 g de tungstato de sódio, 2 g de ácido fosfomolibdico e 5 ml de ácido fosfórico. Manter a mistura em refluxo por 2 h, resfriar e diluir a 100 ml com água. A solução obtida apresenta coloração esverdeada (FARMACOPEIA Brasileira, 2002).
- Carbonato de sódio (solução reagente): adicionar 10,6 g para cada 100 ml de água destilada (FARMACOPEIA Brasileira, 2002).
- Polivinilpirrolidona (PVPP, Divergan).
- Cloreto de alumínio (solução reagente): solubilizar 2,0 g em 100,0 ml de solução de ácido acético glacial a 5% em metanol.
- Metenamina 0,5% m/v, solução aquosa

- Ácido clorídrico 25% m/v (EUROPEAN Pharmacopoeia, 2005a, b; FARMACOPEIA Brasileira, 2001).
- *n*-Butanol e acetona PA, Quimex, F. Maia.

4.3.2.2 Outros materiais de consumo

- Cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm;
- Balões volumétricos e pipetas volumétricas calibrados.

4.3.3 Doseamento de flavonoides totais

A quantificação dos flavonoides totais foi realizada por método espectrofotométrico, após reação com cloreto de alumínio (FRANZ; KOEHLER, 1992; FARMACOPEIA Brasileira, 2001; EUROPEAN Pharmacopoeia, 2005a), empregando-se metade dos volumes preconizados e adaptando o método para análise de extratos, conforme descrito a seguir. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como porcentagem média de flavonoides totais, calculados como quercetina anidra, seguido dos valores de desvio padrão.

4.3.3.1 Curva de analítica

Para a construção da curva de analítica foram utilizadas soluções de quercetina diidratada com 1,0 ml de solução de cloreto de alumínio hexa-hidratado, completadas com solução metanólica de ácido acético a 5%. As soluções foram preparadas a partir de solução mãe a 100 µg/ml de quercetina diidratada em metanol, conforme discriminado na **Tabela 5**, obtendo-se as concentrações de quercetina anidra de 0,894; 1,79; 3,57; 7,15 e 10,7 µg/ml. Ou seja, a concentração foi corrigida para ser expressa em quercetina anidra.

A leitura foi realizada em comprimento de onda de 425 nm. Este procedimento foi repetido três vezes, em dias diferentes, sendo os dados submetidos à regressão linear através do programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software), e seguido da avaliação da equivalência estatística entre as curvas obtidas.

Tabela 5: Volume de solução mãe, volume final após diluição e concentração de quercetina empregadas na construção das curvas analíticas para o doseamento espectrofotométrico de flavonoides totais.

Volume da solução mãe (ml)	Volume final diluído (ml)	Concentração de quercetina anidra ($\mu\text{g/ml}$)
1,00	100,0	0,894
1,00	50,0	1,79
1,00	25,0	3,57
2,00	25,0	7,15
3,00	25,0	10,7

4.3.3.2 Determinação da tomada de amostra

A massa descrita na **Tabela 6** para o extrato bruto foi determinada a partir do rendimento de extrato bruto em relação à droga vegetal (15% m/m). Para a tomada de amostra do extrato aquoso e das frações foram realizadas análises comparativas da área do pico (CLAE), empregando-se o sistema otimizado para quantificação de flavonoides descrito no item 4.8.3, cujos resultados são apresentados no item 5.7.1.6.

Tabela 6: Massa aproximada da tomada de amostra de extratos e frações para o doseamento de flavonoides totais por espectrofotometria no UV-Vis.

Extrato / fração	Massa pesada
Extrato bruto	60,0 mg
Extrato aquoso	60,0 mg
Fração <i>n</i> -butanólica	20,0 mg
Fração aquosa insol. em metanol	180,0 mg
Fração aquosa sol. em metanol	180,0 mg
Precipitado	20,0 mg

4.3.3.3 Determinação do teor de flavonoides totais nos extratos e frações

O extrato ou fração foi pesado, conforme as massas discriminadas na **Tabela 6**, e transferido para balão de fundo redondo de 125 ml. Foram adicionados 0,5 ml de solução aquosa de metenamina 0,5% m/v, 10 ml de acetona e 3,5 ml de HCl 25% (m/v), deixando-se em ebulição, sob refluxo, por 30 min. Após resfriamento, o extrato foi filtrado por algodão para balão volumétrico de 50,0 ml. Lavou-se com acetona o resíduo presente nas vidrarias, transferindo-se a solução para o balão volumétrico de 50,0 ml. O volume do balão volumétrico foi completado para 50,0 ml com acetona. Deste extrato foram transferidos 10,0 ml para o funil de separação, sendo adicionados ao mesmo 10 ml de água. A solução foi extraída uma vez com 8 ml e três vezes com 5 ml de acetato de etila. As fases em acetato

de etila foram reunidas em outro funil de separação, lavadas duas vezes com 25 ml de água, transferidas para um balão volumétrico de 25,0 ml através de filtração por sulfato de sódio anidro (5 g), completando-se o volume com acetato de etila. Esta solução foi denominada solução mãe.

Para o preparo da solução de análise, tomou-se uma alíquota de 10,0 ml da solução mãe, a qual foi transferida para balão volumétrico de 25,0 ml. Adicionou-se 1,0 ml de solução de cloreto de alumínio hexa-hidratado e completou-se o volume com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v).

Como branco, para a leitura no espectrofotômetro, empregou-se solução de compensação, obtida pela diluição de alíquota da solução mãe (10,0 ml) em balão volumétrico de 25,0 ml com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v).

A absorção da solução de análise foi determinada após 30 min da adição da solução de cloreto de alumínio, em comprimento de onda de 425 nm, empregando-se como branco a solução de compensação. O resultado foi expresso como porcentagem de flavonoides totais calculados como quercetina anidra, obtido a partir da equação da reta das curvas analíticas, detalhado no Apêndice A.

4.3.4 Doseamento de taninos totais

O doseamento de taninos totais foi realizado com base no método espectrofotométrico descrito na Farmacopeia Brasileira IV (2002) para a droga vegetal cascas de *Stryphnodendron adstringens*. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média e desvio padrão da porcentagem de taninos totais.

4.3.4.1 Substituição do adsorvente

O método foi modificado, introduzindo-se PVPP como adsorvente, em substituição ao pó de pele. Para investigar a validade da modificação, a droga vegetal foi quantificada segundo o método original e com PVPP (200 mg), sendo os resultados comparados por teste *t* de Student ($\alpha = 0,05$), através do programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). No entanto, não foi realizada validação completa para a troca de pó de pele por PVPP.

4.3.4.2 Curvas analíticas

Foram obtidas três curvas analíticas com pirogalol, em três dias diferentes, sendo utilizada regressão linear e análise de covariância para obter o coeficiente de determinação (r^2) e avaliar diferenças entre as curvas, respectivamente (GraphPad Prism 4, GraphPad Software).

Através da equação da reta obtida a partir das curvas analíticas, obteve-se a absorvância equivalente à concentração de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de pirogalol, que foi empregada na fórmula fornecida pela farmacopeia, descrita no item 4.3.4.3.

Dissolveram-se 50 mg de pirogalol completando-se o volume para 100 ml com água destilada. Diluíram-se alíquotas desta solução (0,625, 1,25, 2,5, 5 e 7,5 ml) para 100 ml com água. Misturaram-se 5 ml de cada solução diluída com 2 ml do reagente de Folin-Denis, completando-se o volume para 50 ml com solução de carbonato de sódio 10,6% m/v. A absorvância foi medida em $\lambda = 715 \text{ nm}$ exatamente 3 min após a adição do último reagente e dentro de 15 min contados da dissolução do pirogalol utilizando água como branco. Para evitar a degradação do pirogalol pela luz, todos os balões foram cobertos com papel alumínio.

4.3.4.3 Determinação do teor de taninos totais nos extratos e frações

Os balões empregados no doseamento foram cobertos com papel alumínio para evitar degradação pela ação da luz.

Para as análises, as amostras (cerca de 150,0 mg) foram previamente trituradas em gral de vidro e então solubilizadas em água (cerca de 5 ml). Quando necessário, foi adicionada pequena quantidade de etanol (cerca de 2,5 ml) e procedeu-se à solubilização com auxílio de banho de ultrassom e/ou em banho-maria a 80 °C, por cerca de 2 min. A amostra solubilizada foi transferida para balão de fundo redondo de 250 ml, sendo adicionados 150 ml de água destilada isenta de gás carbônico, obtida por fervura prévia da água por 15 min. O extrato foi aquecido em banho-maria, sob refluxo, por 30 min. Após resfriamento, o mesmo foi transferido para balão volumétrico, diluído a 250 ml com água e filtrado através de algodão. Os primeiros 50 ml do filtrado foram desprezados e o restante constituiu a solução mãe.

Para determinação de polifenóis totais foram transferidos 5 ml da solução mãe para balão volumétrico de 25 ml, sendo o volume completado com água. Misturaram-se 5 ml desta solução com 2 ml do reagente de Folin-Denis e diluiu-se a 50 ml com solução de

carbonato de sódio a 10,6% (m/v). A absorvância foi medida em comprimento de onda igual a 715 nm, exatamente 3 min após a adição do último reagente, utilizando água como branco.

A determinação de polifenóis não adsorvidos foi realizada pela adição de 0,2 g de PVPP a 20 ml da solução mãe. A mistura foi mantida em plataforma de agitação orbital (100 r.p.m) por 60 min e filtrada. Diluíram-se 5 ml dessa solução para 25 ml com água em balão volumétrico. A uma alíquota de 5 ml dessa solução adicionaram-se 2 ml de reagente de Folin-Denis, seguindo-se diluição a 50 ml com solução aquosa de carbonato de sódio a 10,6% (m/v). Mediu-se a absorvância da solução em $\lambda = 715$ nm, exatamente 3 min após a adição do último reagente, utilizando água como branco (FARMACOPEIA Brasileira, 2002).

O cálculo do teor de taninos foi realizado através da expressão:

$$TT = \frac{13,12 \times (A_1 - A_2)}{A_3 \times m}$$

Onde, TT = porcentagem de taninos totais;

A_1 = absorvância medida para polifenóis totais;

A_2 = absorvância medida para polifenóis não adsorvidos;

A_3 = absorvância medida para a solução de pirogalol;

m = massa do extrato ou fração, em gramas (FARMACOPEIA Brasileira, 2002).

4.3.5 Doseamento de proantocianidinas totais

O método empregado no doseamento de proantocianidinas encontra-se descrito na Farmacopeia Europeia para *Crataegus* (EUROPEAN Pharmacopoeia, 2005b). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.3.5.1 Método de doseamento

A 100 mg do extrato ou fração foram adicionados 10 ml de álcool a 70% (v/v), 5 ml de ácido clorídrico a 25% (m/v) e 10 ml de água destilada. No caso do extrato bruto (EB), utilizou-se etanol a 95%. A solução foi aquecida sob refluxo por 80 min. Após resfriamento, a mesma foi filtrada para balão volumétrico de 100 ml, sendo o resíduo lavado com etanol a 70% (v/v) até se obter filtrado incolor. O volume foi completado com etanol 70% (v/v). Transferiram-se 50,0 ml dessa solução para balão de fundo redondo de 100 ml para concentrá-la até volume de aproximadamente 3 ml em evaporador rotatório sob pressão

reduzida (60 °C). A solução concentrada foi transferida para funil de separação e o balão de fundo redondo foi lavado sequencialmente com 10 e 5 ml de água destilada. As proantocianidinas foram extraídas dessa solução por partição com *n*-butanol (3 × 15 ml). As fases orgânicas foram reunidas em balão volumétrico de 100 ml e a absorvância da solução resultante foi medida em $\lambda = 545$ nm. O resultado foi expresso em porcentagem de proantocianidinas calculadas como cloreto de cianidina.

O cálculo do teor de proantocianidinas foi realizado através da expressão:

$$P (\%) = (A \times 500) / 75 \times m$$

Onde: P (%) = porcentagem de proantocianidinas

A = absorvância

m = massa do extrato/ fração em gramas (EUROPEAN Pharmacopoeia, 2005b).

4.4 Avaliação da atividade biológica

4.4.1 Ensaio *in vitro* de vasodilatação em anéis de aorta

Foram avaliados os extratos (EB e EA) e frações (BU, ppt, AQ sol e AQ insol), assim como a substância CC1, cujo isolamento e elucidação estrutural encontram-se descritos nos itens 4.6.3 e 5.6.1.

Os ensaios biológicos *in vitro* foram executados pela doutoranda, no laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Instituto de Ciências Biológicas, sob supervisão e orientação do Prof. Dr. Steyner F. Côrtes.

4.4.1.1 Equipamentos

- Transdutores isométricos (Fort10) conectados a amplificador (TBM4) e a sistema de aquisição computadorizada de dados (CVMS; World Precision).
- Cubas com sistema de aquecimento e sistema para montagem dos anéis de aorta que permite medir a tensão aplicada.

4.4.1.2 Animais

- Ratos Wistar, com massa corporal entre 200 e 250 g. O projeto foi aprovado pelo

Comitê de ética em experimentação animal (CETEA) da UFMG, sendo o número do protocolo 17/2008 (Anexo A).

4.4.1.3 Materiais e reagentes

- Guilhotina artesanal
- Solução Krebs-Henseleit de incubação preparada no laboratório: 135 mM de NaCl; 5 mM de KCl; 1,17 mM de KH₂PO₄; 1,40 mM de MgSO₄; 20,0 mM de NaHCO₃; 11 mM de glicose e 2,50 mM de CaCl₂.
- Fenilefrina, Sigma.
- Acetilcolina, Sigma.
- Etanol P.A., Synth.
- DMSO, Sigma.

4.4.1.4 Avaliação da atividade de extratos e frações

Os animais de experimentação foram sacrificados por decapitação e a aorta torácica foi cuidadosa e rapidamente dissecada e colocada em solução de Krebs-Henseleit a 4 °C. Após a remoção dos tecidos adiposo e conectivo, anéis de 3-4 mm de comprimento foram cortados e fixados em cubas de órgãos isolados contendo 10 ml de solução de Krebs-Henseleit, mantidas à temperatura de 37 °C e aeradas com carbogênio (mistura de O₂ e CO₂ na proporção de 95:5 v/v). Os anéis de aorta foram mantidos sob tensão de um grama-força por um período de estabilização de 60 min. Durante esse período, o meio de incubação (solução de Krebs-Henseleit) foi trocado a cada 15 min.

Após o período de estabilização, os anéis foram pré contraídos com fenilefrina (1,0 µmol/L). A presença de endotélio funcional nos anéis pré contraídos foi testada pela adição de acetilcolina (1,0 µmol/L). As preparações que apresentaram menos que 70% de endotélio funcional foram descartados. A seguir, meios de incubação foram trocados a cada 15 min, durante 30 min, para o retorno à linha de base e estabilização (CÔRTEZ et al., 2002).

A porcentagem de endotélio funcional nas preparações foi calculada a partir da equação descrita a seguir:

$$\% = 100 - [(tensão\ com\ acetilcolina / tensão\ com\ fenilefrina) \times 100]$$

As respostas dos anéis de aorta frente a diferentes tratamentos foram registradas por transdutores isométricos conectados a um amplificador e a um sistema de aquisição

computadorizada de dados.

Como controle foi adicionado apenas o solvente (etanol / solução de Krebs-Henseleit 1:1) em volume correspondente à quantidade adicionada durante o ensaio com os extratos, frações e substância isolada.

Os extratos e frações foram solubilizados em etanol / solução de Krebs-Henseleit 1:1, para preparo da solução mãe na concentração de 10 mg/ml. Se necessário, para garantir a solubilização, as suspensões eram deixadas por cerca de dois min em banho de ultrassom, e, logo em seguida, cerca de dez min em banho-maria a 38 °C. A solução mãe foi diluída duas vezes, na proporção de 1:10, em solução de Krebs-Henseleit, resultando nas concentrações de 1,0 e 0,1 mg/ml. As soluções ou suspensões foram adicionadas nas cubas de forma cumulativa, de modo que as concentrações dos extratos e frações na cuba de ensaio foram 1,0; 3,0; 10,0; 30,0; 100 e 300 µg/ml. Após cada adição esperou-se tempo necessário para estabilização da resposta. Cada extrato e fração foi submetido ao ensaio *in vitro* de vasodilatação de aorta de 4 a 6 vezes em dias diferentes.

O teste com acetilcolina foi repetido após o ensaio a fim de se verificar a reversibilidade do efeito dos extratos e frações. Ao final de cada ensaio, as cubas foram lavadas três vezes com solução de Krebs; esperou-se meia hora para estabilização da tensão exercida pelos anéis de aorta e realizou-se novamente teste para verificação da porcentagem de endotélio funcional disponível.

Para cada extrato e fração foi determinado o logaritmo negativo da concentração inibitória a 50% (pCI_{50}), correspondente à concentração que gerou metade do relaxamento máximo obtido para a amostra, através de análise de regressão não-linear da relação entre concentração (-log da concentração em g/ml) e porcentagem de dilatação. O programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software) foi empregado para os cálculos (log agonista X resposta, com *slope* variável) sendo expressos como média seguida de desvio padrão (DP) dos valores do logaritmo negativo de base 10 da concentração inibitória a 50% (pCI_{50}) para cada extrato e fração.

Os resultados dos experimentos são apresentados, também, como porcentagem de relaxamento máxima de cada extrato e fração, considerando a contração máxima produzida pela fenilefrina, calculando-se média e desvio padrão das repetições.

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA, *one way*) seguida de teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). A variável empregada foi o logaritmo negativo das concentrações inibitórias a 50% (pCI_{50}) e em seguida, a porcentagem máxima de relaxamento.

4.4.1.5 Avaliação da atividade de CC1

Foi realizado o mesmo procedimento descrito para os extratos e frações. No entanto, a substância isolada foi testada nas concentrações de 3×10^{-6} a 3×10^{-4} M.

4.4.2 Ensaio de atividade hipotensora *in vivo*

Este experimento *in vivo* foi realizado apenas para o extrato bruto e a fração *n*-butanólica, pela doutoranda Grazielle Caroline da Silva, no laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Instituto de Ciências Biológicas, sob supervisão e orientação do Prof. Dr. Steyner F. Côrtes.

4.4.2.1 Equipamentos

- Aparelho para aferição da pressão arterial caudal de ratos, XBP1000 Series Rat Tail Blood Pressure System (Kent Scientific, Torrington, CT, EUA).

4.4.2.2 Animais

- Camundongos normotensos Swiss de 8 semanas (peso entre 25 a 30 g). O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em experimentação animal (CETEA) da UFMG, sendo o número do protocolo 17/2008 (Anexo A).

4.4.2.3 Avaliação da resposta hipotensora de extratos e frações

A pressão arterial sistólica (PAS) foi monitorada pelo método de pletismografia de cauda descrito na literatura (WHITESALL et al., 2004, KREGGE et al., 1995, REZENDE et al., 2009) com algumas modificações. Os camundongos foram condicionados em um contensor aquecido a 37 °C por, no máximo, 5 min. Durante este período, um sensor de pulsos e um manguito foram acoplados à cauda do animal para aferição da PAS, que foi registrada em sistema computadorizado acoplado ao aparelho. Foram obtidas 5 medidas da PAS e a média destes valores calculada para obtenção da resposta.

A pressão basal foi aferida antes da aplicação do tratamento e na sequência foram obtidas medidas da PAS a cada 15 ou 30 min, com a primeira aferição 5 min após a

administração da amostra, por um período de 3 h. Foram realizados três tratamentos: controle negativo (salina e Tween 80), extrato bruto e fração butanólica. A administração das amostras foi pela via oral, através da gavagem intragástrica, na dose de 100 mg/kg e 10 mg/kg. Previamente aos experimentos, os animais foram submetidos a um treinamento semelhante ao protocolo experimental, com intuito de adaptá-los ao processo de aferição da PAS e diminuição do estresse causado pelo procedimento.

Os resultados foram avaliados por ANOVA *two-way* ($p < 0,05$), sendo os fatores: (1) os tratamentos (controle, 10 mg/kg e 100 mg/kg) e (2) o tempo. Quando detectadas diferenças significativas foi aplicado teste de Bonferroni.

4.5 Correlação entre o teor de metabólitos secundários e a atividade biológica

Para avaliar a correlação entre os teores dos marcadores químicos (taninos, proantocianidinas e flavonoides totais) e os resultados do ensaio de vasodilatação em anéis de aorta foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman (PAGANO; GAUVREAU, 2004).

As variáveis foram: logaritmo negativo das concentrações inibitórias a 50% (pCI_{50}) e teor percentual (m/m) para cada grupo de metabólitos secundários.

4.6 Isolamento de metabólitos secundários

4.6.1 Equipamentos

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Shimadzu, composto de bombas LC-8A, sistema controlador de pressão SPD-6A, detector UV-VIS SPD-6AV e integrador CR-4A.

4.6.2 Materiais

- Coluna preparativa para CLAE, Agilent, Zorbax SB-C18, com partículas de 5 μ m, dimensões internas 9,4 \times 250 mm, com pré-coluna de ODS.
- Coluna preparativa para CLAE, Agilent Prep C18, com partículas de 10 μ m,

dimensões internas 21,2 × 250 mm, com pré-coluna 17 × 7,5 mm.

- Sephadex LH-20.

4.6.3 Isolamento de CC1

Foram utilizadas as seguintes técnicas: cromatografia em coluna aberta de Sephadex LH-20, CLAE com coluna de fase reversa preparativa (9,4 mm) e precipitação.

As etapas de fracionamento e purificação estão representadas resumidamente em fluxogramas, no item 5.5, **Figura 19** a **Figura 22**, p. 120 a 124. Partiu-se de diferentes extratos e frações (extrato aquoso, precipitado, fração butanólica obtida a partir do extrato aquoso) a fim de se conseguir isolar a substância de modo mais simples e com o maior rendimento.

As frações coletadas foram analisadas por CCD de sílica gel, utilizando-se como revelador anisaldeído e cloreto de alumínio, e como substância de referência rotina, conforme descrito no item 4.2. As frações que apresentaram composições semelhantes foram reunidas.

4.6.3.1 Fracionamento do precipitado por Sephadex LH-20

O precipitado (ppt), obtido a partir da partição do extrato bruto entre solventes imiscíveis (item 4.1), foi submetido à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20. A amostra foi solubilizada no eluente (metanol) e centrifugada (10 min, 10.000 r.p.m.), sendo 2,5 ml do sobrenadante aplicados no topo da coluna de Sephadex. A eluição aconteceu com metanol.

Massa aplicada: 234,4 mg.

Dimensões da coluna empacotada: 40 × 2,2 cm.

Massa aproximada de Sephadex LH-20: 70 g.

Inicialmente foi coletada uma fração, denominada fração zero, empregando-se metanol como eluente, em volume suficiente para eluição de eventuais substâncias não pigmentadas.

A Tabela 7 lista a sequência de eluição e as frações resultantes.

Ao final a coluna foi lavada com acetona / água 7:3.

O fluxograma representado na **Figura 19**, p. 120 resume os procedimentos descritos

neste item, cuja sequência consta no item 4.6.3.4.

Tabela 7: Purificação do precipitado (ppt) em coluna de Sephadex .

Frascos	Eluente	Volume coletado	Frações	Frascos	Massa (mg)
1 a 29	Metanol	12 ml por frasco	C1-1	1-2	31,6
			C1-2	3-5	32,6
			C1-3	6	14,2
			C1-4	8	7,3
			C1-5	9	16,1
			C1-6	10-21	19,1
			C1-7	22-25	10,9

4.6.3.2 Fracionamento do extrato aquoso por Sephadex

O extrato aquoso liofilizado (item 4.1) foi submetido a fracionamento em coluna de Sephadex LH-20.

Quantidade aplicada: não determinada; foram pesados 263,1 mg, mas parte do material precipitou durante a centrifugação.

Dimensões da coluna empacotada: 25 × 2,2 cm.

Massa aproximada de Sephadex: 35 g. O Sephadex foi lavado antes do uso com solução de hipoclorito de sódio comercial (água sanitária a 5%) e depois equilibrado com metanol. Foram descartadas as primeiras frações pela ausência de substâncias de interesse.

A **Tabela 8** lista a sequência de eluição e as frações resultantes.

Tabela 8: Fracionamento do extrato aquoso liofilizado em coluna de Sephadex.

Frascos	Eluente	Volume coletado	Frações	Massa (mg)
1 a 36	Metanol	?	Desprezadas	?
37 a 40	Metanol	12 ml por frasco	C3-1	27,7
			C3-2	3,0
41 a 45	Metanol	6 ml por frasco	C3-3	3,9
46 e 47	Metanol	12 ml por frasco	C3-4	1,5

Após eluição de todas as substâncias de coloração amarela com metanol lavou-se a coluna com acetona / água 7:3.

O fluxograma representado na **Figura 20**, p. 122 resume os procedimentos descritos neste item, cuja sequência consta no item 4.6.3.4.

4.6.3.3 Fracionamento da fração *n*-butanólica do extrato aquoso por Sephadex

A fração *n*-butanólica obtida a partir do extrato aquoso, conforme descrito no item 4.1.3, foi fracionada em coluna de Sephadex LH-20.

Massa aplicada: 100 mg.

Dimensões da coluna empacotada: 25 × 2,2 cm.

Quantidade aproximada de Sephadex: 35 g.

Eluente: metanol.

O procedimento foi repetido mais uma vez, obtendo-se as frações listadas nas Tabelas 9 e 10.

O fluxograma representado **Figura 22**, p. 124 resume os procedimentos descritos neste item, cuja sequência consta no item 4.6.3.4.

Tabela 9: Fracionamento da fração *n*-butanólica em coluna de Sephadex.

Frações	Frascos	Massa (mg)
C6-1	1-3	7,3
C6-2	4	4,3
C6-3	5	12,4
C6-4	6-8	25,4
C6-5	9	3,2
C6-6	10-12	2,9
C6-7	13	2,9
C6-8	14	8,3
C6-9	15	10,7

Tabela 10: Fracionamento da fração *n*-butanólica em coluna de Sephadex. Repetição.

Frações	Frascos	Massa (mg)
C7-1	1-6	67,9
C7-2	7	3,3
C7-3	8-10	13,9
C7-4	11-12	5,1
C7-5	13-14	
C7-6	15-16	2,8
C7-7	17-19	3,2
C7-8	20	13,1

4.6.3.4 Purificação final de CC1

As frações C3-3 (3,9 mg, **Tabela 8**, p. 63) e C1-6 (19,1 mg, **Tabela 7**, p. 63)

resultantes do fracionamento em coluna de Sephadex foram submetidas, separadamente, à purificação por CLAE em coluna de ODS preparativa, utilizando como eluente metanol / água 3:7. Foram obtidos 1,4 mg de CC1 com grau de pureza ainda insuficiente para a realização de análises espectrométricas (CC1 impuro).

A purificação final das frações C4-4 (11,9 mg) (**Figura 20**), C6-6 e C7-7 (6,1 mg) e do CC1 impuro foi feita por CLAE em coluna de ODS preparativa (9,4 mm). As condições de separação incluíram: eluição com metanol / água em diferentes proporções, sendo a melhor 3:7, fluxo de 3 ml/min e detecção em $\lambda = 210$ nm.

Todas as amostras foram solubilizadas em 1 ml do eluente e centrifugadas (10 min a 10.000 r.p.m) antes da injeção manual no cromatógrafo. O limite máximo de massa aplicada em cada injeção foi de 20 mg.

4.6.3.5 Fracionamento da fração *n*-butanólica obtida do extrato aquoso

A fração *n*-butanólica, resultante da partição do extrato aquoso (item 4.1), foi submetida à purificação por CLAE em escala preparativa. Como eluente foi empregada mistura de metanol e água 2:8 por 10 min, seguido de 2,5:7,5 por 15 min e finalmente, 3:7.

As frações contendo CC1, resultantes do fracionamento da fração butanólica, foram refracionadas por CLAE. Manteve-se como eluente mistura de metanol e água 3:7.

De um total de 29,3 mg da fração foram isolados 4,4 mg de CC1.

O fluxograma de isolamento, incluindo as massas das frações obtidas encontra-se na **Figura 22**, p. 124.

4.6.3.6 Fracionamento por precipitação da fração *n*-butanólica obtida a partir do extrato aquoso

Escolha do solvente para precipitação

Foram avaliadas diferentes proporções de metanol / água (1:9, 2:8 e 3:7). Um mililitro de cada mistura foi adicionado a porções de 20 mg da fração *n*-butanólica, obtida a partir do extrato aquoso, conforme descrito no item 4.1.3. A suspensão foi agitada manualmente e centrifugada (10 min, 10.000 r.p.m.).

Os precipitados foram analisados por CCD e CLAE, segundo as condições descritas no item 4.2, empregando-se anisaldeído e cloreto de alumínio como reveladores.

Fracionamento da fração *n*-butanólica por precipitação

A cada porção de 20 mg da fração *n*-butanólica foi adicionado 1,0 ml de metanol / água 2:8. Após agitação manual, centrifugou-se a suspensão por 10 min a 10.000 r.p.m., obtendo-se o precipitado. O procedimento foi repetido diversas vezes.

Refracionamento do precipitado

Injeções sucessivas de porções do precipitado (máximo de 20 mg) em sistema de CLAE com coluna de ODS (9,4 mm de diâmetro interno) resultaram no isolamento de 13,1 mg de CC1. Em todas as separações o eluente utilizado foi metanol / água 3:7 com fluxo de 3 ml/min.

4.6.4 Isolamento de CC3

Sephadex e CLAE

A fração *n*-butanólica, obtida a partir do extrato bruto, foi fracionada em coluna de Sephadex LH-20, 25 × 2,2 cm, empacotada com cerca de 35 g. Foram aplicados 100 mg solubilizados em 2,0 ml de metanol, sendo a amostra centrifugada (10 min, 10.000 r.p.m) previamente à aplicação na coluna. Metanol foi utilizado como eluente, sendo coletada inicialmente uma fração de 20 ml, não incluída na **Tabela 11** e, em seguida, frações com cerca de 15 ml. Finda a eluição, lavou-se a coluna com acetona / água 7:3 para remover substâncias adsorvidas que não foram eluídas com metanol, frações estas também não incluídas na tabela.

Tabela 11: Fracionamento da fração *n*-butanólica em coluna de Sephadex visando a obtenção de CC3.

Frações	Frascos	Massa (mg)
C1910-1	1 a 4	11,5
C1910-2	5 a 7	32,1
C1910-3	8 a 12	15,8
C1910-4	13 a 15	7,8
C1910-5	17 a 20	19,9

O procedimento foi repetido (**Tabela 12**).

Às frações que continham CC3 (C1910-5 e C2304-10), analisadas por cromatografia de camada delgada, adicionou-se metanol / água 3:7. O precipitado formado foi solubilizado em DMSO / metanol:água 2:1:1 e cromatografado em coluna de ODS (9,4 mm de diâmetro interno), com fluxo de 3,0 ml/min, empregando eluição isocrática de metanol / água 3:7

durante 8 min, seguida de gradiente até metanol / água 1:1 em 15 min, mantendo-se a última condição por 10 min.

Tabela 12: Fracionamento da fração *n*-butanólica em coluna de Sephadex visando a obtenção de CC3.

Frações	Frascos	Massa (mg)
C2304-1	1 a 2	2,9
C2304-2	3 a 4	8,1
C2304-3	5	8,5
C2304-4	6	5,4
C2304-5	7	3,3
C2304-6	8 a 9	4,5
C2304-7	10 a 11	2,9
C2304-8	12	1,4
C2304-9	13 a 15	6,5
C2304-10	16 a 21	10,1

CLAE

A fração *n*-butanólica, obtida a partir do extrato bruto, também foi submetida a fracionamento por CLAE com coluna de ODS (9,4 mm de diâmetro interno). Foi aplicada a porção solúvel no eluente da massa pesada (30 mg), após centrifugação por 10 min a 10.000 r.p.m. Foi realizada eluição isocrática de metanol / água 3,5:6,5 até 14 min, substituída por metanol / água 4:6 após este período. As massas das frações obtidas são apresentadas na **Tabela 13**.

Tabela 13: Frações resultantes do fracionamento da fração *n*-butanólica em CLAE, visando a obtenção de CC3.

Frações	Intervalo de tempo (min)	Massa (mg)
CP2104-1	0 - 3,5	
CP2104-2	3,5 a 6,7	2,7
CP2104-3	6,7 a 12,5	3,5
CP2104-4	12,5 a 19,1	1,3
CP2104-5	19,1 a 20,8	0,8
CP2104-6	20,8 a 23,1	1,1

A subfração CP2104-5 é constituída por CC3 isolada.

4.6.5 Isolamento de CC4

CC4 foi isolado da fração em acetato de etila, obtida por partição do extrato bruto, conforme descrito no item 4.1. Uma porção da fração (cerca de 100 mg) foi solubilizada em

2 ml de DSMO e centrifugadas a 10.000 r.p.m. por 10 min. O sobrenadante foi aplicado em sistema de CLAE, com coluna de ODS (21,1 mm de diâmetro interno).

Como fase móvel empregou-se metanol / água 3:7, sendo a água acidificada com 0,1% de ácido acético. Procedeu-se à eluição isocrática de metanol / água 3:7 por 15 min, seguida de gradiente linear de 3:7 para 8:2 em 60 min. A detecção foi feita no ultravioleta em $\lambda = 210$ nm. Foram coletados separadamente todos os picos detectados (**Tabela 14**).

Tabela 14: Frações resultantes do fracionamento da fração acetato de etila em CLAE preparativo para isolamento de CC4.

Tempo (min)	Frações	Massa (mg)
28,8-33	1	16,4
35-39	2	6,9
39-39,8	3	2,2
39,8-42	4	9,9
42-44,9	5	2,9
44,9-51,4	6	3,5

A fração 4 contém CC4 isolada.

O procedimento foi repetido. Foram obtidos 9,9 mg e 16,9 mg de CC4 a partir de 102 e 151,6 mg, respectivamente.

4.7 Elucidação estrutural

4.7.1 Equipamentos

- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear, Bruker Advance DPX400, 400 MHz para obtenção dos espectro de ^1H e 100 MHz para para os de ^{13}C ; disponível no LAREMAR (Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução), Departamento de Química, ICEX (Instituto de Ciências Exatas), UFMG.
- Espectrofotômetro de absorção no ultravioleta e visível, Perkin Elmer Lambda 20.
- Espectrofotômetro de absorção no infravermelho, Perkin-Elmer, modelo Spectrum One disponível no Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFMG.

4.7.2 Materiais

Os seguintes reagentes de deslocamento para espectrofotometria de absorção no ultravioleta foram preparados segundo descrito por Mabry, Markham e Thomas (1970).

- Solução de metóxido de sódio: 2,5 g de sódio metálico foram cuidadosamente adicionados a 100 ml de metanol.
- Acetato de sódio anidro.
- Solução de cloreto de alumínio a 5% m/v: dissolveram-se 5 g de cloreto de alumínio em 100 ml de metanol, sob resfriamento.
- Solução de ácido clorídrico: adicionaram-se 50 ml de ácido clorídrico concentrado a 40 ml de água completando-se o volume para 100 ml.
- Ácido bórico: 100 ml de metanol foram saturados com ácido bórico.
- Solução de hidróxido de sódio a 2,5% m/v: dissolveram-se 2,5 g de hidróxido de sódio em 100 ml de metanol, sob resfriamento.

4.7.3 Espectrofotometria de absorção no infravermelho

Para a análise por espectrofotometria de absorção no infravermelho não foi necessário procedimento de preparo da amostra. Cerca de 1 mg de cada substância foi diretamente depositado em local específico no espectrofotômetro.

4.7.4 Espectrofotometria de absorção no ultravioleta

Foram registrados espectros de absorção no ultravioleta para soluções metanólicas das substâncias isoladas, empregando-se como reagentes de deslocamento soluções de metóxido de sódio, acetato de sódio, cloreto de alumínio, ácido clorídrico e ácido bórico. Realizou-se varredura em λ de 200 a 500 nm, empregando-se metanol grau HPLC como branco. Inicialmente foi obtido o espectro em metanol (0,01 mg/ml). Em seguida, adicionaram-se três gotas de metóxido de sódio, sendo realizada uma leitura imediata e outra após 5 min. Desprezou-se a solução. À solução em metanol foram adicionadas seis gotas da solução de cloreto de alumínio. A leitura foi realizada imediatamente. À mesma cubeta adicionaram-se três gotas da solução de ácido clorídrico. Desprezou-se a solução. À solução de cada flavonoide adicionou-se acetato de sódio até o excesso de 2 mm pela saturação da solução, após agitação. Procedeu-se à leitura imediata e após 5 min. Na

sequência, adicionaram-se gotas de solução de ácido bórico (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

4.7.5 Espectrometria de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN foram obtidos para soluções das substâncias em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆). Empregou-se tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

4.8 Quantificação de metabólitos secundários por cromatografia líquida de alta eficiência

4.8.1 Equipamento

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Waters, com injetor automático 2695, degaseificador em linha AF, detector de arranjo de diodos (DAD) 2996, bomba modelo L-6200A e software Waters Empower para análise e processamento de dados.

4.8.2 Materiais

Solventes e reagentes:

- Solvente grau HPLC: metanol, Tedia.
- Ácido fosfórico grau P.A, Merck.
- Ácido clorídrico concentrado, F. Maia.
- Ácido clorídrico 2, 4 e 8 M.

Substâncias de referência:

- Quercetina diidratada (Sigma).
- Ácido gálico (Sigma).
- Ácido elágico (Sigma).
- Quercetina-3-sulfato (CC1) (item 5.6.1).
- Quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo (CC4) (item 5.6.4).

Coluna cromatográfica:

- Coluna analítica para CLAE, Agilent, LiChrospher 100, ODS, partículas de 5 μm , dimensões internas 125 \times 4 mm, com pré-coluna LiChrospher 100 ODS, 5 μm , 4 \times 4 mm de diâmetro interno.
- Coluna preparativa para CLAE, Agilent Prep C18, com partículas de 10 μm , dimensões internas 21,2 \times 250 mm, com pré-coluna 17 \times 7,5 mm.

Vidrarias: Balões volumétricos e pipetas volumétricas calibrados.

4.8.3 Quantificação de flavonoides

Foi desenvolvido e parcialmente validado um método por CLAE para determinação quantitativa de quercetina-3-sulfato (CC1), quercetina-5-O- β -glicopiranosídeo (CC3), quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo (CC4) e quercetina em extrato de *C. carthagenensis*.

4.8.3.1 Estabelecimento das condições cromatográficas

Inicialmente foi desenvolvido sistema cromatográfico para separação de flavonoides no extrato bruto empregando-se gradiente de metanol e água contendo 0,1% de ácido fosfórico. As principais condições de análise avaliadas encontram-se na Tabela 15. Foram pesados 10 mg do extrato bruto em frasco plástico do tipo *safe-lock* com 2,0 ml de capacidade, sendo em seguida adicionado 1,00 ml de metanol volumetricamente medido. Manteve-se a mistura em banho de ultrassom por cerca de 1 min até completa solubilização. Na sequência, a amostra foi centrifugada durante 10 min a 10.000 r.p.m., e 10 μl da solução sobrenadante foram injetados em sistema CLAE. As substâncias foram detectadas pela sua absorção no ultravioleta em $\lambda = 350 \text{ nm}$.

Tabela 15: Principais condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento de método para análise quantitativa por CLAE de flavonoides em extratos e frações de *C. carthagenensis*.

Condição	MeOH (%)	Tempo (min)	Tipo de gradiente	Inclinação do gradiente (% MeOH \times min ⁻¹)
A	5 – 50	30	Linear	1,5
B	35 – 50	20	Linear	0,75
C	30 – 45	20	Linear	0,75

A seletividade das condições cromatográficas foi avaliada pela pureza espectral dos

picos majoritários. Para tanto, foram extraídos espectros de absorção no ultravioleta nas regiões média ascendente, apical e média descendente de cada pico, os quais foram comparados, sendo considerados puros os picos cujos espectros apresentaram os mesmos máximos de absorção. Uma alternativa seria adição de substância de referência ao extrato a fim de verificar se os picos se sobrepõem. Também foram avaliados a resolução e o fator de cauda dos picos de interesse.

4.8.3.2 Curvas analíticas

Foram construídas curvas analíticas para quercetina diidratada, quercetina-3-sulfato e quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo para avaliação da linearidade (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005), sendo determinadas as equações de regressão linear correspondentes, para o cálculo do teor de cada flavonoide. Não foi isolada massa suficiente de quercetina-5-O- β -glicopiranosídeo para construção das curvas analíticas correspondentes.

Soluções metanólicas das substâncias de referência, em diferentes concentrações, foram empregadas para obtenção das curvas analíticas. Diferentes volumes destas soluções foram injetados no cromatógrafo (**Tabela 16**). Foram obtidas curvas em dois dias distintos e a equivalência entre elas foi avaliada através de regressão linear com análise de covariância ($p \geq 0,05$) pelo programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software).

Tabela 16: Volumes de solução de quercetina diidratada injetadas para construção das curvas analíticas do método de doseamento de flavonoides por CLAE.

Concentração da solução de quercetina (mg/ml)	Volume injetado (μ l)
0,98/ 1,0	10,0
	8,0
	5,0
	3,0
98/ 100	10,0
	4,0
	1,0
9,8/ 10	4,0

Para a quercetina diidratada foram construídas duas curvas, uma no início do desenvolvimento do método, quando os outros flavonoides ainda não haviam sido isolados, e outra durante o processo de validação parcial do método, a fim de avaliar as diferenças ocasionadas pelo desgaste da coluna analítica. Para a primeira curva foram preparadas e analisadas duas soluções em dias diferentes, a primeira contendo 9,8 mg transferidos para

balão volumétrico de 10 ml e a segunda, 10,0 mg/ 10 ml. Para a validação parcial do método, a curva foi repetida após cerca de dois anos, sendo preparada uma solução estoque a partir da pesagem de 9,55 e 9,72 mg de quercetina, transferidos para balões volumétricos de 10 ml. A partir da solução estoque foi efetuada diluição 1:10 em balão volumétrico de 10 ml e 1:100 em balão volumétrico de 100 ml. Os volumes injetados no sistema de CLAE constam na **Tabela 16**.

Para a quercetina-3-sulfato foram pesados em dias diferentes 1,81 mg e 1,00 mg, os quais foram transferidos para balão volumétrico de 5,00 ml, resultando em soluções a 0,362 e 0,200 mg/ml. Por sua vez, essas soluções foram diluídas na proporção de 1:10. Os volumes e massas injetados para construção das curvas analíticas encontram-se na **Tabela 17**.

Tabela 17: Volumes e massas de quercetina-3-sulfato injetados para construção das curvas analíticas do método de doseamento de flavonoides por CLAE.

Concentração da solução de quercetina-3-sulfato ($\mu\text{g/ml}$)	Volume injetado (μl)	Massa injetada (μg)	Dia
362	10,0	3,62	1
	5,0	1,81	
	1,0	0,362	
200	10,0	2,0	2
	5,0	1,0	
	1,0	0,2	
36,2	5,0	0,181	1
	1,0	0,036	
20	5,0	0,1	2
	1,0	0,02	

Tabela 18: Volumes e massas de quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo injetados para construção das curvas analíticas do método de doseamento de flavonoides por CLAE.

Concentração da solução de quercetina ($\mu\text{g/ml}$)	Volume injetado (μl)	Massa injetada (μg)	Dia
234	10,0	2,34	1
	5,0	1,17	
	1,0	0,234	
250	10,0	2,5	2
	5,0	1,25	
	1,0	0,25	
23,4	5,0	0,117	1
	1,0	0,02	
25	5,0	0,125	2
	1,0	0,025	

No caso de quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo foram pesados em dias diferentes

1,17 mg e 1,25 mg, os quais foram transferidos para balão volumétrico de 5,00 ml, resultando em soluções a 0,234 mg/ml e 0,25 mg/ml. Essas soluções foram então diluídas na proporção de 1:10. Os volumes e massas injetados para construção das curvas analíticas encontram-se na **Tabela 18**.

4.8.3.3 Precisão intradia e interdia

Precisão intradia

Para determinação da precisão intradia (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005) foram pesados, em triplicata, cerca de 10, 15 e 20 mg do extrato bruto (EB), os quais foram solubilizados em 1,00 ml de metanol com auxílio de banho de ultrassom por menos de 1 min. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 10.000 r.p.m., sendo injetados 10 µl da solução sobrenadante em sistema de CLAE.

As concentrações dos três flavonoides majoritários e da quercetina foram expressas como quercetina, sendo os valores apresentados como média seguida de desvio padrão. Calculou-se também o coeficiente de variação.

Precisão interdia

As análises foram repetidas em dias distintos (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005) e os resultados obtidos foram expressos como média seguida do desvio padrão, sendo o coeficiente de variação também determinado. As médias dos teores determinadas em dias distintos foram comparadas pelo teste t. É preconizado que o coeficiente de variação, também denominado desvio padrão relativo, seja menor que 3,0 %.

4.8.3.4 Diferentes formas de cálculo do teor de flavonoides

As concentrações dos flavonoides quercetina-3-sulfato e quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo foram calculadas a partir de três métodos distintos: (a) a partir da equação da reta das curvas analíticas de quercetina; (b) a partir da equação da reta das curvas analíticas de quercetina com a correção pela massa molecular correspondente a cada flavonoide; (c) a partir da equação da reta das curvas analíticas obtidas para cada flavonoide. Os resultados foram expressos como média (% m/m) seguido do desvio-padrão. Objetiva-se avaliar a possibilidade de se utilizar apenas quercetina, que pode ser obtida comercialmente, como substância de referência, a fim de diminuir o custo da análise.

4.8.3.5 Exatidão

A exatidão foi determinada através do ensaio de recuperação (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005), ou seja, adicionando-se à amostra quantidade conhecida das substâncias de referência a fim de avaliar a porcentagem recuperada.

A cerca de 15 mg de extrato bruto foi adicionado volume pré determinado de solução metanólica das substâncias de referência. O volume adicionado contém massa de cada substância equivalente a 100% da concentração original presente na amostra, ou seja, 100 µg de quercetina-3-sulfato (13), 1 µg de quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo e 11,1 µg de quercetina. O ensaio foi realizado em triplicata simultaneamente para as três substâncias, ou seja, em cada amostra de extrato bruto foram adicionadas as três substâncias.

As concentrações de cada substância, teórica e experimental foram calculadas através das três formas de cálculo descritas no item 4.8.3.4. Os resultados foram expressos em média das porcentagens de recuperação, seguidas pelo desvio padrão e coeficiente de variação.

4.8.3.6 Análise dos extratos e frações

O método desenvolvido foi aplicado na análise dos extratos e frações descritos no item 4.1. Foram analisados: extrato bruto e aquoso, e parte das frações obtidas a partir do extrato bruto: *n*-butanólica, aquosa e precipitado. Foram pesados de 10,0 a 20,0 mg de cada extrato ou fração, em triplicata, seguindo-se solubilização com 1,0 ml de metanol, com auxílio de banho de ultrassom durante cerca de 1 min. As soluções foram então centrifugadas (10.000 r.p.m., 10 min) e o sobrenadante (10 µl) injetado no sistema de CLAE.

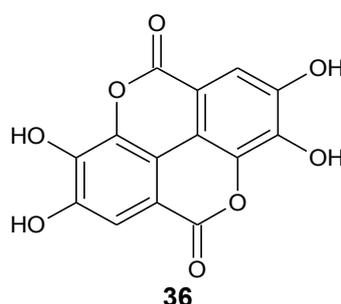
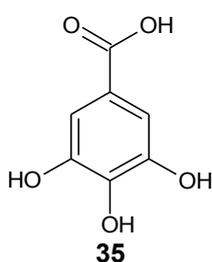
Foi determinada a porcentagem de flavonoides totais expressos como quercetina anidra.

4.8.4 Tentativa de desenvolvimento de método de CLAE para quantificação simultânea de ácido gálico, elágico e quercetina em extrato hidrolisado

A fim de analisar simultaneamente os principais constituintes de *C. carthagenensis* propôs-se desenvolver um método de CLAE para quantificar flavonoides e taninos

hidrolisáveis a partir de seus produtos de hidrólise.

Em função da predominância de taninos hidrolisáveis e da facilidade na obtenção comercial das substâncias resultantes da hidrólise destes metabólitos propôs-se desenvolver um método de CLAE para a quantificação dos ácidos gálico e elágico em derivados da droga vegetal. Além disso, como a aglicona dos flavonoides isolados de *C. carthagenensis* também é de fácil obtenção comercial, e pode estar associada às ações farmacológicas da espécie em questão, propôs-se a quantificação simultânea de quercetina (13) com os ácidos gálico (35) e elágico (36).



4.8.4.1 Otimização das condições cromatográficas para separação dos ácidos gálico, elágico e quercetina

As análises foram realizadas em coluna de ODS, empregando-se gradiente de metanol e água com 0,1% de ácido fosfórico para eluição. Os testes preliminares foram realizados na condição desenvolvida para o doseamento de flavonoides por CLAE (item 4.8.3.1). Em seguida foram avaliados diversos gradientes, dispostos na **Tabela 19**.

Tabela 19: Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento de método para análise quantitativa por CLAE de quercetina e ácidos gálico e elágico em extrato hidrolisado de *C. carthagenensis*.

Condição	MeOH (%)	Intervalo de tempo (min)	Inclinação do gradiente (%MeOH x min ⁻¹)
1	5 - 45	20	2
	2 - 6	6	0,67
2	6 - 35	2	14,5
	35 - 50	15	1
	2 - 6	6	0,67
3	6 - 35	2	14,5
	35 isocrático	5	-
	35 - 50	15	1
	2 - 6	4	1
4	6 - 35	5	5,8
	35 isocrático	9	-
	35 - 46	20	0,625

As condições foram inicialmente desenvolvidas com mistura das substâncias de referência (quercetina, ácidos gálico e elágico), obtida pela solubilização de cerca de 0,5 mg de cada uma em 5,0 ml de metanol. Na sequência, foram realizados experimentos com o extrato bruto hidrolisado, preparado conforme descrito no item 4.8.4.2.

O cromatograma obtido para mistura de substâncias de referência após hidrólise indicou o surgimento de pico de um derivado. Portanto, desenvolveu-se nova condição cromatográfica a fim de separar também o pico correspondente a este derivado.

Tabela 20: Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento de método para análise quantitativa por CLAE de quercetina, derivado do ácido gálico, ácido gálico e ácido elágico em extrato hidrolisado de *C. carthagenensis*.

Condição	MeOH (%)	Tempo (min)	Inclinação do gradiente (%MeOH x min ⁻¹)
inicial	De 2 a 46	44	1
5	De 2 a 12	6	1,67
	De 12 a 35	7	3,29
	35	4	-
	De 35 a 46	11	1
6	De 2 a 12	6	1,67
	De 12 a 14	1	2
	14 a 15	2	0,5
	15 a 36	1	21
	36	-	-
	36 a 40	4	1
	40 a 44	1	4
7	44 a 46	2	1
	De 2 a 12	4	2,5
	De 12 a 16	1	4
	16	2	-
	16 a 36	1	10
	36	2	-
	De 36 a 40	2	2
	40 a 44	1	4
8	44 a 50	3	2
	De 2 a 12	4	2,5
	De 12 a 16	1	4
	16	2	-
	16 a 36	1	10
	36	2	-
	De 36 a 46	2	5
	46 a 50	3	1,33
9	50 a 54	2	2
	De 2 a 12	15	0,67
	De 12 a 22	1	10
	22 a 44	22	1

O ponto de partida para esta nova etapa de otimização das condições cromatográficas foi a condição em que se empregou gradiente de metanol / ácido fosfórico

0,1%, de 2 até 46% em 44 min. Em seguida foram realizadas modificações (**Tabela 20**) a fim de se otimizar o tempo de análise garantindo a separação dos picos de interesse de modo a possibilitar a realização de análise quantitativa.

4.8.4.2 Avaliação das condições de hidrólise de flavonoides e taninos no extrato bruto

Testes preliminares

Para os testes preliminares a condição de hidrólise empregada compreendeu a solubilização de cerca de 10 a 15 mg de extrato bruto em 1 ml de metanol e 1 ml de HCl 2 M, em frasco plástico do tipo *safe-lock* mantido em banho-maria por 30 min. Findo este tempo o extrato hidrolisado foi transferido para um béquer e levado à secura. Os resultados foram avaliados nas condições cromatográficas desenvolvidas para o doseamento de flavonoides.

Os picos correspondentes aos ácidos gálico e elágico e à quercetina foram identificados através de comparação entre tempo de retenção e espectro de absorção no ultravioleta dos picos obtidos através da análise, nas mesmas condições, de cada uma destas substâncias.

Avaliação de diferentes tempos de hidrólise e concentração de ácido clorídrico

A fim de determinar as condições ideais para hidrólise foram inicialmente avaliadas os parâmetros concentração de solução de ácido clorídrico (2 e 4 M) e tempo de hidrólise (15, 30, 60 e 90 min), totalizando oito condições cujas soluções foram preparadas em triplicata.

O método de preparo das amostras foi alterado em relação ao teste preliminar. Foram pesados, em tubo falcon, 25 mg de extrato bruto, adicionados 2,5 ml de metanol, mistura essa mantida em ultrassom (menos de 1 min) e banho-maria até completa solubilização. Adicionaram-se, então, 2,5 ml de HCl 2 M ou 4 M e manteve-se a mistura em banho-maria durante 15, 30, 60 e 90 min. Ao final os tubos foram resfriados, centrifugados e seu conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 5 ml, sendo o tubo falcon lavado com metanol / HCl, na mesma concentração empregada para a hidrólise, na proporção de 1:1.

A fim de garantir a aleatoriedade dos experimentos, foi realizado sorteio para estabelecimento da ordem de preparo e análise das amostras por CLAE. Foi empregada a condição cromatográfica 4 (**Tabela 19**). Os valores de área do pico foram corrigidos em função da massa inicial de extrato bruto. As áreas dos picos corrigidas foram comparadas por ANOVA ($p > 0,05$).

Buscou-se um método de hidrólise que fosse preciso, ou seja, que resultasse em coeficiente de variação menor que 3, e cuja solução de análise fosse estável, produzindo resultados estatisticamente equivalentes ($p > 0,05$) no dia seguinte após a análise.

Não tendo sido obtida precisão satisfatória para as condições avaliadas, o método de preparo da amostra foi novamente alterado. Foram pesados em tubo falcon de 15 ml, cerca de 25 mg do extrato bruto, adicionados 2 ml de metanol, mantidos em banho-maria e ultrassom até completa solubilização, cerca de 1 min. Em seguida foram adicionados 2,0 ml de ácido clorídrico 4 M. A reação aconteceu em banho-maria a 90-95 °C durante 2,5; 6 e 8 h. Após resfriamento o extrato hidrolisado foi filtrado por algodão e transferido para balão volumétrico de 10 ml. Os tubos falcon foram lavados com 1,0 ml de metanol, sendo este procedimento repetido quatro vezes. O volume foi completado com metanol. Finalmente, foram avaliados os tempos de hidrólise de 8 e 10 h.

As amostras preparadas para avaliação das condições de hidrólise foram mantidas no amostrador do sistema de CLAE e reanalisadas após um dia do preparo, a fim de avaliar a estabilidade das mesmas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análises cromatográficas qualitativas

5.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A **Figura 6** representa o perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel para extratos e frações de *C. carthagenensis*. Como substâncias de referência foram empregadas: CC1, rutina e quercetina. CC1 é a substância cujo isolamento e elucidação estrutural estão descritos nos itens 4.6.3, 5.5.1 e 5.6.1.

Após relevação com cloreto férrico, substâncias com R_f inferior ao da rutina desenvolveram coloração azul, sugerindo a presença de taninos hidrolisáveis. Proantocianidinas apresentam coloração esverdeada com esse revelador e taninos hidrolisáveis, azul (CUNHA, 2005). Entretanto, o cloreto férrico não é específico para taninos, sendo também capaz de formar quelatos com hidroxilas de outros polifenóis.

Provavelmente a concentração de proantocianidinas é menor que a de taninos hidrolisáveis, pois a coloração predominante com cloreto férrico é azul, e não verde (CUNHA, 2005).

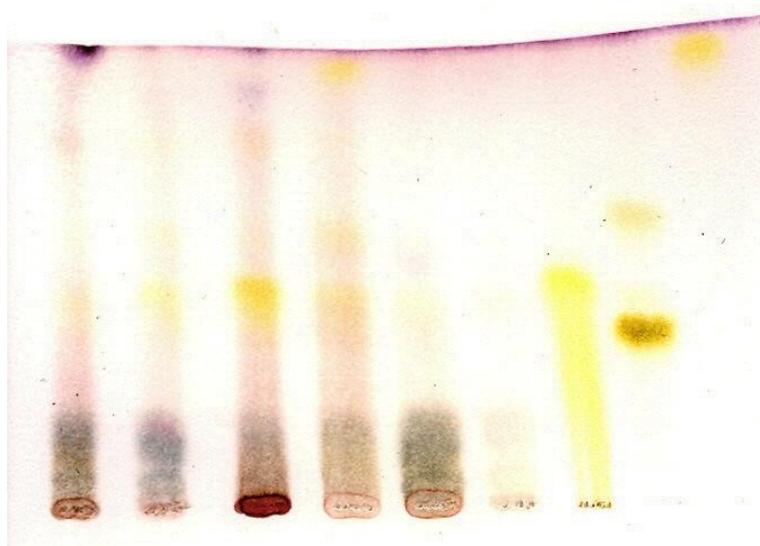


Figura 6: Cromatograma, obtido por CCD em sílica gel, para extratos e frações de *C. carthagenensis*. Eluição com acetato de etila / ácido fórmico / ácido acético / água (40: 4,4: 4,4: 10). Revelação com anisaldeído. Amostras analisadas: extrato bruto (EB), extrato aquoso (EA), precipitado (ppt), fração aquosa solúvel em metanol (AQsol), fração aquosa insolúvel em metanol (AQinsol), fração butanólica (BU), CC1, rutina (R), quercetina (Q).

A Tabela 21 resume os resultados da prospecção química dos extratos e frações de *C. carthagenensis*, observados em CCD de sílica gel, após aplicação de diferentes reveladores.

Tabela 21: Resultados da análise por CCD de sílica gel de extratos e frações de *C. carthagenensis* empregando-se diferentes reveladores.

Revelador	Coloração / fluorescência	Classe de metabólitos secundários	Extratos e frações					
			EB	EA	BU	AQsol.	AQinsol.	Ppt
AlCl₃	laranja ou amarela	flavonoides	++	++	++	+	traços	++
Anisaldeído	roxa esverdeada	indefinida	++	+	++	+++	traços	traços
Anisaldeído	vermelha	indefinida	++	-	+	++	traços	++
Liebermann-Burchard	esverdeada	saponinas esteroidais	++	-	++	+++	traços	traços
Vanilina clorídrica	vermelha	proantocianidinas e leucocianidinas	+	-	traços	+	traços	+
FeCl₃	azul	taninos hidrolisáveis	++	-	++	+++	-	+

Nota: EB, extrato bruto; EA, extrato aquoso; BU; fração *n*-butanólica; AQsol., fração aquosa solúvel em metanol; AQinsol., fração aquosa insolúvel em metanol; Ppt, precipitado.

No ponto de aplicação houve desenvolvimento de coloração vermelha fraca com vanilina clorídrica, indicando a presença de proantocianidinas ou leucocianidinas, já que este reagente é específico para uma classe limitada de compostos que apresentam ligação simples entre C-2 e C-3, e grupos hidroxila em posições alternadas no anel A e na posição 3, correspondente à subclasse de flavonoides denominada flavan-3-óis. A reação destes compostos com vanilina, um aldeído aromático, na presença de ácido clorídrico produz produtos de condensação de coloração vermelha. A vanilina reage com monômeros livres e com flavanóis terminais de polímeros na presença de ácido (DESHPANDE; CHERYAN; SALUNKHE, 1986 APUD AGOSTINI-COSTA; LIMA; LIMA, 2003; YOSEF et al., 2004; APARICIO-FERNANDEZ et al., 2005). Alguns autores revelam as placas cromatográficas com dicromato de potássio seguido de aquecimento a 100 °C por 10 min e, separadamente, com vanilina clorídrica. Desenvolvimento de coloração preta como resultado da oxidação de matéria orgânica pelo dicromato é proporcional à quantidade de proantocianidinas presentes (YOSEF et al., 2004; APARICIO-FERNANDEZ et al., 2005). Esta última forma de detecção não foi empregada, pois o objetivo foi apenas determinar a presença de proantocianidinas.

Com o reagente de Liebermann-Burchard houve desenvolvimento de manchas de coloração esverdeada escura em Rf inferior àquele da rutina, o que é indício da presença de saponinas, provavelmente esteroidais. Este reagente provoca oxidação de esteroides e triterpenos levando à formação de ligações duplas conjugadas, e conseqüentemente, de derivados coloridos. Desenvolvimento de coloração verde indica estrutura esteroideal e azul, triterpênica (BURKE et al., 1974; CUNHA, 2005).

Em função da impossibilidade de se observar manchas bem definidas para as substâncias muito retidas em sílica, e do fato destas substâncias reagirem com todos os reveladores empregados, exceto cloreto de alumínio, é possível que os materiais analisados apresentem grande número de substâncias mais polares que a rutina, pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários.

Finalmente, as manchas com Rf superior àquele da rutina coram de amarelo com anisaldeído e desenvolvem fluorescência amarela, laranja ou verde com cloreto de alumínio, indicando tratar-se de flavonoides. O cloreto de alumínio apresentou importante vantagem em relação ao anisaldeído, pois permite ótima delimitação das manchas quando visualizadas sob luz ultravioleta ($\lambda = 365 \text{ nm}$). Os resultados obtidos com NP/PEG, outro revelador para flavonoides, foram semelhantes àqueles obtidos com cloreto de alumínio, por isso apenas os resultados com o último revelador foram relatados.

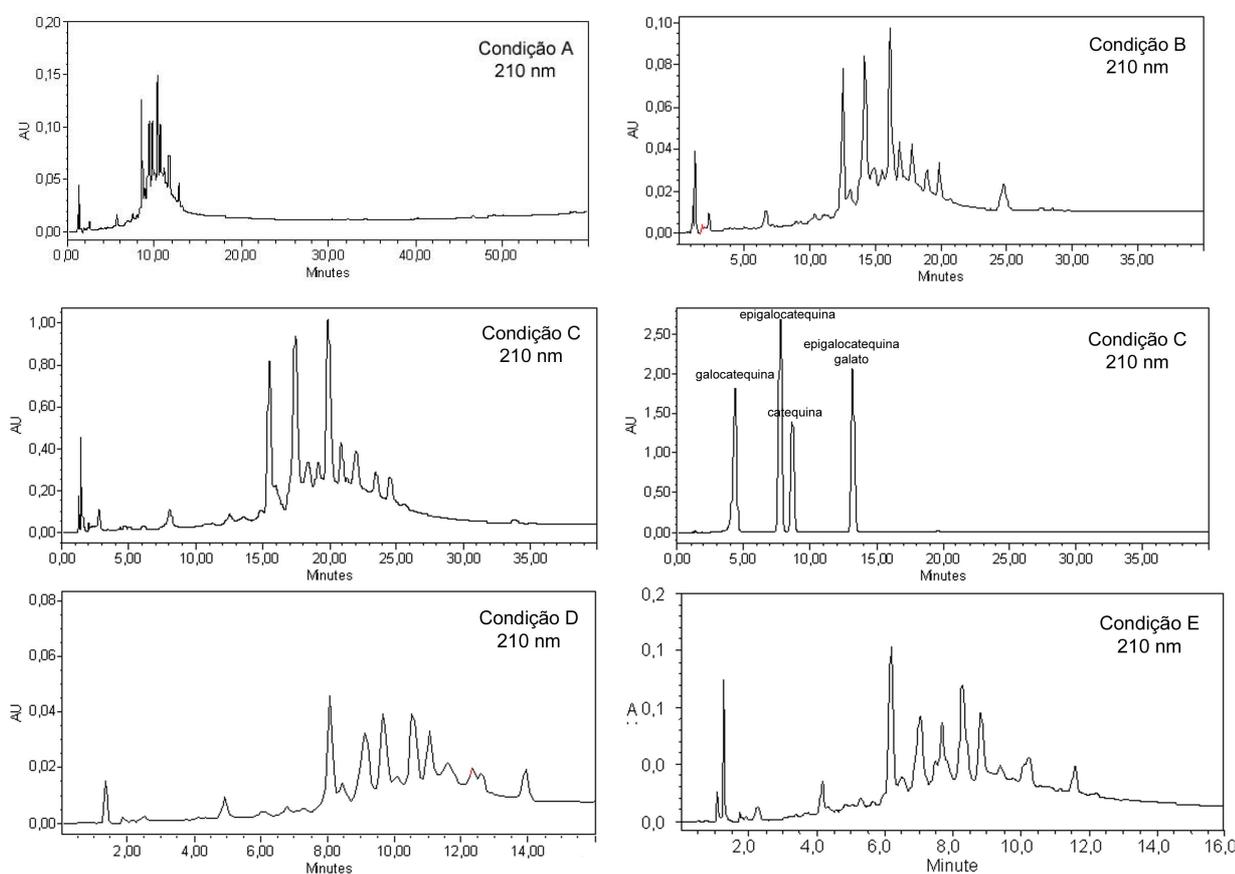
Concluindo, a rutina se mostrou adequada como substância de referência para análise qualitativa de *C. carthagenensis*, por apresentar polaridade intermediária, no sistema

eluente empregado. Os reveladores anisaldeído e cloreto de alumínio têm a capacidade de se complementarem, o primeiro sendo capaz de detectar maior diversidade de metabólitos secundários e o segundo, possibilitando distinção clara entre os flavonoides presentes nas amostras. O método descrito poderia ser utilizado como teste de identificação para a droga vegetal e derivados.

5.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.1.2.1 Desenvolvimento de perfil cromatográfico por CLAE

A fim de definir perfis cromatográficos por CLAE para extratos e frações de *C. carthagenensis*, que pudessem ser utilizados na identificação e controle de qualidade desses produtos, diferentes condições cromatográficas foram avaliadas (**Tabela 4**; condições A-G; p. 50). Buscou-se, com essas análises, separar os picos majoritários presentes no extrato bruto.



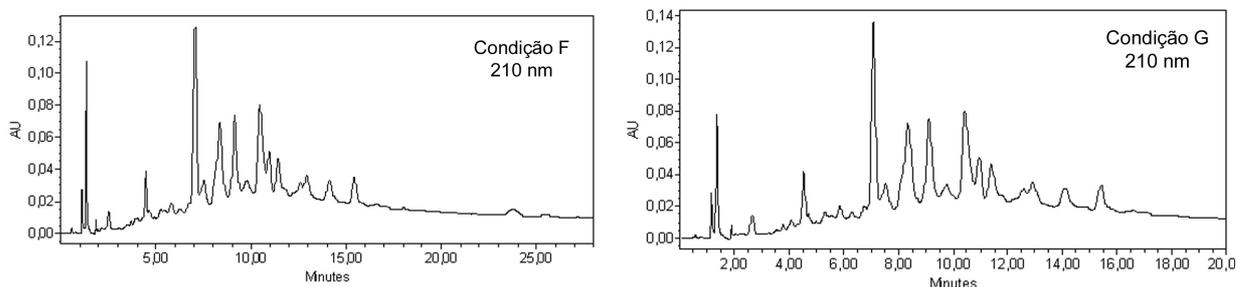
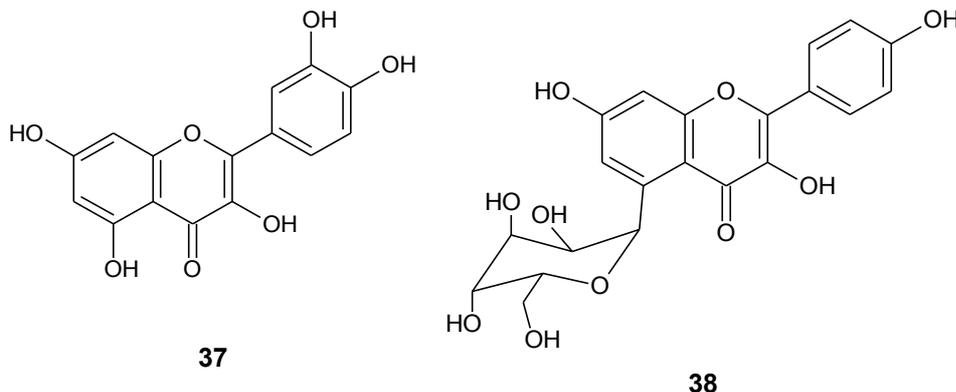


Figura 7: Cromatogramas, obtidos por CLAE para o extrato bruto, durante o desenvolvimento de perfil cromatográfico de *C. carthagenensis*. Condições cromatográficas: vide Tabela 4, p. 50.

Condição A

Conforme pode ser observado na **Figura 7**, as condições cromatográficas empregadas em A (gradiente de 5 a 95% de acetonitrila em 60 min) foram inadequadas para análise qualitativa do extrato em questão, já que todos os picos mais intensos localizam-se apenas na primeira porção do cromatograma, sendo detectados no intervalo inferior a 17 min, enquanto o tempo da corrida cromatográfica foi de 60 min. Além disso, não se observou adequada resolução para esses picos majoritários, inviabilizando seu emprego em análises qualitativas, possivelmente pela presença de grande número de substâncias, cujos picos estão sobrepostos, o que está de acordo com os resultados obtidos nas análises por CCD.

Na condição A também foram realizadas corridas com duas substâncias de referência: quercetina (**37**) e isovitexina (**38**), obtendo-se tempos de retenção de 18,2 e 11,2 min, respectivamente. Através desta comparação pôde-se conhecer a provável polaridade das substâncias presentes no extrato bruto. Trata-se de extrato composto majoritariamente por substâncias com polaridade semelhante a heterosídeos de flavonoides. Este resultado, juntamente com os dados levantados na revisão bibliográfica, justificam o direcionamento dos estudos fitoquímicos para grupos de metabólitos secundários mais polares, como taninos, saponinas e heterosídeos de flavonoides.



Condição B

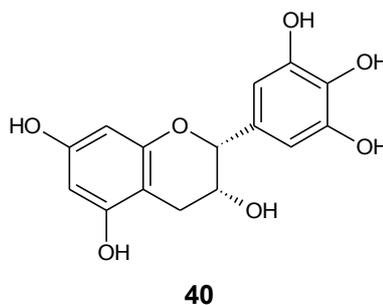
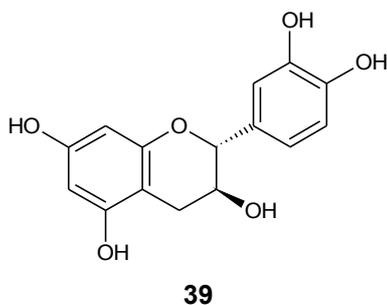
A fim de se conseguir melhor separação entre os picos majoritários e diminuir o tempo de análise propôs-se a condição B, com gradiente linear de 5 a 35% de acetonitrila em água com 0,1% de H₃PO₄, em 40 min. A porcentagem final de acetonitrila (35%) foi definida a partir da condição A, sendo esta a proporção de acetonitrila após 20 min de corrida cromatográfica. Outra modificação realizada foi a diminuição no incremento da proporção de acetonitrila de 1,5% min⁻¹ para 0,75% min⁻¹. A diminuição na inclinação do gradiente é uma estratégia válida para melhorar a resolução entre os picos (SNYDER, 1997).

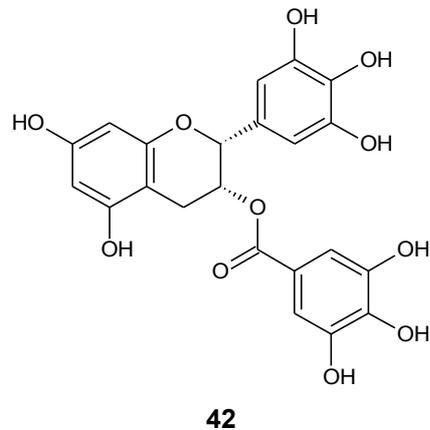
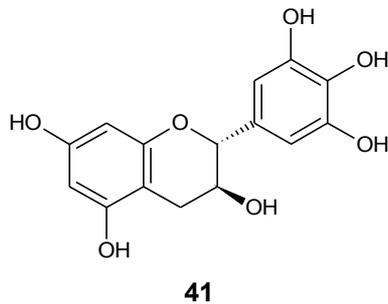
A análise do cromatograma obtido na condição B (**Figura 7**) indica melhoria tanto na resolução quanto na flutuação da linha de base. Os picos majoritários eluíram no intervalo entre 12 e 25 min, indicando ser possível reduzir ainda mais o tempo de análise.

Condição C

Esta condição não apresentou melhoria significativa em relação à anterior.

A comparação do cromatograma do extrato bruto com aquele obtido nas mesmas condições para as substâncias de referência catequina (**39**), epigalocatequina (**40**), galocatequina (**41**) e galato de epigalocatequina (**42**) indicou que esses compostos não correspondem aos picos majoritários da matriz vegetal (**Figura 7**). Como catequina pode ser um produto de degradação de proantocianidinas (CUNHA, 2005), sugere-se que compostos dessa classe, se presentes no extrato, não sofreram degradação apreciável ou não são formadas por catequina, ou ainda encontram-se em baixa concentração. Esta última hipótese está em conformidade com os resultados da análise por CCD de sílica gel após revelação com vanilina clorídrica, quando se observou desenvolvimento de fraca coloração vermelha.





Nesta condição cromatográfica a quercetina apresenta tempo de retenção de 33,2 min e pico pouco intenso no cromatograma do extrato bruto, sem presenças de picos majoritários nesta região, sugerindo que agliconas de flavonoides, se presentes no extrato, provavelmente encontram-se em menor quantidade quando comparadas com os componentes mais polares.

Portanto planejou-se, para a condição D, usar gradiente segmentado com maior inclinação no início, com o objetivo de se reduzir o tempo necessário para a eluição das substâncias que resultam nos picos majoritários.

Condição D

No início da análise, o incremento na concentração de acetonitrila foi de 2,5% x min⁻¹, passando para 1% x min⁻¹ no intervalo de eluição dos picos majoritários, retornado para 2,5 x min⁻¹ após 12 min de eluição (**Figura 8**).

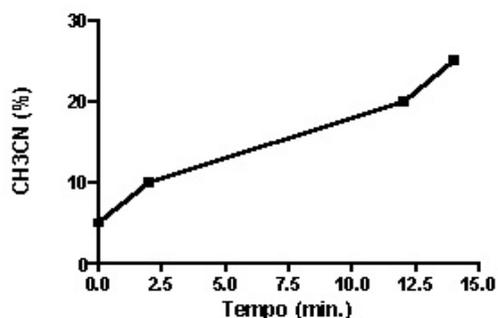


Figura 8: Gradiente de eluição segmentado empregado na condição D.

O cromatograma obtido nesta condição (**Figura 7**) indica redução no tempo de eluição dos picos majoritários e melhoria na flutuação da linha de base. A condição seguinte

foi planejada considerando-se que o primeiro pico majoritário foi eluído com aproximadamente 16% de acetonitrila e o último, com 24%.

Condição E

Houve pouca melhoria da separação nesta condição em relação à anterior, sendo observada redução no tempo de retenção dos picos majoritários (**Figura 7**).

O cromatograma foi obtido com gradiente segmentado, iniciando-se a análise com 5% de acetonitrila elevando-se gradativamente a proporção até 12% em 2 min, até 20% em 16 min e, finalmente, até 28% em 2 min. Realizou-se, com essas alterações, diminuição na inclinação do gradiente.

Condição F

Nesta condição, o incremento de acetonitrila foi de 0,5% por min, a menor inclinação avaliada. Obteve-se redução no tempo de retenção dos picos majoritários, com consequente diminuição no tempo de análise.

Condição G

Foi utilizada a mesma inclinação de gradiente da condição F, porém reduziu-se o tempo de corrida para 25 min, em relação aos 30 min anteriores. Esta condição foi definida para análise qualitativa do extrato bruto.

Conclui-se que na espécie prevalecem substâncias polares, provavelmente com estruturas químicas semelhantes, tendo em vista a proximidade dos tempos de retenção, o que se reflete na dificuldade de se obter resolução adequada entre os picos majoritários com esta fase móvel, coluna e comprimento de onda de detecção inespecífico, empregado a fim de se detectar o maior número de substâncias. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos através da cromatografia em camada delgada, que sugeriu presença de compostos polares estruturalmente semelhantes. A análise dos espectros de absorção no ultravioleta, obtidos pelo detector de arranjo de diodos, indicou a presença de compostos de diferentes classes, inclusive flavonoides, como picos majoritários.

5.1.2.2 Perfil cromatográfico dos extratos e frações

Nas figuras 9 e 10 estão representados os cromatogramas obtidos por CLAE para os extratos e frações, empregando a condição cromatográfica otimizada (condição G). Como

substância de referência foi empregada CC1, cujos procedimentos de isolamento e elucidação estrutural encontram-se descritos nos itens 5.5 e 5.6, respectivamente. Essas análises objetivam fornecer informações complementares para caracterização dos extratos e frações, além daquelas obtidas por CCD de sílica gel.

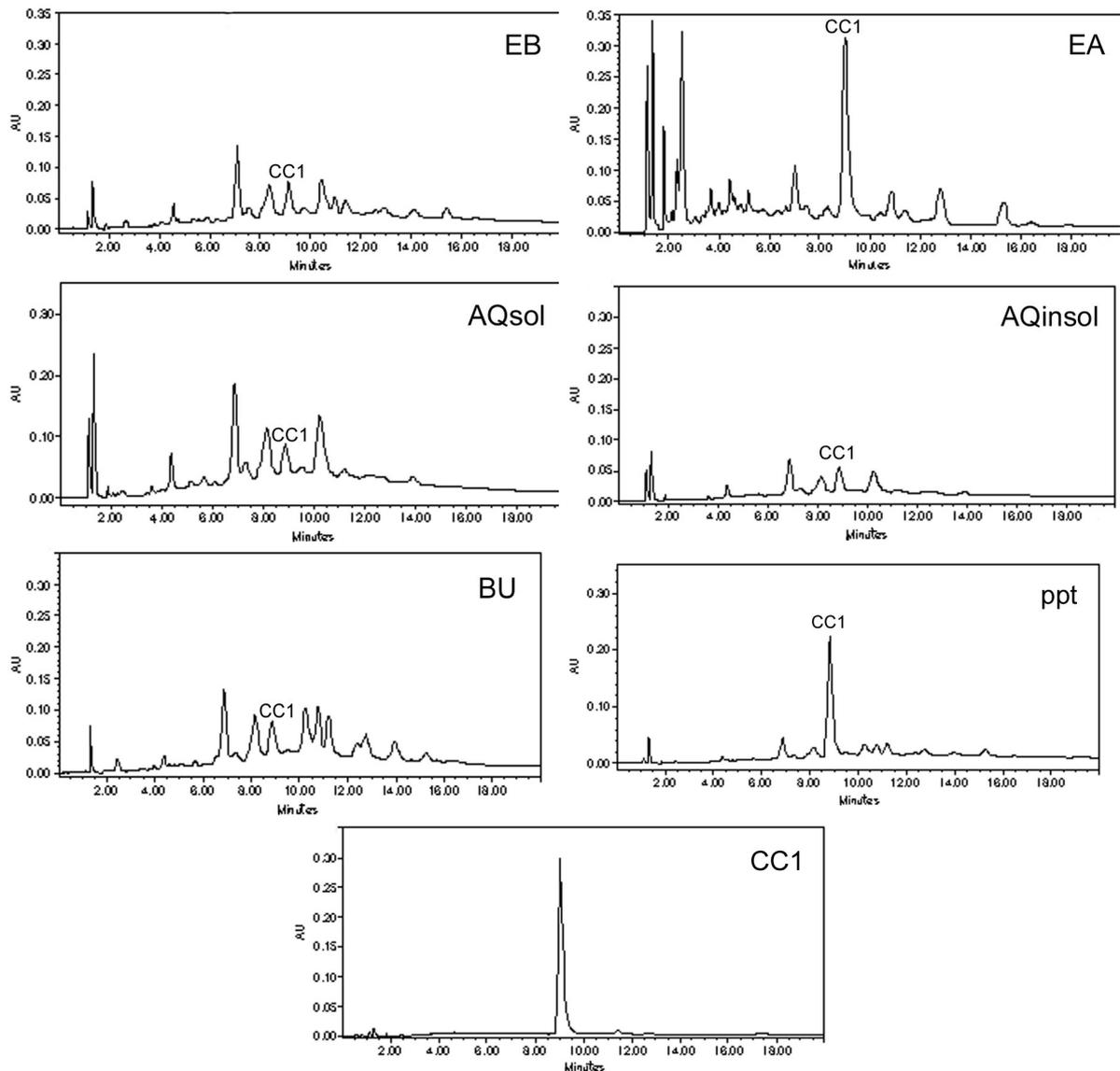


Figura 9: Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, com detecção no UV em $\lambda = 210$ nm, para os extratos e frações de *C. carthagenensis* e CC1. Condições cromatográficas: vide Tabela 4, condição G, página 50. CC1, substância isolada; EB, extrato etanólico bruto; EA, extrato aquoso; BU, fração *n*-butanólica; AQsol., fração aquosa solúvel em metanol; AQinsol., fração aquosa insolúvel em metanol; ppt, precipitado.

As condições cromatográficas desenvolvidas permitiram a obtenção de perfil cromatográfico para a espécie. Alterando-se o comprimento de onda de detecção para $\lambda =$

350 nm obtiveram-se os cromatogramas que constam na **Figura 10**.

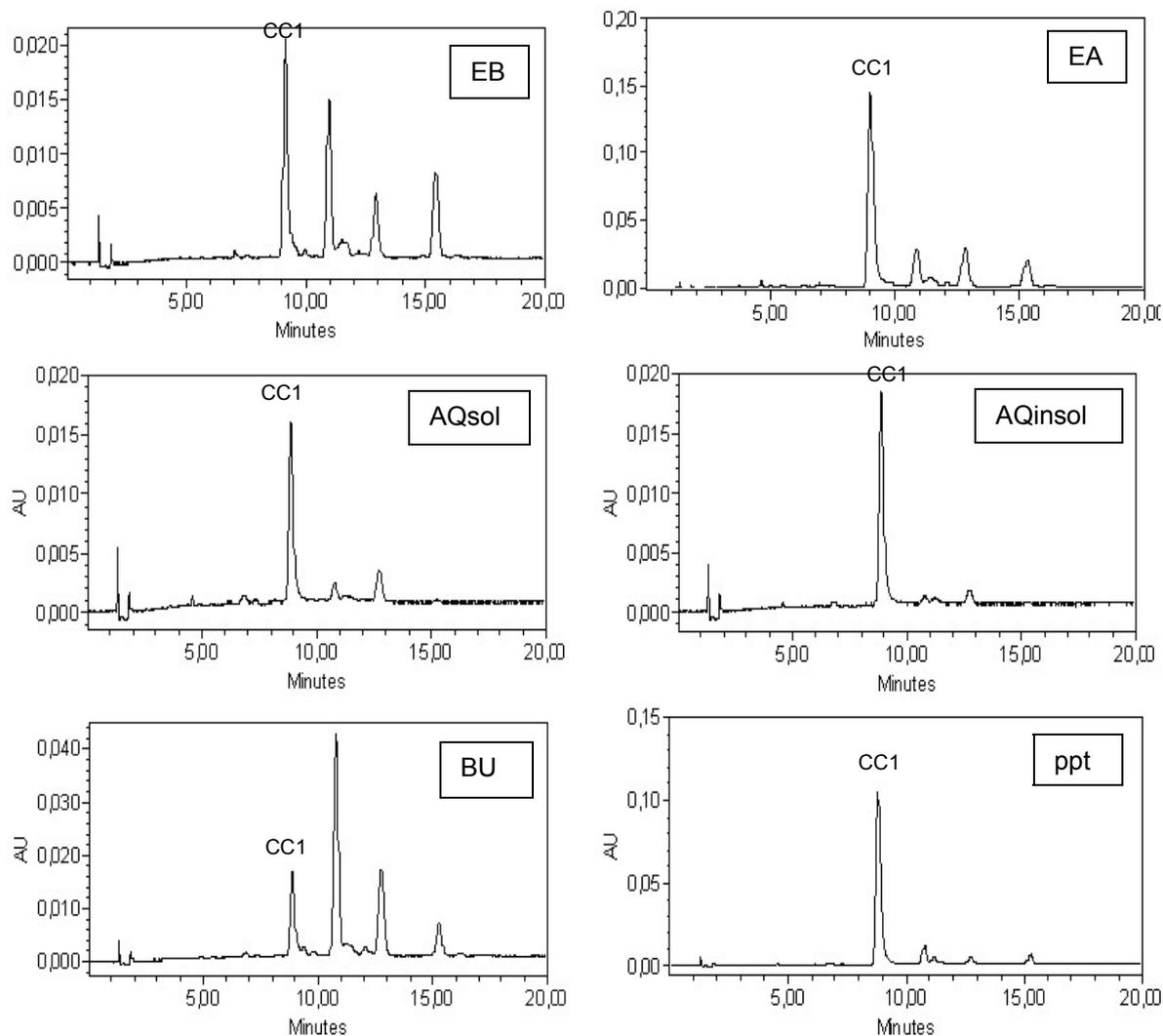


Figura 10: Perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, com detecção no UV em $\lambda = 350$ nm, para os extratos e frações de *C. carthagenensis*. CC1, substância isolada; EB, extrato bruto; EA, extrato aquoso; BU; fração n-butanólica; AQsol., fração aquosa solúvel em metanol; AQinsol., fração aquosa insolúvel em metanol; ppt, precipitado.

Comparando-se os cromatogramas das **Figuras 9 e 10** pode-se observar uma redução significativa da complexidade do cromatograma pela detecção em um comprimento de onda mais seletivo. Os espectros de absorção no ultravioleta dos quatro picos majoritários são compatíveis com flavonas ou flavonóis. Portanto, levantou-se a hipótese de que seria possível desenvolver método para doseamento de flavonoides empregando-se detecção em $\lambda = 350$ nm a fim de conseguir maior seletividade.

A comparação da composição dos diferentes extratos e frações e os resultados das

análises cromatográficas encontram-se descritos no item 5.2.4, bem como a análise conjunta dos resultados do doseamento espectrofotométrico detalhado a seguir.

5.2 Doseamentos de taninos, flavonoides e proantocianidinas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível

Métodos espectrométricos apresentam como vantagens a simplicidade, sensibilidade e custo reduzido de reagentes e equipamentos (ROLIM et al., 2005), além de, em muitas situações, não requerem uso de substâncias de referência. No caso de fitoterápicos, esta última característica tem relevância particular, já que muitos marcadores não estão disponíveis comercialmente, ou são de custo muito elevado (KIM et al., 2000).

Por outro lado, no caso dos métodos de doseamento empregados neste trabalho, o longo tempo para a preparo das amostras é uma desvantagem.

No presente trabalho, foram selecionados métodos de doseamento para classes de metabólitos secundários polares, com base em estudos anteriores que demonstraram que as frações mais polares de *C. carthagenensis* apresentam maior atividade biológica (SCHULDT et al., 2000; SCHULDT et al., 2004). No entanto, os estudos citados não relatam análise da composição química qualitativa ou quantitativa dos extratos e frações avaliados. Tal caracterização é essencial, considerando-se a grande variabilidade química encontrada entre exemplares de uma mesma espécie vegetal, conforme descrito na introdução assim como a influencia do modo de preparo dos extratos no seu perfil químico.

5.2.1 Doseamento de flavonoides totais

O método baseia-se na hidrólise dos heterosídeos e complexação das agliconas com o cátion trivalente alumínio, e leitura da absorvância do complexo em $\lambda = 425$ nm (FRANZ; KOEHLER, 1992; FARMACOPEIA Brasileira, 2001; EUROPEAN Pharmacopoeia, 2005a).

5.2.1.1 Curvas analíticas

Os resultados da análise de diferentes diluições da solução mãe de quercetina diidratada, preparadas e analisadas em três dias diferentes, encontram-se na **Tabela 22** e **Figura 11**. As concentrações foram corrigidas para serem expressas em quercetina anidra.

Tabela 22: Dados empregados na construção das curvas analíticas de quercetina anidra para doseamento espectrofotométrico de flavonoides totais.

Concentração de quercetina (µg/ml)	Absorvância em $\lambda = 425$ nm das repetições		
0,894	0,072	0,074	0,072
1,79	0,154	0,152	0,151
3,57	0,314	0,315	0,308
7,15	0,619	0,626	0,615
10,7	0,928	0,913	0,904

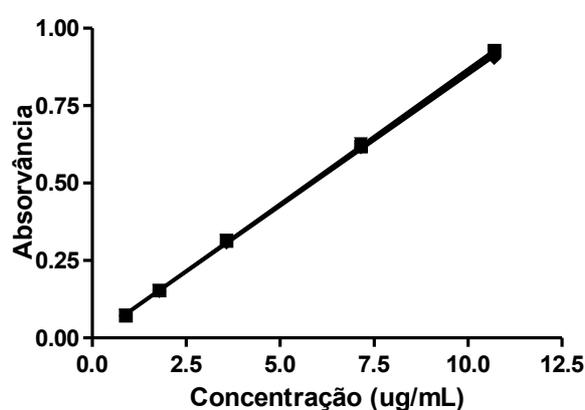


Figura 11: Curvas analíticas de quercetina anidra para doseamento de flavonoides totais por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível, n = 3.

Após análise de regressão linear, foram obtidos os seguintes valores de r^2 : 0,9999; 0,9995 e 0,9997. Análise de covariância ($p \geq 0,05$) indicou que as inclinações das retas e os interceptos são equivalentes para as três retas. Assim, a equação da reta foi estabelecida com os valores médios:

$$A = 0,0858 \times [\text{quercetina anidra}] + 0,000635$$

Onde: A = absorvância em λ igual a 425 nm

[quercetina anidra] = concentração de quercetina anidra ($\mu\text{g/ml}$)

A partir desta equação e considerando-se as diluições envolvidas no doseamento chegou-se a seguinte fórmula para cálculo da porcentagem de flavonoides totais, nos extratos e frações, calculada em quercetina anidra:

$$\% = (0,365 \times A) / m$$

Onde: A = absorvância

m = massa (g)

O desenvolvimento deste cálculo encontra-se no Apêndice A.

Na Farmacopeia Brasileira 4ª edição consta fórmula para cálculo do teor de flavonoides como hiperosídeo ou quercetina, dependendo da monografia. No caso da monografia da calêndula (FARMACOPEIA Brasileira, 2001) a fórmula é: % em hiperosídeo = $(1,25 \times A) / m$, sendo o resultado expresso em hiperosídeo.

Considerando-se as transformações necessárias para adequar tal fórmula ao método aplicado no presente trabalho, ou seja, divisão por dois em função do uso de metade das quantidades estabelecidas na farmacopeia, e transformação pela massa molecular para que o resultado seja expresso em quercetina ao invés de hiperosídeo, chegou-se a fórmula:

$$\% = (0,392 \times A) / m$$

Esta equação é muito semelhante àquela desenvolvida no presente trabalho. Isto demonstra que, no caso das monografias farmacopeicas de drogas vegetais em que é empregada a fórmula $\% = (1,25 \times A) / m$ o cálculo não inclui correção em função das diferenças entre as substâncias de referência.

5.2.1.2 Determinação da tomada de amostra

Como o ensaio é preconizado para droga vegetal (EUROPEAN Pharmacopoeia, 2005a), fez-se necessário adequar a tomada de amostra para os extratos e frações. Os resultados da análise quantitativa preliminar de flavonoides por CLAE (item 5.7.1.6) para essas matrizes foram utilizados para estimar a tomada de amostra.

5.2.1.3 Determinação do teor de flavonoides totais nos extratos e frações

Na **Tabela 23** encontram-se os resultados do doseamento de flavonoides totais por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível (UV-Vis) para os extratos e frações de *C. carthagenensis*.

A partição do extrato bruto com *n*-butanol levou à obtenção de fração com maior teor de flavonoides em relação ao extrato bruto.

Os dados obtidos indicam que as frações aquosas (solúvel e insolúvel em metanol) e o precipitado são aquelas com, respectivamente, o menor e o maior teor de flavonoides.

A análise comparativa da composição química dos extratos e frações encontra-se descrita no item 5.2.4.

Tabela 23: Teores de flavonoides totais em extratos e frações de *C. carthagenensis*, determinados por espectrofotometria no UV-Vis, n = 3.

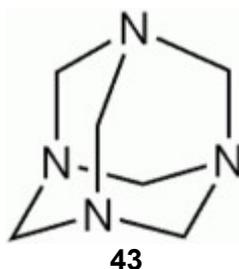
Extratos / frações	Flavonoides totais (% \pm DP, n = 3)
Extrato bruto	1,86 \pm 0,05
Extrato aquoso	1,04 \pm 0,04
Fração <i>n</i> -butanólica	4,27 \pm 0,04
Fração aquosa insolúvel	0,368 \pm 0,010
Fração aquosa solúvel	0,417 \pm 0,007
Precipitado	5,80 \pm 0,16

Como este método de doseamento inclui hidrólise com ácido clorídrico e partição com acetato de etila, apenas agliconas de *O*-heterosídeos são detectados. Em geral, os flavonoides na forma de heterosídeo são solúveis em água e soluções hidroalcoólicas; já as agliconas solubilizam-se em solventes mais apolares e soluções alcalinas, em função do caráter levemente ácido (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). No caso de amostras que contêm *C*-heterosídeos em sua composição, o teor de flavonoides determinado pelo método empregado é subestimado, o que não é provável de ocorrer para *C. carthagenensis*, já que em outras espécies de *Cuphea* prevalecem *O*-heterosídeos, conforme descrito no item 3.1.8 (SANTOS; SALATINO; SALATINO, 1995; PEREZ-CASTORENA; MALDONADO, 2003; CALZADA, 2005).

A etapa final do método envolve adição de cloreto de alumínio, pois os flavonoides formam complexos estáveis corados com o cátion trivalente do alumínio, os quais solubilizam em solução metanólica de ácido acético e apresentam deslocamento nos máximos de absorção para maiores comprimentos de onda e intensificação da absorvância, em relação ao flavonoide original, evitando-se interferência de outras classes de substâncias fenólicas, principalmente ácidos fenólicos (FRANZ; KOEHLER, 1992; FUNARI; FERRO, 2006).

Outro procedimento que faz parte deste método e tem como objetivo melhorar sua especificidade é a adição de solução de metenamina, também denominada hexamina ou hexametilenotetramina (**43**). Este reagente é empregado em reações de formilação de compostos aromáticos (Reação de Duff) (SMITH, 1972), reação relatada a primeira vez por Duff e Bills (1932) ao estudarem os produtos da reação de formilação do ácido salicílico. Em pH ácido, há formação de formaldeído a partir da metenamina (ANDERSEN; SKIBSTED, 2001), por hidrólise. Este reage com proantocianidinas produzindo aumento no grau de condensação através da formação de pontes de metileno nas posições mais reativas da molécula, os carbonos 6 e 8 do anel A (PIZZI; MITTAL, 2003), por terem caráter mais eletronegativo, que favorece a reação de substituição eletrofílica (CUNHA, 2005).

O uso de metenamina é mais recomendável que o de formaldeído pela facilidade de manipulação, já que se trata de substância sólida à temperatura ambiente (ANDERSEN; SKIBSTED, 2001). Se a reação ocorre com aldeídos aromáticos, caso da vanilina e do *p*-dimetilaminocinamaldeído, os produtos obtidos são solúveis e corados, característica que é usada para a análise espectrofotométrica dos flavanóis (CUNHA, 2005). Foi demonstrada a eficiência da metenamina (250 mg/kg de malte) na eliminação de catequinas e proantocianidinas diméricas de cerveja, observando-se, além disso, que este reagente não afeta o teor de ácidos fenólicos, por exemplo, o ácido ferúlico (ANDERSEN; SKIBSTED, 2001). Na técnica de doseamento de flavonoides, empregada no presente trabalho, a relação metenamina / droga vegetal foi de 1250 mg/kg de droga (1,25%), cujo cálculo teórico indica ser quantidade suficiente para reagir com todas as proantocianidinas presentes.



O método é preciso, no entanto, pouco exato. O valor que ele fornece pode ser diferente, geralmente inferior à quantidade de flavonoides totais realmente presente na amostra analisada. O valor medido e o real são tanto mais próximos entre si quanto maior a proporção de flavonóis na amostra, e tanto mais distantes quanto maior a proporção de flavonas. Isso se deve ao fato do comprimento de onda selecionado para a leitura, 425 nm, corresponder ao máximo de absorção do complexo quercetina-alumínio; já os complexos de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 2005). Para a amostra analisada provavelmente este comprimento de onda é adequado já que em espécies do gênero *Cuphea* diversos flavonóis apresentam a quercetina como aglicona (SANTOS; SALATINO; SALATINO, 1995). Além disso, o espectro de absorção no ultravioleta da solução analisada por este método apresentou máximo de absorção em $\lambda = 423$ nm, comprimento de onda resultante do efeito batocrômico ocasionado pela complexação com o alumínio.

5.2.2 Doseamento de taninos totais

O método se baseia na quantificação de polifenóis através de reação de oxirredução antes e após adsorção dos taninos por polivinilpolipirrolidona (PVPP). O ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico sofre redução ao oxidar as hidroxilas fenólicas.

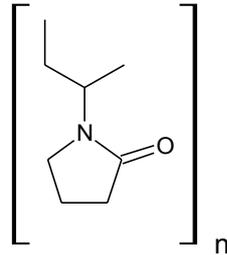
5.2.2.1 Substituição do adsorvente

O doseamento de taninos foi realizado pelo método espectrofotométrico descrito na Farmacopeia Brasileira IV (2002) para a droga vegetal cascas de *Stryphnodendron adstringens*. No método original, pó de pele é empregado como adsorvente o qual apresenta custo elevado e frequentes variações entre diferentes lotes. Assim, inicialmente foi avaliada a possibilidade de substituir pó de pele por PVPP. Para tanto, foram realizados doseamentos de taninos totais no extrato bruto (EB) empregando os dois adsorventes. Os resultados encontram-se na **Tabela 24**. A análise dos dados por teste *t* de Student não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p \geq 0,05$) indicando, portanto, que PVPP pode ser utilizado como substituto do pó de pele. O coeficiente de variação foi 6,68% para o pó de pele e 5,15% após emprego do PVPP. O PVPP é um material disponível comercialmente, produzido por ligações cruzadas entre moléculas de polivinilpirrolidona (44). É insolúvel em água, mas extremamente hidrofílico por se ligar às moléculas de água através de ligações de hidrogênio, sendo a ligação otimizada em valores de pH baixos o suficiente para suprimir ionização.

Tabela 24: Teores de taninos totais determinados no extrato bruto de *C. carthagenensis* pelo método espectrofotométrico, empregando-se pó de pele e PVPP como adsorventes.

Taninos totais % m/m \pm DP (CV %)	
Pó de pele	PVPP
28,6	29,2
27,1	31,9
30,3	33,0
32,0	30,1
32,2	33,2
31,2	32,4
30,2 \pm 2,0 (6,7)	31,6 \pm 1,6 (5,2)

Este polímero é empregado para a remoção de polifenóis durante o isolamento de enzimas, como fase estacionária em cromatografia líquida de alta eficiência e CCD (DONER; BÉCARD; IRWIN, 1993).



44

Outros autores também descreveram a possibilidade de se empregar PVPP no doseamento de taninos. Hagerman, Harvey-Mueller e Makkar (2000) relatam que taninos podem ser distinguidos de polifenóis não tânicos através do uso de matriz sólida PVPP e que tal método assume que os fenóis ligam-se ao PVPP de maneira semelhante a que se ligam ao pó de pele, por meio de interações hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio. Maksimović, Malenčič e Kozačević (2005) usaram PVPP como agente adsorvente em doseamento de taninos e Yamauchi e colaboradores (2008) no doseamento catequinas presentes no chá (*Camelia sinensis*).

Flavonoides também podem se ligar ao PVPP, sendo esta interação mais eficiente em água pura e em valor de pH suficiente para suprimir a ionização dos grupos fenólicos (6,0). Quanto às diferenças entre os flavonoides, quando as hidroxilas são substituídas por metoxilas ou os flavonoides encontram-se na forma de O-glicosídeos diminui força da ligação; a ligação é mais intensa para flavonas do que isoflavonas, que por sua vez ligam-se mais fortemente que flavanonas e diidroflavonóis (DONER; BÉCARD; IRWIN, 1993). Outro estudo cita que o uso de PVPP diminui o teor de polifenóis, flavanóis, ácidos fenólicos, heterosídeos de flavonóis, catequinas, proantocianidinas e proteínas, com maior seletividade para proantocianidinas (McMURROUGH; MADIGAN; SMYTH, 1995). No método em questão a adsorção aconteceu em meio aquoso; ou seja, pode ter ocorrido certa adsorção de flavonoides levando a resultados superestimados. Por outro lado, tendo em vista que o meio não foi acidificado, provavelmente a adsorção foi baixa.

Os resultados obtidos e os dados da literatura subsidiam o uso de PVPP como adsorvente para o doseamento de taninos totais. Portanto, no presente trabalho optou-se por usar PVPP como adsorvente de taninos pelo menor custo em relação ao pó de pele.

5.2.2.2 Curvas analíticas

Os dados de absorvância de soluções com diferentes concentrações de pirogalol

(**Tabela 25**) foram utilizados para construção das curvas analíticas para o doseamento de taninos totais (**Figura 12**). O processo de preparo das soluções e diluições foi repetido três vezes.

As curvas analíticas foram obtidas por análise de regressão linear e estão representadas na **Figura 12**. As curvas são lineares ($r^2 = 0,9983$; $0,9973$ e $0,9979$) e estatisticamente equivalentes, segundo análise de covariância ($p \geq 0,05$). Portanto, a equação da reta, apresentada em seguida, foi obtida com os valores médios de inclinação e intercepto.

$$[\text{Pirogalol}] = 0,235 \times A + 0,0641$$

Onde: [Pirogalol] = concentração de pirogalol em $\mu\text{g/ml}$

A = absorvância

Segundo a fórmula preconizada pela Farmacopeia Brasileira, citada no item 4.3.4.3, a absorvância de uma solução de referência contendo $2,5 \mu\text{g/ml}$ de pirogalol é de $0,652$.

Tabela 25: Dados empregados na construção das curvas analíticas de pirogalol para doseamento de taninos totais.

Concentração de pirogalol ($\mu\text{g/ml}$)	Absorvância		
	0,313	0,132	0,127
0,625	0,210	0,208	0,215
1,25	0,369	0,369	0,354
2,50	0,671	0,677	0,675
3,75	0,930	0,927	0,936

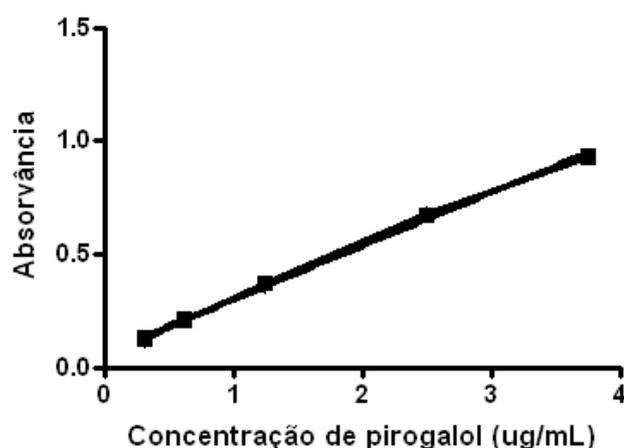


Figura 12: Curvas analíticas de pirogalol obtidas por regressão linear, $n = 3$.

No entanto, a partir das curvas analíticas obtidas do presente trabalho e considerando-se todas as diluições efetuadas, não foi possível chegar à fórmula apresentada na farmacopeia, talvez em função de alguma correção da absorvância do pirogalol, para que o resultado seja expresso em taninos totais. No Apêndice B constam os cálculos efetuados.

Para concentração de pirogalol de 2,5 µg/ml a absorvância determinada pela equação das curvas analíticas é igual a 10,64. Portanto, substituindo-se os valores na fórmula farmacopeica para taninos totais (TT) chega-se a:

$$TT = \frac{13,12 \times A}{10,64 \times m}$$

$$TT = \frac{1,23 \times A}{m}$$

Pela fórmula desenvolvida (Apêndice B):

$$TT = \frac{5 \times A}{m}$$

5.2.2.3 Determinação do teor de taninos totais nos extratos e frações

Na Tabela 26 encontram-se os resultados do doseamento de taninos totais nos extratos e frações de *C. carthagenensis*.

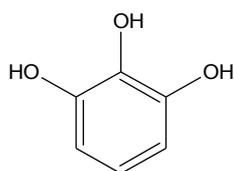
Os dados dos teores de flavonoides (Tabela 23) e taninos totais (Tabela 26) indicam que a partição do extrato bruto com *n*-butanol levou à obtenção de fração com maior teor de flavonoides e taninos. No entanto, apesar da coloração amarelada desta fração, os flavonoides não são os componentes majoritários, mas sim os taninos.

Tabela 26: Teores médios de taninos totais em extratos e frações de *C. carthagenensis*.

Extratos / frações	Taninos totais (% ± DP, n = 3)
Extrato bruto	38,3 ± 3,4
Extrato aquoso	11,8 ± 0,4
Fração <i>n</i> -butanólica	75,0 ± 0,9
Fração aquosa insol.	11,2 ± 0,1
Fração aquosa sol.	38,6 ± 1,0
Precipitado	36,5 ± 1,5

O método de doseamento empregado baseia-se em duas características dos taninos: caráter redutor e precipitação de proteínas. O íon fenolato, formado pela adição de carbonato de sódio, é oxidado por uma mistura de ácido fosfomolibdico e ácido

fosfotúngstico que, ao ser reduzido, dá origem a um complexo azul, quantificado por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível. A fim de permitir a distinção entre taninos e demais polifenóis, foi determinada a quantidade de polifenóis pela reação de oxirredução descrita, antes e após adição de adsorvente para taninos - neste caso, o PVPP - sendo o teor desses obtido pela diferença entre as duas determinações de polifenóis (CUNHA, 2005). Portanto, o resultado representa o teor de substâncias que sofrem oxidação e são adsorvidas por PVPP, ou seja, taninos hidrolisáveis e condensados, empregando-se como substância de referência o pirogalol (**45**).

**45**

A cor azul que se desenvolve, resultante do produto de redução, tem sua absorvância diminuída rapidamente com o tempo; portanto, faz-se necessário medir a absorvância da solução final exatamente 3 min após a adição do carbonato de sódio (COSTA, 2000). A presença de agentes redutores como ácido ascórbico, aminoácidos, xantinas, proteínas, entre outros, pode interferir no ensaio (HAGERMAN; HARVEY-MUELLER; MAKKAR, 2000; AGOSTINI-COSTA; LIMA; LIMA, 2003).

Quanto ao emprego de acetona como solvente, apesar de soluções aquosas de acetona levarem a um acréscimo no rendimento de taninos durante a extração, este solvente bloqueia a ligação dos taninos às proteínas (CUNHA, 2005), não podendo ser usada em métodos que se baseiam na adsorção de taninos.

5.2.3 Doseamento de proantocianidinas totais

O método empregado no doseamento (EUROPEAN Pharmacopoeia, 2005b) baseia-se na quebra oxidativa das ligações interflavonoides das proantocianidinas na presença de ácido mineral e determinação do produto formado por espectrofotometria no UV-Vis em $\lambda = 545$ nm. Schofield, Mbugua e Pell (2001) realizaram revisão sobre análise de proantocianidinas.

5.2.3.1 Determinação do teor de proantocianidinas totais nos extratos e frações

Na **Tabela 27** estão representados os resultados do doseamento de

proantocianidinas totais em extratos e frações de *C. carthagenensis*.

Tabela 27: Teores médios de proantocianidinas totais em extratos e frações de *C. carthagenensis*.

Extratos / frações	Proantocianidinas totais (% \pm DP, n = 3)
Extrato bruto	14,6 \pm 0,5
Extrato aquoso	4,78 \pm 0,22
Fração <i>n</i> -butanólica	19,8 \pm 1,5
Fração aquosa insol.	3,46 \pm 0,30
Fração aquosa sol.	9,61 \pm 0,09
Precipitado	37,9 \pm 0,5

Os resultados obtidos indicam o precipitado como sendo a fração com maior teor de proantocianidinas, seguido da fração *n*-butanólica.

Comparando-se os resultados das **Tabelas 26 e 27** observa-se que o teor de taninos totais representa mais que o dobro do teor de proantocianidinas totais para todos os extratos e frações, com exceção do precipitado. A partir desses resultados, pode ser levantada a hipótese de que o teor de taninos hidrolisáveis seja realmente maior que o de taninos condensados, conforme sugerido pelas análises por CCD, ou que a técnica empregada para a quantificação de taninos totais não seja tão específica, resultando em valor que engloba outros metabólitos secundários.

Na mesma planta podem ocorrer, simultaneamente, taninos hidrolisáveis e condensados, predominando um destes tipos. Taninos hidrolisáveis são característicos de dicotiledôneas, herbáceas e lenhosas e têm distribuição taxonômica restrita a algumas famílias. Quanto aos taninos condensados, eles têm sido identificados em todos os grupos vegetais, inclusive gimnospermas e pteridófitas (CUNHA, 2005). A espécie em questão é uma dicotiledônea, herbácea e lenhosa; além disso, em outras espécies do mesmo gênero foram isolados apenas taninos hidrolisáveis. Estas informações reforçam a hipótese da prevalência de taninos hidrolisáveis em *C. carthagenensis*, apesar de, neste trabalho, não ter sido empregado nenhum método de doseamento específico para esse tipo de tanino.

Durante a execução do método de doseamento, as soluções extrativas são aquecidas com ácido clorídrico. Em meio ácido, proantocianidinas sofrem quebra da ligação interflavônica, resultando na unidade inferior na forma livre e no carbocátion relativo à unidade de extensão, que pode ser convertido na cianidina (**Figura 13**) ou delfinidina (SANTOS; MELLO, 2004; CUNHA, 2005). O resultado é criticamente dependente da presença de traços de íons metálicos como impurezas, que auxiliam a quebra oxidativa das ligações interflavonoides na presença de ácido mineral. Sendo assim, o ensaio é mais

reprodutível e sensível com a adição de sais de ferro ao meio (PORTER et al., 1985; MAKKAR; GAMBLE; BEECKER, 1999; HAGERMAN; HARVEY-MUELLER; MAKKAR, 2000). Quettier-Deleu e colaboradores (2000) usaram, para análise de proantocianidinas totais em trigo, 0,5 ml do extrato metanólico, 6 ml de *n*-butanol / HCl (95:5 v/v) e 0,2 ml de solução de $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ em ácido clorídrico 2 M. A inclusão de algum sal de ferro ao método, conforme preconizado por Quettier-Deleu e colaboradores, não foi avaliada no presente trabalho.

A solvólise com butanol ácido é considerada por diversos autores como método de escolha para a quantificação de taninos condensados, em função da alta seletividade e simplicidade (AGOSTINI-COSTA; LIMA; LIMA, 2003; KELM; HAMMERSTONE; SCHMITZ, 2005), em comparação com a determinação espectrofotométrica de taninos com vanilina (HAGERMAN; HARVEY-MUELLER; MAKKAR, 2000; KELM; HAMMERSTONE; CUNHA, 2005; SCHMITZ, 2005). A vanilina é um aldeído aromático que reage com taninos condensados aumentando seu grau de polimerização. Este método apresenta como desvantagem não dosar apenas taninos condensados, mas também flavan-3-ols e diidrochalconas. Além disso, estes flavonoides monoméricos desenvolvem coloração mais intensa quando comparado com taninos condensados. A presença de acetona interfere neste ensaio, pois forma cromógeno com vanilina acidificada cuja absorvância máxima acontece em comprimento de onda torno de 548 nm (HAGERMAN; HARVEY-MUELLER; MAKKAR, 2000; CUNHA, 2005). Este método é sensível à presença de água, e o aumento no seu teor resulta em diminuição na intensidade de cor (HAGERMAN; HARVEY-MUELLER; MAKKAR, 2000).

Se a reação ocorre com aldeídos aromáticos, caso da vanilina e do *p*-dimetilaminocinamaldeído, os produtos obtidos são solúveis e corados, característica que também é usada para a análise espectrofotométrica dos flavanóis (CUNHA, 2005).

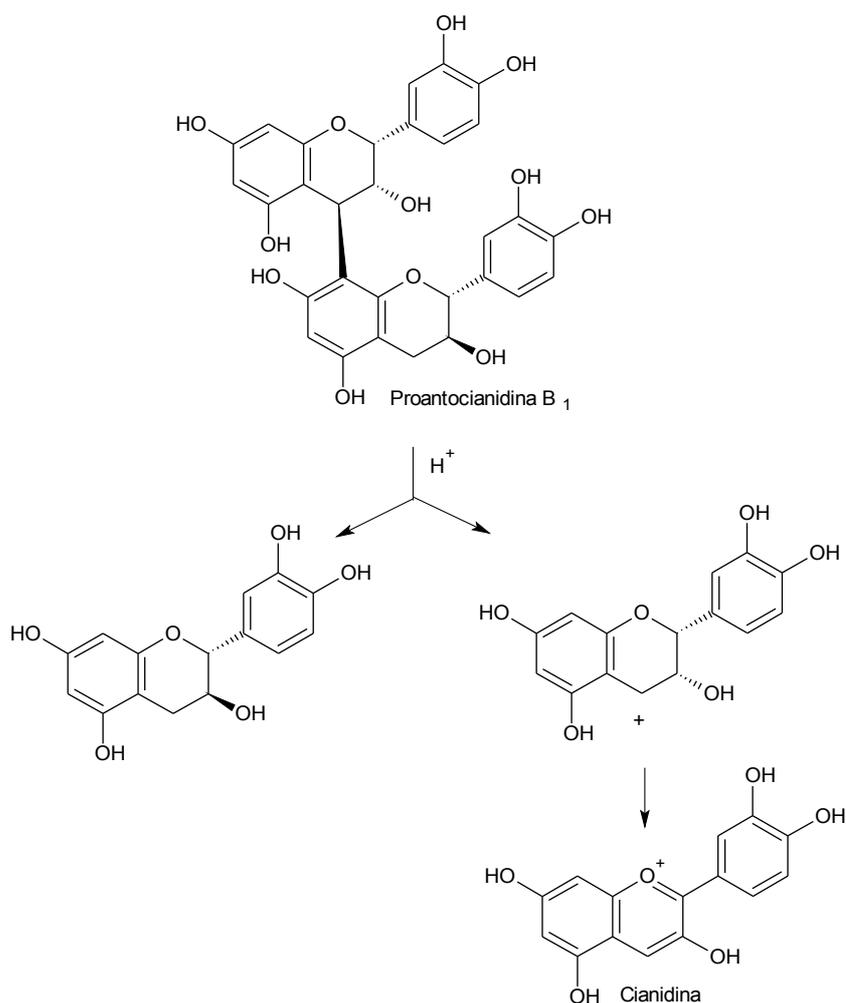


Figura 13: Solvólise ácida da ligação interflavônica resultando em unidade inferior na forma livre e em carbocátion da unidade superior, que ao oxidar forma cianidina (CUNHA, 2005).

5.2.4 Análise conjunta dos perfis cromatográficos por CCD, CLAE e doseamento espectrofotométrico

Os perfis cromatográficos e os resultados dos doseamentos espectrofotométricos (**Tabela 28**) possibilitaram caracterizar os extratos e frações conforme descrito a seguir, mostrando que possuem composição química diversa, o que é importante para a avaliação das diferenças relacionadas à atividade biológica.

– Extrato bruto: através de CCD foi possível detectar presença de taninos, flavonoides e saponinas, e pelos doseamentos percebeu-se que possivelmente predominam os taninos hidrolisáveis, já que o teor de taninos totais supera em mais de duas vezes o teor de proantocianidinas; no extrato bruto prevalecem metabólitos secundários mais polares, o

que já havia sido indicado pelo perfil cromatográfico.

Tabela 28: Teores totais de compostos polifenólicos em extratos e frações de *C. carthagenensis*, determinados por espectrofotometria no UV/Vis.

Extratos/ frações	Flavonoides totais (% \pm DP, n = 3)	Taninos totais (% \pm DP, n = 3)	Proantocianidas totais (% \pm DP, n = 3)
Extrato bruto	1,86 \pm 0,05	38,3 \pm 3,4	14,6 \pm 0,5
Extrato aquoso	1,04 \pm 0,04	11,8 \pm 0,4	4,78 \pm 0,22
Fração <i>n</i> -butanólica	4,27 \pm 0,04	75,0 \pm 0,9	19,8 \pm 1,5
Fração aquosa insol.	0,368 \pm 0,010	11,2 \pm 0,1	3,46 \pm 0,30
Fração aquosa sol.	0,417 \pm 0,007	38,6 \pm 1,0	9,61 \pm 0,09
Precipitado	5,80 \pm 0,16	36,5 \pm 1,5	37,9 \pm 0,5

– Extrato aquoso: apresenta como pico majoritário em CLAE aquele equivalente ao flavonoide CC1, maior número de picos com tempo de eluição inferior a 3 min em comparação ao extrato bruto, porém os doseamentos indicaram que todos os metabólitos quantificados foram menos extraídos com água quente que com etanol. Por outro lado, a CCD indica que se trata de extrato onde prevalecem compostos mais polares que a rutina, de forma mais evidente que para o extrato bruto. Trata-se do extrato que se assemelha mais, quanto ao modo de preparo, do uso medicinal tradicional da espécie.

– Fração *n*-butanólica e precipitado: foi detectada presença de flavonoides, saponinas e taninos hidrolisáveis por CCD. Seu perfil por CLAE foi semelhante àquele do extrato bruto; no entanto, o teor de flavonoides foi 2,3 vezes maior e o de taninos, 2 vezes maior. Se não houvesse formação de precipitado na etapa anterior essa relação seria ainda maior. Por outro lado, a formação do precipitado possibilitou o predomínio de proantocianidinas nesta fração em relação aos demais extratos e frações, a presença de taninos hidrolisáveis foi detectada por CCD.

– Fração aquosa solúvel em metanol: as análises por CCD sugerem o predomínio de taninos e saponinas. Quanto aos flavonoides, apenas CC1 foi detectado por CLAE. Portanto, a partição com *n*-butanol não foi suficiente para extrair a totalidade de CC1 e taninos hidrolisáveis, provavelmente pela baixa solubilidade.

Tendo em vista que os extratos e frações apresentaram perfis qualitativos e quantitativos distintos, todos eles foram submetidos ao ensaio de vasodilatação em anéis de aorta de rato. Pretende-se, com isso, estabelecer relações entre a atividade biológica e a composição química dos extratos e frações.

5.3 Avaliação da atividade biológica

5.3.1 Ensaio *in vitro* de vasodilatação em anéis de aorta

5.3.1.1 Atividade dos extratos e frações

Na **Figura 14** estão representadas as curvas de concentração resposta cumulativa obtidas para as frações e extratos ensaiados, e os valores de pCI_{50} correspondentes a cada curva. Através de regressão não linear, com *slope* variável, das curvas sigmoidais de concentração *versus* vasodilatação, calculou-se o logaritmo negativo da concentração inibitória a 50% (pCI_{50}) para cada extrato e fração. Para o extrato aquoso não foi possível calcular a pCI_{50} já que o mesmo atingiu apenas $50,8 \pm 8,8$ % de dilatação, ou seja, não atingiu a dilatação máxima, apesar de terem sido avaliadas doses maiores que aquelas onde aconteceu a maior dilatação gerada por esse extrato.

Na **Tabela 29** estão listados os valores de pCI_{50} calculados para os diferentes extratos e frações ensaiados, os quais foram submetidos a análise de variância (ANOVA, *one way*), seguida de teste de separação de médias, de Tukey (**Figura 15**). ANOVA (*one way*) demonstrou haver diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos com os diferentes extratos e frações. Portanto, foi necessário aplicar teste de separação de médias a fim de se conhecer onde se encontram as diferenças. Através do teste de Tukey constatou-se que os efeitos vasodilatadores das frações *n*-butanólica, aquosa solúvel em metanol, do precipitado e do extrato bruto são equivalentes, e diferentes daquele induzido pela fração aquosa insolúvel em metanol (**Tabela 29** e **Figura 15**). Como não se detectou diferença estatisticamente significativa entre a atividade biológica do extrato bruto e das frações derivadas (BU, ppt e AQsol), levanta-se a hipótese de que talvez não exista vantagem no fracionamento, ao se pensar em uma potencial utilização de *C. carthagenensis* para o desenvolvimento futuro de um fitoterápico anti-hipertensivo.

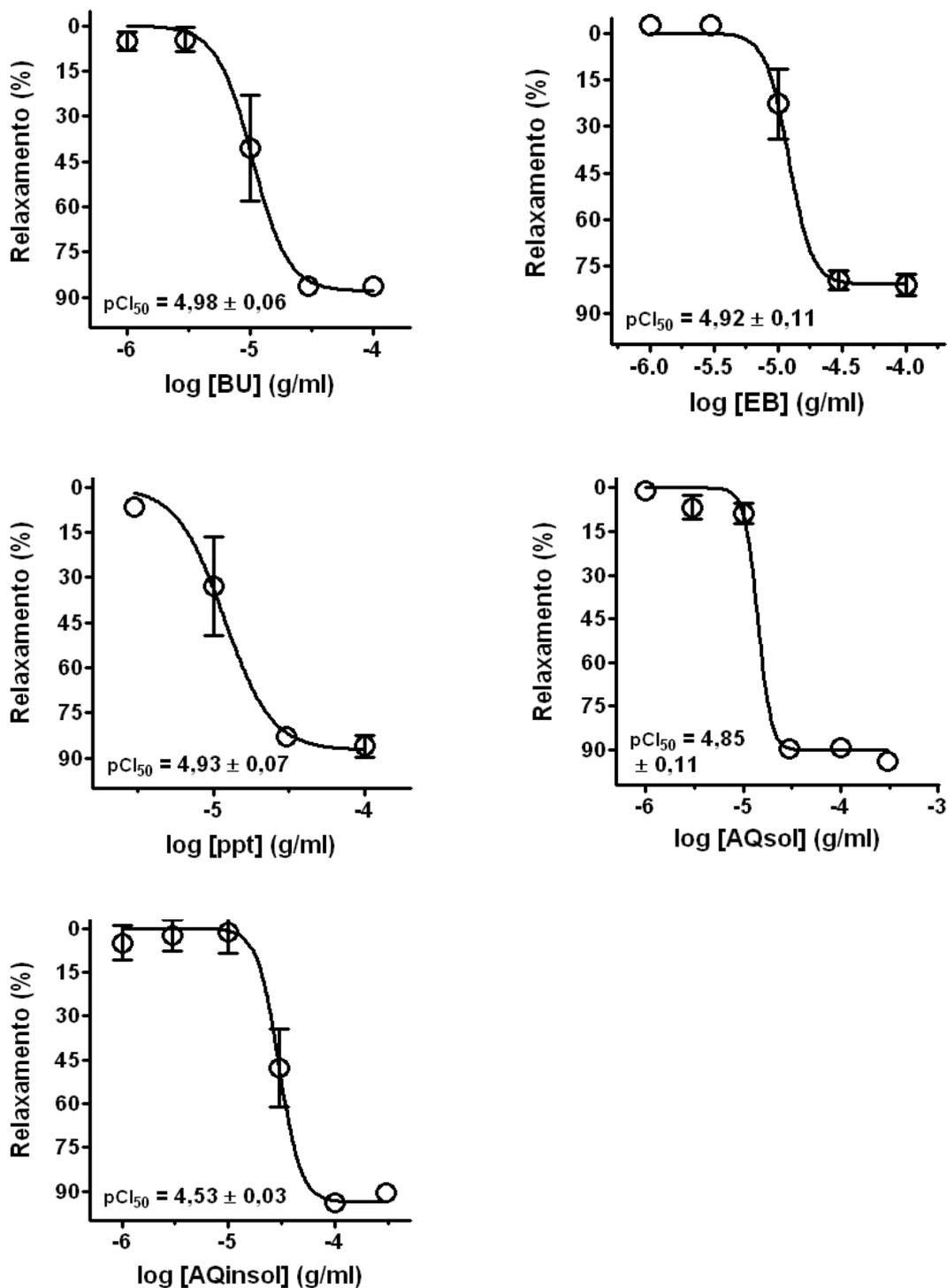


Figura 14: Curvas concentração resposta cumulativa das porcentagens de relaxamento e pCl₅₀ obtidos para frações e extratos de *C. carthagenensis*, em anéis de aorta com endotélio funcional, pré contraídos com fenilefrina. Cada ponto representa média e o desvio padrão de 4 replicatas. BU = fração *n*-butanoica; EB = extrato bruto; ppt = precipitado; AQsol = fração aquosa solúvel em metanol; AQinsol. = fração aquosa insolúvel em metanol.

Tabela 29: Média dos logaritmos negativos da concentração inibitória a 50% (pCI_{50}) calculados para extratos e frações de *C. carthagenensis*, seguida do desvio padrão, $n = 4$ a 5 .

Extratos / frações	Média \pm DP*
Fração <i>n</i> -butanólica	4,98 \pm 0,06 ^a
Precipitado	4,93 \pm 0,07 ^a
Extrato bruto	4,92 \pm 0,11 ^a
Fração aquosa solúvel em metanol	4,85 \pm 0,11 ^a
Fração aquosa insolúvel em metanol	4,53 \pm 0,03 ^b

*Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

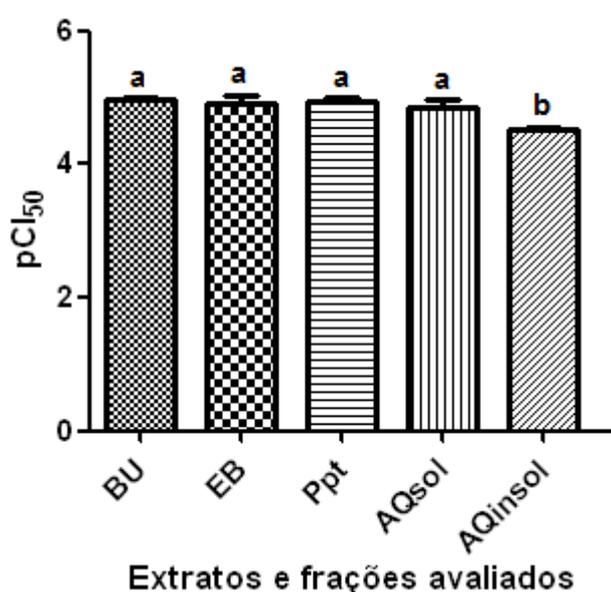


Figura 15: Valores de pCI_{50} determinados no ensaio de vasodilatação para extratos e frações de *C. carthagenensis*.

Em estudo de vasodilatação, realizado com extrato e frações de *C. carthagenensis*, Schuldt e colaboradores (2000) relataram que a fração *n*-butanólica foi mais ativa ($pCI_{50} = 5,16$) que o extrato hidroalcoólico a 70% ($pCI_{50} = 4,46$) e que a fração em acetato de etila ($pCI_{50} = 4,24$). A comparação entre esses resultados e aqueles obtidos no presente trabalho não é possível devido as diferenças no preparo dos extratos (EtOH 70% e EtOH 96%, respectivamente), origens dos materiais vegetais (planalto do Paraná e litoral de Santa Catarina, respectivamente).

Para um extrato padronizado de *Crataegus* foi relatado $pCI_{50} = 1,56$ em modelo de vasodilatação semelhante ao empregado no presente trabalho (KIM et al., 2000). Ou seja, para ocorrer 50% de relaxamento com este extrato foi necessária uma concentração, pelo

menos, 300 vezes superior àquela observada para os extratos e frações de *C. carthagenensis*. Estes dados demonstram que o extrato de *Crataegus* é menos potente, apesar das variações das condições experimentais, inerentes ao mesmo ensaio biológico realizado em laboratórios localizados em continentes diferentes.

Crataegus oxycantha L. e *C. monogyna* Jacq são empregadas, especialmente na Europa, no tratamento de insuficiência cardíaca em estágios menos avançados, angina e hipertensão (CHEN et al., 1998; KIM et al., 2000; SCHWINGER et al., 2000; PITTLER; GUO; ERNST, 2008). Empregando ensaios de dilatação em preparações de aorta, proantocianidinas foram identificadas como os metabólitos responsáveis pela ação vasodilatadora de *C. oxycantha* e *C. monogyna*, sendo flavonoides também constituintes químicos da espécie (CHEN et al., 1998; KIM et al., 2000). Um dos extratos padronizados aprovados para uso clínico em países europeus é o WS 1442, que apresentou CI_{50} igual a $7,4 \pm 1,7 \mu\text{g/ml}$ ($pCI_{50} = 5,13$) em modelo de vasodilatação em artéria suína (BRIXIUS et al., 2006). Ou seja, para o extrato padronizado foi determinado um valor de pCI_{50} maior em relação aos extratos e frações mais ativos de *C. carthagenensis*.

Outro exemplo descrito na literatura é a fração *n*-butanólica de *Epimedium sagittatum* (Berberidaceae), que apresentou CI_{50} de $0,160 \pm 0,003 \text{ mg/ml}$ ($pCI_{50} = 3,79$) em modelo de vasodilatação semelhante ao empregado no presente trabalho (WANG; TSAI; LIN, 2007). Este dado sugere que a fração seja menos potente que os extratos e frações de *C. carthagenensis* avaliados.

Quando se analisam os valores de relaxamento máximo induzidos pelos extratos e frações de *C. carthagenensis*, listados na **Tabela 30**, através de análise de variância e teste de Tukey, observa-se que todos eles são estatisticamente equivalentes, com exceção daquele obtido para o extrato aquoso.

Tabela 30: Valores percentuais de dilatação máxima induzidos por extratos e frações de *C. carthagenensis*, n = 4.

Extratos / frações	Média \pm DP *
Fração aquosa insolúvel em metanol	94,8 \pm 4,3 ^a
Fração aquosa solúvel em metanol	89,1 \pm 4,5 ^{a,b}
Fração <i>n</i> -butanólica	86,2 \pm 1,6 ^{a,b}
Precipitado	86,0 \pm 7,1 ^{a,b}
Extrato bruto	81,8 \pm 5,1 ^b
Extrato aquoso	50,8 \pm 8,8 ^c

*Letras distintas na coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

O extrato aquoso não apresentou efeito vasodilatador máximo até a concentração de 10^{-4} g/ml.

Schuldt e colaboradores (2000) relatam relaxamento máximo de 76,0% para o extrato hidroalcoólico, 97,1% para a fração *n*-butanólica e 98,8% para a fração em acetato de etila de partes aéreas de *C. carthagenensis*.

Durante a realização do ensaio fez-se necessário esperar cerca de 10 min para que o efeito total de cada concentração avaliada fosse obtido. Este fato indica que, provavelmente, as substâncias ativas não agem diretamente em receptores presentes em células da musculatura lisa vascular, o que resultaria em efeito mais rápido. Este resultado é apoiado por outros estudos realizados com extratos e frações de *Cuphea carthagenensis* (SCHULDT et al., 2000).

No modelo de vasodilatação utilizado para análise dos extratos e frações, fenilefrina é empregada para promover contração sustentada, pois é baixo o tônus basal da artéria (MCNEILL; JURHENS, 2006). Através de teste inicial com acetilcolina verificou-se a capacidade de cada anel de aorta em responder a esse neurotransmissor, que é capaz de reverter completamente a contração causada pela fenilefrina, por estimular a produção de óxido nítrico (NO) pelas células do endotélio, que se difunde pelas células da musculatura lisa vascular, onde atua causando relaxamento da musculatura (CHEN; PITTMAN; POPEL, 2008). Como este mecanismo é totalmente dependente da presença de endotélio, a porcentagem de dilatação causada pela acetilcolina tem relação direta com a porcentagem de endotélio presente no anel de aorta. Tal procedimento é fundamental, visto que durante a manipulação da artéria é possível danificar sua parte interna, ou seja, o endotélio, resultando em preparações que não têm a capacidade de responder a substâncias que exerçam efeito vasodilatador através de mecanismo dependente de endotélio.

Após repetição do teste para determinar a porcentagem de endotélio funcional existente ao final do experimento, constatou-se que o extrato aquoso e a fração aquosa insolúvel em metanol foram os que melhor mantiveram a integridade do endotélio. Para os demais extratos e frações foram detectadas alterações na funcionalidade do endotélio, as quais poderiam estar relacionadas com efeito irreversível ou com alguma forma de toxicidade destes derivados. Esses efeitos poderão ser avaliadas em estudos posteriores.

Um trabalho de revisão sobre atividade vasodilatadora de produtos naturais derivados de espécies vegetais indica que o ensaio de vasodilatação em aorta é o mais usado (MCNEILL & JURGENS, 2006), sendo poucos os estudos conduzidos *in vivo* e raros os estudos clínicos. Faz-se, portanto, necessário empreender esforços e investimentos em pesquisas clínicas na área, que resultem no desenvolvimento de novos fitofármacos ou

medicamentos fitoterápicos como opções terapêuticas para o tratamento da hipertensão.

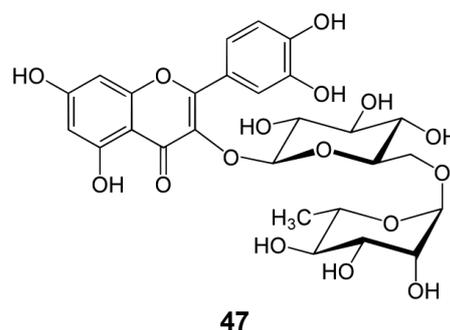
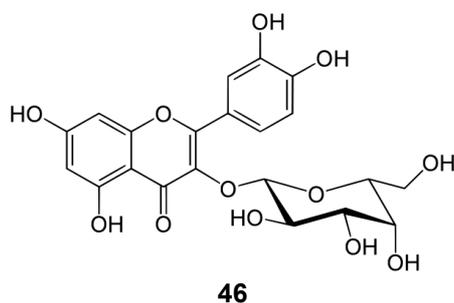
Os resultados dos ensaios de vasodilatação foram submetidos a análises de correlação com os teores totais de constituintes polifenólicos determinados para os extratos e frações de *C. carthagenensis*. Esses dados encontram-se descritos no item 5.4.

5.3.1.2 Atividade vasodilatadora de CC1

A substância CC1 (item 5.5.1 e 5.6.1) induziu cerca de 20% de dilatação em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, quando avaliada na concentração de até 3×10^{-4} M ($1,2 \times 10^{-4}$ g/ml), concentração na qual observou-se vasodilatação, sendo considerada inativa. Já a quercetina, ensaiada no mesmo dia e nas mesmas concentrações, produziu cerca de 50% de relaxamento. No entanto, estes resultados são preliminares, já que foram realizadas apenas duas repetições, o que impede aplicação de cálculos estatísticos. Esta avaliação foi fundamental para determinar se existiria diferença de potência entre esses dois flavonoides no ensaio biológico utilizado, bem como para descartar a possibilidade de degradação da quercetina-3-sulfato em quercetina. A possibilidade de ocorrer degradação era remota, já que a dissolução em DMSO e solução de Krebs 1:1 foi realizada imediatamente antes do uso. Além disso, já se tinha algum conhecimento sobre a estabilidade da quercetina-3-sulfato em DMSO. A substância havia sido estável pelo menos durante o tempo de realização e repetição da análise por espectrometria de ressonância nuclear magnética (item 5.6).

Conforme mencionado acima, foram realizadas apenas duas repetições, já que CC1 foi inativa e a atividade vasodilatadora da quercetina já fora relatada anteriormente (FITZPATRICK et al., 1993 APUD MACHHA; GILANI; MUSTAFA, 2003).

Outros flavonoides também foram descritos na literatura como inativos em ensaios de vasorelaxação em anéis de aorta, por exemplo, o hiperosídeo (**46**) (10^{-5} g/ml ou $2,15 \times 10^{-5}$ M), rutina (**47**) (10^{-5} g/ml ou $1,64 \times 10^{-5}$ M) e vitexina (10^{-5} g/ml ou $2,31 \times 10^{-5}$ M), assim como os flavonoides de *Crataegus* (10^{-5} M) (KIM et al., 2000). As concentrações avaliadas por esses autores são inferiores àquelas empregadas para quercetina-3-sulfato. De maneira semelhante flavonoides prenilados isolados da fração *n*-butanólica de *Epimedium sagittatum* apresentaram vasodilatação pequena ou moderada em aorta (WANG; TSAI; LIN, 2007).



Estudos sobre a absorção de flavonoides indicam que a quercetina-3-sulfato é principalmente absorvida na forma de sua aglicona, a quercetina (AHENE; O'BRIEN, 2002). Portanto, mesmo que este flavonoide não seja ativo no modelo empregado no presente trabalho, o seu principal produto de degradação é ativo. Além disso, em um estudo em que se avaliou a atividade vasodilatadora da quercetina e de alguns derivados glicosilados indicou que a quercetina apresenta maior atividade (CHEN; HU; JIANG, 2004). A quercetina é um dos flavonoides encontrados em quantidades mensuráveis em plantas com atividade anti-hipertensiva (CHEN; HU; JIANG, 2004).

Quanto a estudos clínicos, foi encontrado apenas um envolvendo 41 voluntários, com hipertensão em estágio 1, constatou-se que suplementação de quercetina (730 mg/ dia) reduziu a pressão arterial sistólica em 7 ± 2 mmHg e a diastólica em 5 ± 2 mmHg, sem afetar o estresse oxidativo, comparando-se com placebo. O período de avaliação durou 28 dias, não sendo detectados efeitos adversos em nenhum dos grupos (EDWARDS et al., 2007). Quercetina é um dos flavonoides cuja presença é mais comum em espécies vegetais alimentícias, está presente, por exemplo, em cebola, maçã, brócolis, couve, tomate, vinho tinto, chá verde. Ensaio clínicos sugerem que flavonoides contidos em alimentos tenham efeitos anticancerígenos, atividade anti-HIV, previnam doenças coronarianas e relacionadas ao sistema venoso (YAO et al., 2004).

5.3.1.3 Considerações sobre ensaios *in vitro* e *in vivo*

Finalizando esta seção, é importante mencionar que ensaios *in vitro* – apesar de serem muito empregados na área de produtos naturais para avaliação da atividade biológica de extratos, frações e substâncias isoladas – devem ser interpretados com cautela, a fim de se evitar reducionismo. Não se pode assumir que o efeito observado *in vitro* será observado em estudos *in vivo* ou clínicos, já que não se considera a biodisponibilidade das substâncias avaliadas. Não se sabe se a ação observada ocorre nas concentrações plasmáticas

atingidas após a ingestão dos produtos testados (McNEILL; JURGENS, 2006; HOUGHTON et al., 2007). Além disso, pode haver diferenças quanto ao metabolismo em diferentes espécies. Tais questionamentos também são apontados por Espín, García-Conesa e Tomás-Barberán (2007), pesquisadores da área de nutracêuticos.

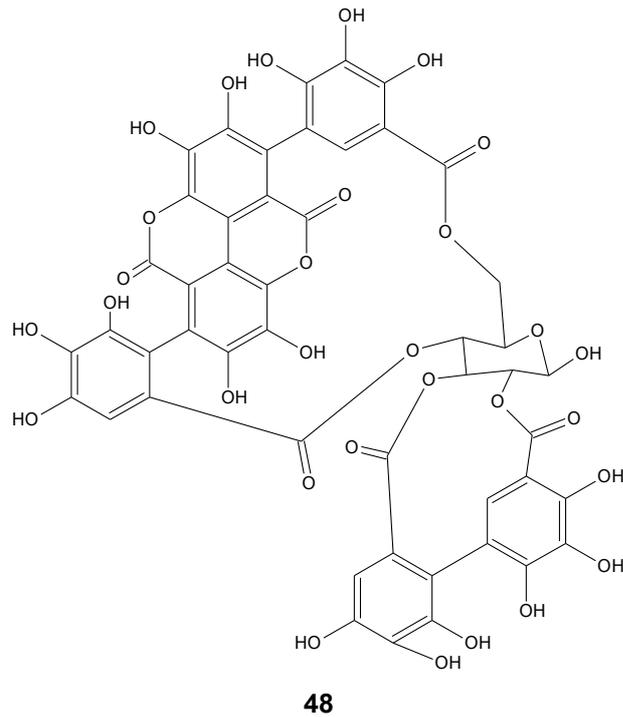
Estudos indicam que glicosídeos de flavonoides não atingem concentrações plasmáticas na sua forma original. Até mesmo as agliconas não são detectadas em quantidades significativas. Os metabólitos predominantes são agliconas, as quais formam conjugados sulfatados, metilados e com ácido glicurônico (SHALI et al., 1991; CHAO; HSIU; HOU, 2006; ZHANG; ZUO; LIN, 2007; LOKE et al., 2009), que frequentemente apresentam meia vida maior devido à recirculação entero-hepática. Essa baixa biodisponibilidade pode ser explicada tanto pela baixa absorção quanto pelo metabolismo por bactérias entéricas e enzimas hepáticas. Parte dos flavonoides é convertida em ácidos fenólicos e compostos aromáticos (LOKE et al., 2009). Metabolismo de primeira passagem intestinal e hepática, assim como transportadores de efluxo, como a glicoproteína P em células intestinais, também contribuem para a baixa biodisponibilidade de flavonoides (ZHANG; ZUO; LIN, 2007).

Sendo assim, testes *in vitro* com metabólitos conjugados podem prever melhor a eficácia de plantas medicinais que contêm glicosídeos (WISEMAN; MULDER; RIETVELD, 2001; CHAO; HSIU; HOU, 2006).

Outro enfoque no estudo de flavonoides é o estabelecimento de marcadores de consumo, já que essas substâncias estão presentes em diversos alimentos da dieta humana, como exemplo citamos a pesquisa de Loke e colaboradores (2009) que determinaram o aumento na excreção urinária de 11 compostos aromáticos, incluindo 1,3,5-trimetoxibenzeno, ácido 4-O-metil gálico, ácido 3-O-metil gálico e ácido gálico após ingestão de quercetina. Estima-se que a quantidade diária de quercetina ingerida esteja entre 20 e 35 mg, tal composto pode ser proveniente tanto de plantas medicinais quanto de alimentos. Outros estudos indicam ingestão diária de quantidades maiores, entre 100 e 1.000 mg/dia (YAO et al., 2004).

Quanto à biodisponibilidade de taninos, em função da sua elevada massa molecular, considera-se que elagitaninos não são completamente absorvidos. Apenas pequenas quantidades de punicalagina (**48**) foram detectadas após administração prolongada e altas doses em ratos (ESPÍN; GARCÍA-CONESA; TOMÁS-BARBERÁN, 2007). Os ratos foram alimentados com ração comercialmente disponível adicionada de extrato de *Punica granatum* L. de modo a resultar em teor de punicalagina igual a 6%. Do total ingerido, 4% foi

detectado na urina na forma de punicalagina e seus metabólitos, enquanto 6% destas substâncias foram detectadas nas fezes (CERDÁ et al., 2003). Os elagitaninos são hidrolisados a ácido elágico no intestino delgado, sendo este rapidamente absorvido (ESPÍN; GARCÍA-CONESA; TOMÁS-BARBERÁN, 2007).



Para proantocianidinas a questão da biodisponibilidade também é fundamental. As poliméricas não são absorvidas como tal, são metabolizadas pela microflora intestinal resultando em derivados fenilpropíonicos e fenilacéticos. Catequina conjugada com ácido glicurônico ou com ácido glicurônico metilado foram detectadas no plasma de ratos após administração oral. Estes metabólitos, seus derivados sulfatados, dímeros e trímeros foram encontrados na urina (ESPÍN; GARCÍA-CONESA; TOMÁS-BARBERÁN, 2007).

Sobre o ensaio de vasodilatação em aorta, existe a limitação de não se considerar eventos que ocorrem em pequenas artérias e arteríolas, que são os vasos de resistência (McNEILL; JURGENS, 2006). Existem outros modelos *in vitro* que avaliam a ação nestes vasos. Por outro lado, este ensaio *in vitro* apresenta como vantagem o uso de poucos animais, já que é possível obter seis anéis de aorta por animal minimizando a manipulação de animais vivos e, conseqüentemente, seu sofrimento.

5.3.2 Ensaio de atividade hipotensora *in vivo*

O gráfico representado na Figura 16 mostra a variação da pressão arterial em função do tempo, após a administração do extrato bruto de *C. carthagenensis* nas doses de 10 e 100 mg/kg a camundongos normotensos e o controle negativo (salina e Tween 80). A fração *n*-butanólica foi avaliada nas mesmas concentrações, sendo os resultados apresentados na Figura 17.

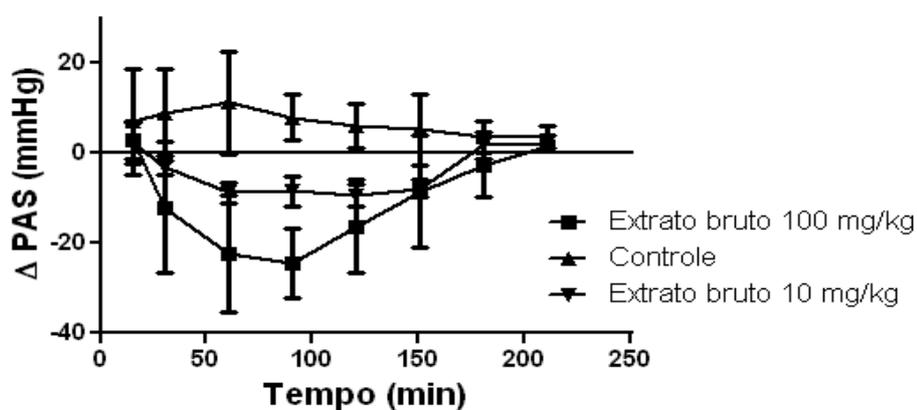


Figura 16: Variação da pressão arterial de camundongos normotensos após administração, por via oral, de extrato bruto de *Cuphea carthagenensis* nas doses de 10 e 100 mg/kg, n = 6.

Os resultados indicam que há diferença entre os tratamentos e o tempo, avaliados através da aplicação de ANOVA *two-way* ($p < 0,05$), tanto para o extrato quanto para a fração.

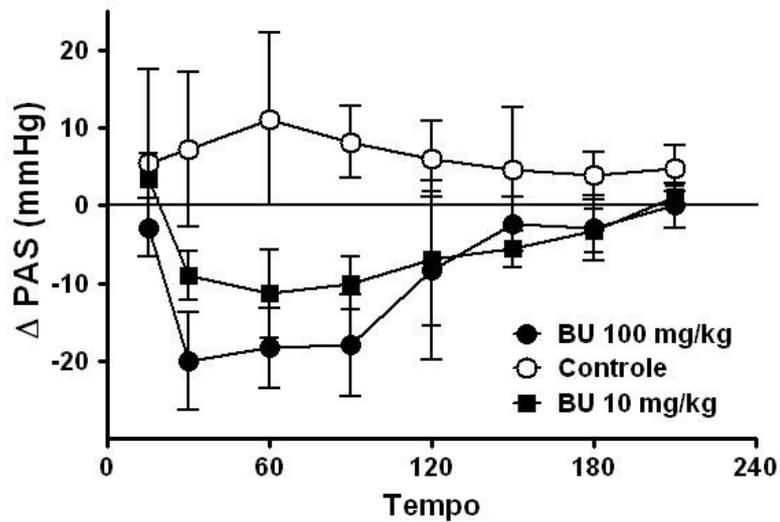


Figura 17: Variação da pressão arterial sistólica (Δ PAS) de camundongos normotensos após administração, por via oral, de fração *n*-butanólica (BU) de *Cuphea carthagenensis* nas doses de 10 e 100 mg/kg, em função do tempo em min, $n = 6$.

Após aplicação do teste de separação de médias constatou-se que o extrato bruto nas doses de 10 e 100 mg/kg resultou em variação de pressão diferente do controle nos intervalos de tempo de 30 a 150 min após a administração. A diferença entre as doses avaliadas só foi significativa para os tempo de 60 e 90 min. Para a fração *n*-butanólica os resultados foram semelhantes, mas só foram encontradas diferenças significativas entre o intervalo de 30 e 120 min para ambas as doses em relação ao controle. A resposta induzida pelas doses de 10 e 100 mg/kg apresentou diferença estatística somente para o tempo de 30 min após a administração. Como houve grande variação entre as repetições, considera-se a possibilidade de que, se for analisado um número maior de replicatas, as diferenças entre as doses sejam detectadas.

O tempo de ação foi curto (cerca de 2 h) considerando a possibilidade futura de se desenvolver um medicamento para tratamento crônico de hipertensão, o que não significa que experimentos diferentes (com maior tempo de tratamento, uso de animais hipertensos, estudos clínicos e/ou aplicação de menor dose) não possam apresentar outros resultados. Mas, se o rápido início e final da ação se confirmarem em estudos clínicos, talvez tal medicamento possa ser indicado em casos de urgência ou emergência hipertensiva, e não para o tratamento crônico. Por outro lado, o tempo de ação é grande suficiente para justificar o teste em modelos animais de hipertensão. Em comunicação pessoal, professor Steyner de França Côrtes relatou que em estudos realizados no seu grupo de pesquisa, foi observado

que animais hipertensos são mais sensíveis a ação de drogas anti-hipertensivas do que os normotensos. Isto sugere que doses menores que 10 mg/kg possam ser utilizadas em estudos de avaliação da atividade anti-hipertensiva de *C. carthagenensis* em animais hipertensos. Como o objetivo do protocolo terapêutico da hipertensão arterial é induzir uma redução gradual da pressão arterial, torna-se plausível imaginar que doses muito baixas do extrato de *C. carthagenensis* possam ser utilizadas.

Como descrito na revisão bibliográfica, extrato aquoso de partes aéreas da espécie reduziu a pressão arterial de ratas normotensas e hipertensas a partir do sétimo dia de tratamento (OSSES, 2000), sendo que não se conseguiu localizar artigo publicado com os dados desta tese.

Em estudo realizado para o extrato aquoso e fração *n*-butanólica de *Cecropia glaziovii*, caracterizados pelo seu teor de catequinas, flavonoides e proantocianidinas, o extrato aquoso apresentou atividade hipotensora nas doses de 0,15 a 0,5 g/kg por via oral em ratos normotensos durante 3 meses, sendo ação máxima observada em 2 a 3 semanas. A pressão diminuiu gradativamente cerca de 0,3 mmHg por dia até o máximo de 20 mmHg (LIMA-LANDMAN et al., 2007). Nossos resultados se referem apenas ao efeito hipotensor por algumas horas, com doses maiores (0,01 e 0,1 g/kg). A variação máxima na pressão arterial no ensaio realizado com extrato de *C. carthagenensis* parece ser semelhante àquela obtida para *Cecropia*, mas aparentemente o tempo de ação foi menor para *Cuphea*, reforçando as considerações anteriores.

Outra questão a ser levantada durante o desenvolvimento de um medicamento anti-hipertensivo são os potenciais efeitos adversos relacionados à ocorrência de hipotensão. O experimento realizado mostrou que, em camundongos, o extrato de *C. carthagenensis* é capaz de causar hipotensão, ou seja, diminuir a pressão arterial quando a mesma estiver normal, já que os animais eram normotensos, sendo necessário investigar as diferenças entre o efeito hipotensor e anti-hipertensivo de extratos e frações desta espécie, assim como avaliar tais efeitos com doses menores. Um medicamento ideal deveria normalizar a pressão arterial quando a mesma estiver elevada sem risco de causar hipotensão, a fim de se evitar danos à saúde como pode acontecer, por exemplo, com a administração de nifedipina. Como não foram realizados estudos que avaliem os efeitos adversos não se pode afirmar que num estudo clínico será observada hipotensão. Além disso, não se conhece a toxicidade aguda e crônica.

Para *Cecropia* foi avaliado também efeito anti-hipertensivo pois ensaios adicionais foram realizados com ratos espontaneamente hipertensos, ratos com hipertensão induzida pelo inibidor da NO sintase L-NAME, ratos com hipertensão induzida por constrição de

artéria renal. Nestes casos o tratamento durou 60 dias, sendo observado efeito máximo em 4 a 15 dias. Tais ensaios seriam importantes para avaliar a atividade anti-hipertensiva de *C. carthagenensis*.

Não foram encontrados ensaios clínicos para avaliar medicamentos ou preparações a base de *C. carthagenensis*.

5.4 Correlação entre o teor de metabólitos secundários e a atividade biológica

Os teores totais de constituintes polifenólicos determinados em extratos e frações de *C. carthagenensis* foram submetidos à análise de correlação de Spearman com os valores de pCl₅₀ dos resultados de vasodilatação *in vitro* induzidos por essas preparações. Os resultados dessas análises estão representados na **Figura 18**. Os resultados da quantificação de taninos, flavonoides e proantocianidinas totais são descritos no item 5.2.

As relações entre as variáveis foram positivas para todos os metabólitos testados, indicando relação diretamente proporcional entre teor de cada grupo de substâncias e o efeito vasodilatador *in vitro*. Com base nos valores de coeficiente de correlação de Spearman pode-se considerar a seguinte ordem, iniciando-se pela melhor correlação: proantocianidinas e flavonoides (0,90) e taninos (0,60).

Foi empregado cálculo do coeficiente de correlação de Spearman por se tratar de método não paramétrico, ou seja, método que não pressupõe distribuição normal dos dados, sendo menos sensível a valores atípicos que o coeficiente de correlação de Pearson. Através de análise dos gráficos da **Figura 18** concluiu-se que não se pode assumir distribuição normal para os conjuntos de dados analisados por correlação. Se a distribuição dos dados fosse normal os valores se concentrariam na porção central dos gráficos e, portanto, teriam formato elíptico, o que não acontece (PAGANO; GAUVREAU, 2004).

Quanto ao teste de significância, o mesmo só pode ser realizado corretamente se ambas as variáveis tiverem distribuição normal, se a variação dos valores de x para cada valor fixo de y for sempre a mesma e, da mesma forma, se a variação dos valores de y for a mesma para todos os valores de x. Se essas pressuposições são satisfeitas, a nuvem de pontos do gráfico de dispersão para os pares de dados a serem correlacionados apresenta forma de elipse (PAGANO; GAUVREAU, 2004). Como isso não foi observado, o teste de significância não foi realizado, sendo apenas comparados os valores de coeficiente de correlação.

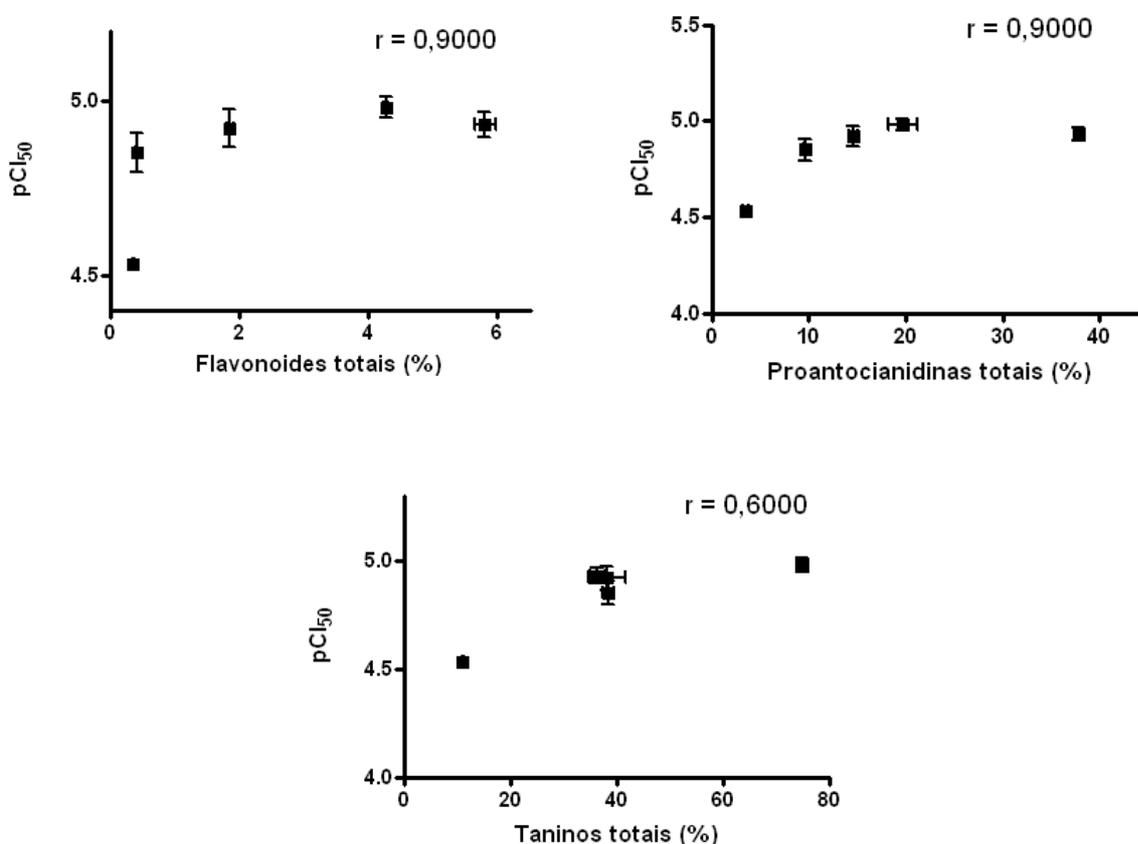


Figura 18: Correlação entre os teores de flavonoides totais determinados por UV/Vis e CLAE, taninos totais e proantocianidinas, e a atividade vasodilatadora *in vitro* para extratos e frações de *C. carthagenensis*, e respectivos valores de coeficiente de correlação de Spearman (r).

Os resultados das análises de correlação apontam para a importância dos flavonoides, taninos e proantocianidinas na atividade vasodilatadora de *C. carthagenensis*. Podemos levantar a hipótese de que o efeito vasodilatador observado *in vitro* possa ser, pelo menos em parte, atribuído a substâncias pertencentes a estes grupos de metabólitos secundários. No entanto, como os resultados foram obtidos a partir de estudos *in vitro*, não é possível afirmar que exista correspondência com estudos *in vivo*.

Observando-se os gráficos de correlação é possível levantar a hipótese de que existe um efeito máximo, ou seja, a partir de uma determinada concentração dos metabólitos secundários pesquisados, incrementos na contração parecem não ter a capacidade de aumentar o efeito biológico.

Correlação também foi o método estatístico empregado na avaliação da relação entre a atividade sequestradora de radicais livres e os teores de polifenóis em dose

espécies de plantas medicinais tradicionais (AQIL; AHMAD; MEHMOOD, 2006). Em outro estudo, foi empregada análise de regressão linear entre as concentrações de polifenóis e a atividade antioxidante de vegetais alimentícios, sendo obtido r igual a 0,6578 (KAUR; KAPOOR, 2002). Outros exemplos de correlação entre composição química quantitativa e resposta biológica estão disponíveis na literatura, como o trabalho de Wang e Lin (2000) que avaliaram a relação entre a capacidade captadora de radicais livres de oxigênio e o teor de compostos fenólicos e antocianinas por meio de análise de correlação e regressão linear. Ivanova e colaboradores (2005) realizaram estudo semelhante, mas sem o emprego de análise estatística na avaliação dos resultados. Outros autores não encontraram correlação entre as concentrações de fenóis e a atividade antioxidante de frutos, com valores de coeficientes de correlação de 0,32 a 0,38 (HEINONEN et al., 1998; KÄHKÖNEN et al., 1999). Na revisão de literatura realizada não foram encontrados estudos de correlação entre atividade vasodilatadora e teor de metabólitos secundários, ressaltando a importância do presente trabalho.

Outra forma de se estudar a influência de determinados grupos de metabólitos secundários sobre a atividade biológica é fracionar o extrato por técnicas cromatográficas e testar frações enriquecidas com determinado grupo de metabólitos. Tal estratégia foi descrita, como exemplo, por Oliveira e colaboradores (2004), que avaliaram *in vivo* a capacidade de diminuir a parasitemia por *Plasmodium falciparum* do extrato etanólico e frações purificadas de *Bidens pilosa*. Foram obtidas frações enriquecidas em flavonoides e em poliacetilenos, nas quais não foram detectados flavonoides. Estratégia semelhante foi descrita por Brixius e colaboradores (2006) para o extrato padronizado de *Crataegus* e suas frações contendo (1) flavonoides e proantocianidinas oligoméricas, (2) flavonoides e proantocianidinas oligoméricas de baixo peso molecular e (3) fração ausente em flavonoides e com proantocianidinas de alto peso molecular. Através da comparação entre o efeito do extrato e das frações, em vasos de mama humana e aorta de rato, concluiu-se que a atividade estaria relacionada com a presença de proantocianidinas e não de flavonoides.

A ação de fitoterápicos usualmente difere daquela de substâncias isoladas devido à participação dos diversos constituintes no efeito farmacológico final, frequentemente atuando em diferentes receptores e em sinergismo (CAPASSO et al., 2000), sendo também possível a existência de competição entre os componentes (HOUGHTON et al., 2007). No caso da espécie selecionada para estudo, além da potencial atividade anti-hipertensiva, a ação antioxidante pode contribuir para reduzir as complicações da hipertensão, incluindo disfunção endotelial, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (SCHULDT et al., 2004; PITTLER; GUO; ERNST, 2008), enquanto o efeito ansiolítico pode

colaborar para o controle da hipertensão de certos pacientes (LORENZO, 2000).

Outra abordagem para se realizar pesquisas na área de medicina tradicional é descrita por Verpoorte e colaboradores (2005; 2009). De acordo com tais pesquisadores e com outros autores não citados neste trabalho, médicos praticantes da medicina tradicional frequentemente aplicam abordagens holísticas e individualização no processo de prescrição de medicamentos. Portanto, o paradigma “um alvo, um composto” frequentemente empregado como base da pesquisa na área de plantas medicinais, que preconiza como ponto de partida dos estudos abordagens moleculares ou celulares, não seria a melhor opção para a pesquisa destes medicamentos, visto que efeitos sinérgicos e novos alvos moleculares podem estar envolvidos na ação farmacológica, além da possibilidade das substâncias ativas constituírem pró-fármacos (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2005). Além disso, outras substâncias podem ser responsáveis por melhorar a absorção de compostos ativos ou diminuir efeitos adversos (VERPOORTE et al., 2009).

Pelo exposto ferramentas de metabolômica, proteômica, genômica e transcriptoma combinadas com ensaios clínicos ou *in vivo* seriam mais adequadas para detectar compostos relacionados com a atividade biológica no caso de medicamentos da medicina tradicional, além de fornecer informações adicionais sobre os efeitos globais de tais medicamentos no organismo vivo. Esta abordagem é conhecida como biologia de sistemas. Tal abordagem exige a análise de grande número de amostras e aplicação de métodos quimiométricos apropriados como análise multivariada e análise de componente principal. Quanto às técnicas de análise química quali- e quantitativa utilizadas para este propósito, podemos citar cromatografia, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, este último com a vantagem de ser altamente reprodutível e da quantificação depender somente da concentração molar (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2005). A metabolômica pode contribuir, também, para o controle de qualidade de produtos de composição química complexa (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2005; VERPOORTE et al., 2009).

Segundo esta abordagem, propõe-se ciência baseada na observação sem uma hipótese inicial, a fim de gerar o maior número de informações para, a partir delas, serem levantadas as hipóteses a serem investigadas. Esta estratégia mimetizaria, com maior propriedade, a forma através da qual sistemas tradicionais de medicina, incluindo a Medicina Tradicional Chinesa e a Medicina Ayurvédica, provavelmente se desenvolveram, com a ajuda das técnicas citadas acima (VERPOORTE et al., 2009). Portanto, neste caso, parte-se de estudos clínicos para, após estabelecimento da eficácia, serem realizados estudos *in vivo* e *in vitro* para investigação dos mecanismos de ação.

5.5 Isolamento de metabólitos secundários

No presente trabalho, foi priorizado o isolamento de substâncias de maior polaridade, tendo em vista a maior atividade vasodilatadora previamente relatada para a fração *n*-butanólica (SCHULDIT et al., 2004), bem como a quase ausência de dados sobre a composição química de frações polares da espécie, pois apenas quercetina-3-sulfato (**13**) havia sido isolada anteriormente da fração *n*-butanólica (FARIAS et al., 1998).

Sílica gel não foi empregada como fase estacionária nas separações cromatográficas realizadas, em função da possível degradação de polifenóis (HOUGHTON et al., 2007), além da possibilidade de adsorção irreversível.

5.5.1 Isolamento de CC1

5.5.1.1 Fracionamento do precipitado

Inicialmente, como ponto de partida para o isolamento de flavonoides, usou-se o precipitado formado durante a partição do extrato bruto com água e diclorometano (item 4.1). Segundo análise por CLAE (item 4.2.4.2), este precipitado foi o material que apresentou o maior teor de um dos flavonoides (CC1) e de flavonoides totais (5.2.1.3), além da maior concentração de proantocianidinas. Visando isolar CC1, o precipitado foi submetido a fracionamento em coluna de Sephadex LH-20, seguido de purificação por CLAE em coluna de ODS (9,4 mm de diâmetro interno) (**Figura 19**).

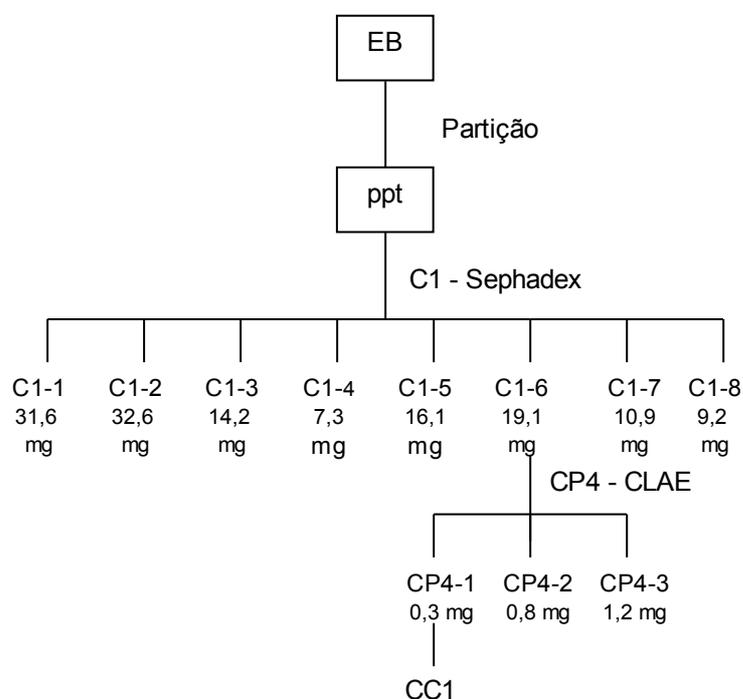


Figura 19: Processo de separação e isolamento de CC1 por Sephadex e CLAE do precipitado resultante da partição do extrato bruto, incluindo as massas obtidas.

A primeira fração, denominada zero (**Tabela 7**, p. 63) é constituída por substâncias com valores de Rf inferiores à rutina em CCD de sílica gel e que não revelam com NP/PEG nem cloreto de alumínio, mas desenvolvem coloração azulada com anisaldeído. É possível que essas substâncias sejam saponinas e taninos, que eluem primeiro na coluna de Sephadex LH-20 devido à alta massa molecular. Tal fração não consta no fluxograma apresentado na **Figura 19**. A seguir são eluídos os flavonoides (frações C1-1 a C1-7 no fluxograma **Figura 19** e **Tabela 7**, p. 63), que produzem manchas de coloração amarela com anisaldeído, e fluorescentes com cloreto de alumínio e NP/PEG, utilizando metanol como fase móvel da coluna de Sephadex. Por fim, ao se utilizar acetona / água como eluente, foram obtidas as substâncias totalmente retidas pela sílica durante as análises por CCD, resultando em manchas avermelhadas com anisaldeído e em manchas amarelas com cloreto de alumínio. Provavelmente estas últimas frações são constituídas por proantocianidinas.

Molan (2004) isolou proantocianidinas do chá verde utilizando coluna de Sephadex e eluição com metanol / água 50:50 seguido de acetona / água 70:30; já Nacz (2006) utilizou etanol a 95% para eluição de fenóis de baixo peso molecular do extrato de mirtilo em coluna de Sephadex, e acetona / água (1:1) para a eluição de taninos condensados. Por sua vez,

Kantz e Singleton (1990) eluíram fenóis não poliméricos do extrato de uvas com metanol a 60% em coluna de Sephadex e, em seguida, os fenóis poliméricos com acetona a 50%. Portanto, os exemplos aqui citados demonstram que Sephadex LH-20 pode ser empregado para separar fenóis poliméricos de fenóis não poliméricos, o que está de acordo com os resultados encontrados durante o fracionamento do precipitado neste suporte cromatográfico.

Taninos hidrolisáveis podem ser isolados empregando-se coluna de Sephadex LH-20 com eluição em gradiente de metanol / água 1:9 até 7:3 (BOUCHET, 2000). Portanto, é provável que entre as substâncias que eluíram juntamente com os flavonoides, nas frações C1-1 a C1-7, estão os taninos hidrolisáveis e proantocianidinas de baixa massa molecular.

Diversas publicações apontam para a grande utilidade do Sephadex como suporte para o isolamento de flavonoides utilizando-se metanol / água como eluente (BARRON et al., 1988; HOUGHTON; RAMAN, 1998).

Em suma, a coluna contendo Sephadex LH-20 foi um procedimento adequado para a separação de classes de metabólitos secundários a partir do precipitado no presente trabalho. No entanto, o rendimento de CC1 foi muito baixo: foram isolados 0,3 mg a partir de 234 mg do precipitado (rendimento de 0,13%). Provavelmente ocorreu hidrólise do grupo sulfato gerando quercetina, já que foi detectada, por cromatografia em camada delgada, quercetina em outras frações.

5.5.1.2 Fracionamento do extrato aquoso

Considerando que o isolamento de CC1 a partir do precipitado apresentou um rendimento baixo (item 5.5.1), utilizou-se, alternativamente, o extrato aquoso para sua obtenção, visto que análises cromatográficas por CLAE indicaram CC1 como pico majoritário desse extrato (item 5.1.2.2). Os procedimentos adotados estão representados no fluxograma da **Figura 20**.

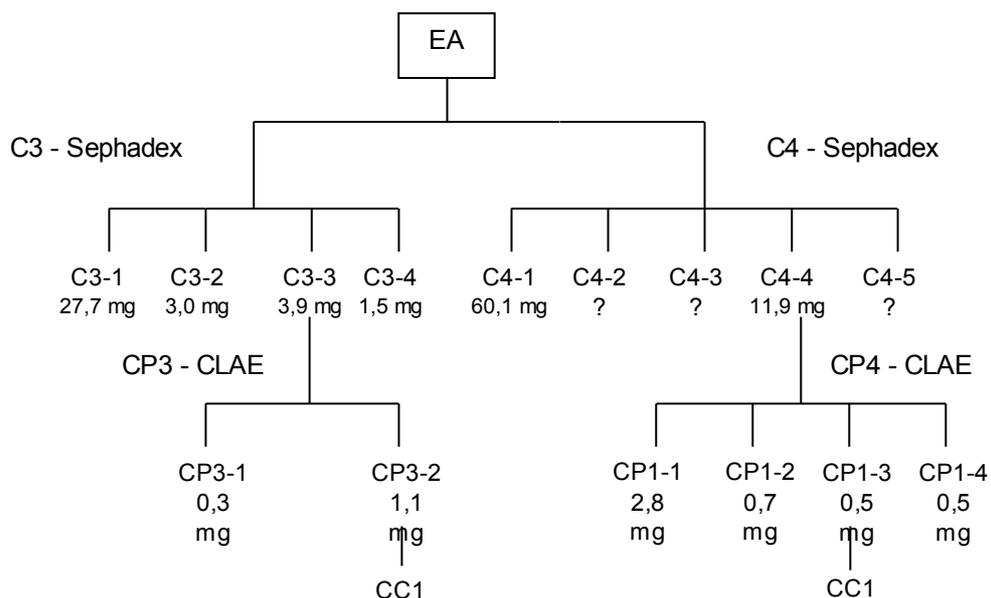


Figura 20: Fluxograma do processo de fracionamento do extrato aquoso (EA) em coluna de Sephadex LH-20 e CLAE de ODS. As massas obtidas das frações estão discriminadas na figura.

Nesta abordagem também se obteve baixo rendimento, já que a partir de 263 mg, aplicados em duas colunas, foram recuperados 3,9 e 11,9 mg de CC1, com grau de pureza insuficiente para a obtenção de espectros. A purificação adicional desse material por CLAE resultou no total de 1,6 mg de CC1, ou seja, um rendimento de 0,61%.

5.5.1.3 Fracionamento da fração *n*-butanólica do extrato aquoso

A fim de se obter um material de partida com maior concentração de flavonoides, para posterior separação em coluna de Sephadex, preparou-se outro extrato aquoso, o qual foi submetido à partição com *n*-butanol, após partição prévia com hexano e acetato de etila (item 4.1.3). Foram adotados diferentes procedimentos para o isolamento de CC1 a partir da fração butanólica, descritos a seguir.

Fracionamento em coluna de Sephadex LH-20

Como resultado das duas colunas de Sephadex realizadas (C6 e C7) eluídas com metanol, foram obtidos 6,1 mg de CC1, ainda impuro (3 % de rendimento) (**Figura 21**).

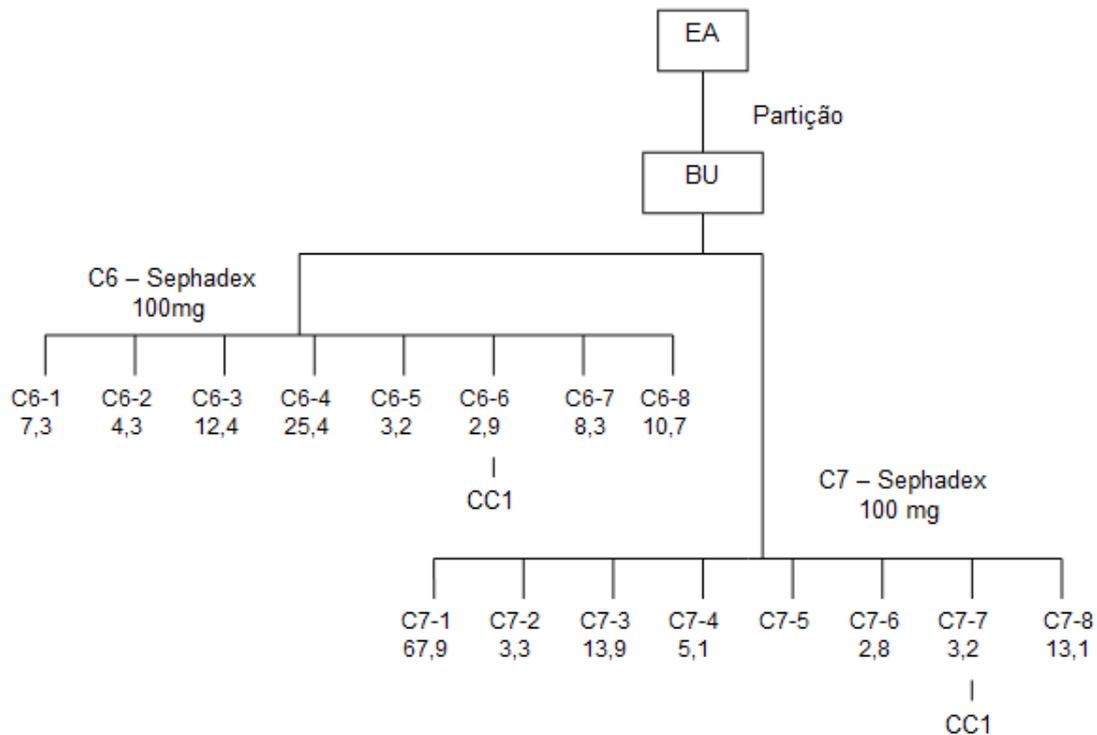


Figura 21: Fluxograma de parte do processo de fracionamento da fração *n*-butanólica do extrato aquoso por Sephadex (coluna 6 e coluna 7), incluindo as massas aplicadas nas colunas e massas obtidas.

Fracionamento por CLAE em coluna de ODS

A injeção da fração *n*-butanólica diretamente em coluna de ODS (9,4 mm de diâmetro interno) em sistema de CLAE (**Figura 22**) forneceu 1,5 mg de CC1, a partir de 16 mg da fração (7,5% de rendimento). Durante a preparação da amostra, observou-se formação de precipitado amarelo claro pálido, cuja análise por CCD e CLAE indicou ser majoritariamente constituído por CC1. A partir desse resultado optou-se por empregar a técnica de precipitação para o isolamento deste flavonoide.

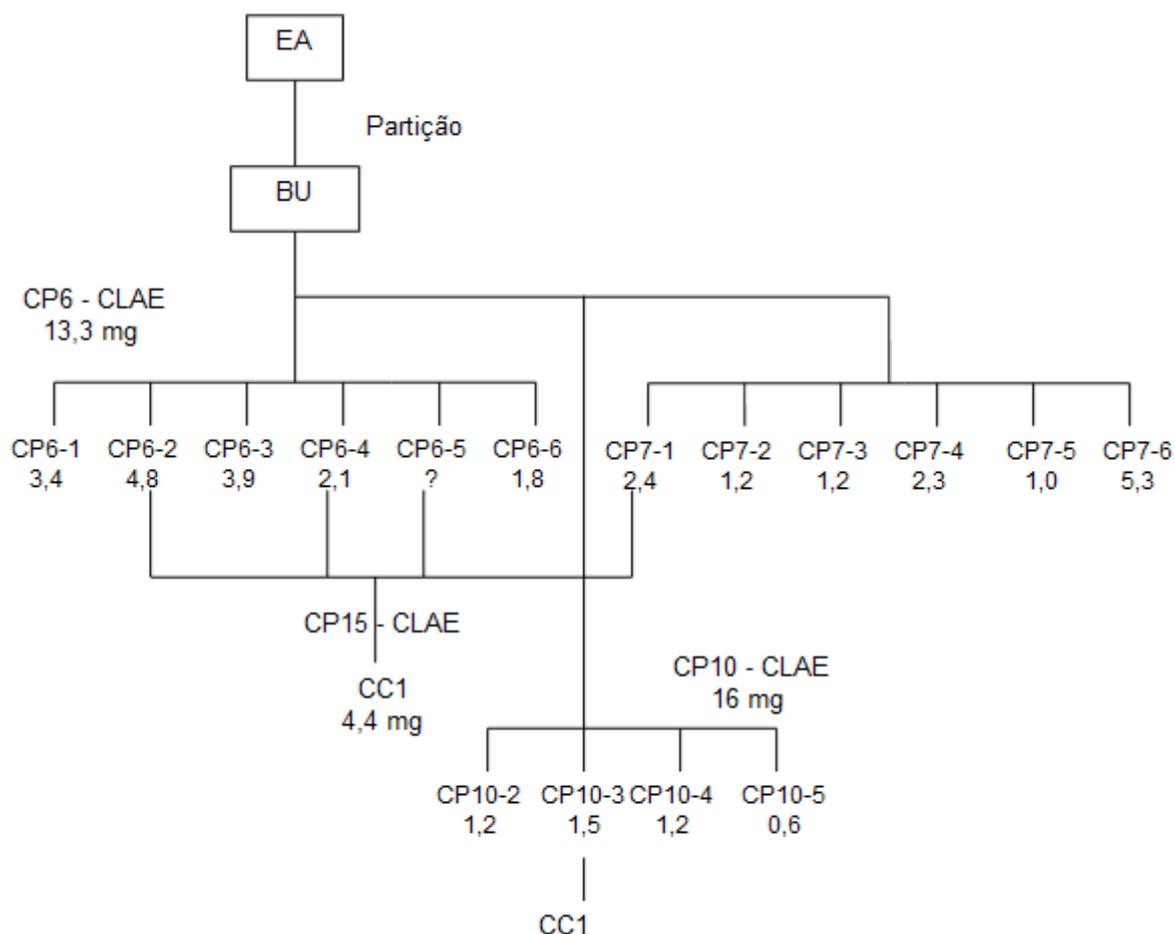


Figura 22: Fluxograma dos processos de fracionamento da fração *n*-butanólica do extrato aquoso por CLAE em coluna ODS, incluindo as massas aplicadas nas colunas e massas obtidas.

Os resultados obtidos com esses experimentos indicaram que o melhor material de partida para isolamento de CC1 era a fração *n*-butanólica obtida diretamente do extrato aquoso. Dessa forma, buscou-se isolar CC1 a partir da precipitação dessa fração.

Fracionamento por precipitação

Foram avaliadas diferentes proporções de soluções de metanol / água para a precipitação de CC1 a partir da fração *n*-butanólica. Análises por CCD e CLAE dos materiais obtidos indicaram que o precipitado formado em metanol / água 8:2 apresentou maior pureza que aqueles obtidos com as proporções de 1:9 e 3:7, apesar dos perfis terem sido bastante semelhantes (**Figura 23**). Apesar do resultado da análise por CLAE, a cromatografia em camada delgada empregando-se como revelador anisaldeído demonstrou que o precipitado apresenta contaminantes.

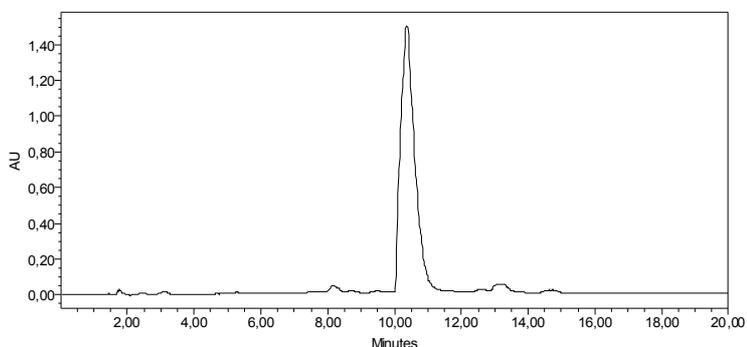


Figura 23: Cromatograma, obtido por CLAE com detecção em $\lambda = 210$ nm, para o precipitado formado a partir da adição de metanol / água 8:2 à fração *n*-butanólica. Condições cromatográficas: vide parte experimental, condição G (item 4.2.4.1).

Na sequência, o precipitado obtido foi submetido à purificação por CLAE em coluna ODS (9,4 mm de diâmetro interno), visando isolar o constituinte majoritário (CC1). Diversos sistemas de eluição foram avaliados e a eluição isocrática com metanol / água 3:7 foi a mais adequada. Sempre que a amostra foi preparada para injeção no cromatógrafo houve formação de precipitado, este foi novamente solubilizado no eluente, sendo realizada nova separação. A partir de 23,4 mg de precipitado foram isolados 13,3 mg de CC1 (rendimento de 57%).

O isolamento por precipitação resultou em maior rendimento em relação às tentativas anteriores, sendo considerado o mais adequado. Além disso, com apenas três etapas a partir do extrato bruto – partição, precipitação e separação por CLAE – foi possível isolar CC1. Outra vantagem foi a simplicidade e rapidez de cada etapa.

5.5.2 Isolamento de CC3

Sephadex e CLAE

O fracionamento da fração *n*-butanólica em coluna de Sephadex LH-20 resultou na obtenção de subfração de massa igual a 19,9 mg (C1910-5); repetição do procedimento forneceu massa adicional de 10,1 mg (C2304-10).

O precipitado formado após adição de metanol / água 3:7 às subfrações foi solubilizado em DMSO / metanol / água 2:1:1 e submetido a separação por CLAE. Foram obtidos 1,6 mg de CC3 (rendimento de 0,8%).

CLAE

O fracionamento da fração *n*-butanólica diretamente por CLAE resultou no isolamento de 0,8 mg de CC3 (subfração CP2104-5) a partir de 30 mg da fração. Portanto, neste caso o rendimento foi maior (2,67%).

5.5.3 Isolamento de CC4

Para o isolamento de CC4 foram testadas separações por CLAE da fração *n*-butanólica, mas os melhores resultados foram encontrados a partir da fração em acetato de etila, até então não utilizada em função do baixo rendimento (4.1.3). Análises por CCD e CLAE demonstraram a presença, na fração em acetato de etila, dos flavonoides majoritários do extrato bruto.

CC4 foi isolado por CLAE preparativo em coluna de ODS (21,1 mm de diâmetro interno). Inicialmente empregou-se apenas metanol e água, na proporção 3:7, como fase móvel, para em seguida adicionar-se ácido acético 0,1 %, o qual promoveu melhor definição dos picos favorecendo o isolamento. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que o meio ácido mantém protonados os grupos fenólicos dos flavonoides.

Para as injeções no sistema de CLAE, as amostras foram solubilizadas em DMSO. Este solvente resultou em completa solubilização da amostra sem interferir na obtenção de CC4, já que esta elui após 38 min de eluição, enquanto o DMSO é eliminado nos primeiros 15 min da corrida cromatográfica isocrática.

Foram obtidos 9,9 mg e 16,9 mg a partir de 102 e 151,6 mg, respectivamente.

Concluindo, os procedimentos descritos permitiram isolar o flavonoide CC4 com aproximadamente 10% de rendimento a partir da fração em acetato de etila, utilizando-se apenas uma etapa de purificação. Trata-se, portanto, de método rápido e simples de isolamento.

5.6 Elucidação estrutural

5.6.1 Elucidação estrutural de CC1

A substância CC1 foi caracterizada previamente ao isolamento como sendo um flavonoide pelo desenvolvimento de fluorescência quando cloreto de alumínio é empregado como revelador em cromatografia em camada delgada, e pelo espectro de absorção no

ultravioleta com duas bandas características de flavonoides obtido durante análise dos extratos e frações por CLAE (itens 5.1.1 e 5.1.2.2)

Análise de CC1 por CCD de sílica gel (item 4.2.3), indicou valor de Rf igual a 0,46, pouco maior que aquele observado para a rutina (0,37), sugerindo tratar-se de flavonoide ligado a grupo polar. Além disso, sua decomposição durante o processo de isolamento levou a formação de flavonoide com Rf igual ao da quercetina. A fim de elucidar a estrutura química de CC1 procedeu-se sua análise por espectrofotometria no ultravioleta (UV) com uso de reativos, infravermelho (IV) e por RMN de ^1H e de ^{13}C .

A análise dos espectros no UV-Vis obtidos com o uso de reagentes de deslocamento permitiu chegar às conclusões resumidas na **Tabela 31** e detalhadas no texto a seguir.

Tabela 31: Resultados da análise do espectro de absorção no UV para CC1.

Reagentes e solventes	λ_{max} (valores em nm)		Conclusão
	Banda II	Banda I	
MeOH	256	352	Flavonol ou flavonol substituído em C-3
MeOH + NaOMe	272	404	Hidroxilas livres em ambos os anéis, ausência de hidroxila livre em C-3, hidroxilas livres em C-4'
MeOH + NaOAc	273	407	Hidroxilas livres em C-4' e C-7
MeOH + NaOAc + H_3BO_3	263	380	Grupo <i>orto</i> -diidroxí no anel B
MeOH + AlCl_3	275	425	Hidroxilas e/ou carbonilas que complexam com Al^{+3} em ambos os anéis
MeOH + AlCl_3 + HCl	275	384	Hidroxila na posição 5 e grupo <i>orto</i> -diidroxí no anel B

O espectro de absorção no ultravioleta registrado para CC1, em metanol, apresentou λ_{max} em 256 (banda II) e ombro em 352 nm (banda I), compatível com flavonol (352 e 285 nm) ou flavonol substituído em C-3 (328 e 357 nm), provavelmente com grupo sulfato que fornece máximo de absorção em comprimento de onda em torno de 250 nm, ou grupo metila, com máximo de absorção em 258 nm (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970; BARRON et al., 1988). A comparação do espectro de CC1 com aquele da quercetina (máximo para a banda I em $\lambda = 370$ nm) indica deslocamento hipsocrômico da banda I devido à substituição em C-3.

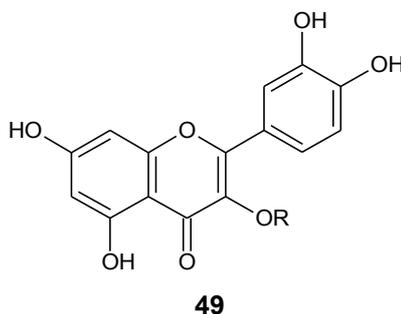
Após adição de acetato de sódio também se observou deslocamento batocrômico em ambas as bandas ($\lambda = 272$ e 404 nm), demonstrando a presença de hidroxilas nos anéis A e B. O espectro de flavonas e flavonóis em presença de metóxido de sódio fornece

informações sobre o padrão de hidroxilação, pois, como se trata de base forte, tal reagente tem a capacidade de ionizar todos os grupos hidroxila presentes, resultando em efeito batocrômico pela presença par de elétron adicional em ressonância após a adição da base. Um deslocamento batocrômico da banda I de cerca de 40 a 65 nm sem diminuição da sua intensidade, como o observado para a substância em questão, indica hidroxila livre no carbono 4'. O fato deste espectro permanecer estável por 5 min indica ausência de hidroxila livre em C-3 (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Quanto à banda I, conforme discutido acima, provavelmente não há presença de hidroxila livre em C-3; portanto, o deslocamento observado foi atribuído à presença de hidroxila livre em C-4'.

A adição de ácido bórico em presença de acetato de sódio produziu deslocamento batocrômico na banda I ($\lambda = 380$ nm) em relação ao espectro obtido em metanol ($\lambda = 352$ nm), indicando formação de complexo com grupos *orto*-diidroxí. Deslocamento batocrômico de 12 a 30 nm na banda I indica presença de grupo *orto*-diidroxí no anel B (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970; BARRON et al., 1988).

Adição de cloreto de alumínio resultou em deslocamento batocrômico tanto na banda I quanto na banda II, indicando a formação de complexo estável com hidroxilas em C-3 ou C-5, ou formação de complexo lábil com sistemas *orto*-diidroxí em ambos os anéis. Adição de ácido clorídrico à solução contendo cloreto de alumínio não produziu alterações na banda II, demonstrando a presença de grupos hidroxila em C-3 ou C-5, que formam complexos ácidos estáveis com cloreto de alumínio e carbonila, e deslocamento hipsocrômico da banda I ($\lambda = 384$ nm), confirmando presença de grupo *orto*-diidroxí não estável no anel B. Em relação ao espectro em metanol, ainda há deslocamento, o que indica existência hidroxila nas posições 3 e/ou 5. Conforme discutido acima, provavelmente não há hidroxila livre em C-3 e, portanto, o deslocamento observado foi atribuído à presença de hidroxila livre em C-5 (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970; BARRON et al., 1988). A existência de sistema *orto*-diidroxí no anel B de flavonol é reforçada pela presença no espectro de ombro ou de dois picos de absorção entre 250 e 275, os quais são observados em flavonoides oxigenados nos carbonos 3' e 4' ou 3', 4' e 5' (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970; BARRON et al., 1988). No caso de CC1 observa-se ombro.

Concluindo, a análise dos espectros de absorção no ultravioleta, empregando-se reagentes de deslocamento, indica ser a quercetina a aglicona de CC1 (**49**), com O-substituinte na posição 3.



O espectro de absorção no infravermelho de CC1 indicou a presença de grupo sulfato, apresentando bandas intensas em 1200 cm^{-1} e 1040 cm^{-1} . Tais bandas foram atribuídas a estiramento S=O, e ao estiramento C-O-S (BARRON et al., 1988).

A posição do grupo sulfato pode ser deduzida a partir do espectro de absorção no ultravioleta, pela adição de reativos de deslocamento. Em geral, flavonoides sulfatados exibem as mesmas características espectrais dos flavonoides metilados correspondentes; porém, sulfatação nas posições 3 ou 4' induz deslocamento hipsocrômico mais acentuado na banda I, devido ao efeito retirador de elétrons do grupo sulfato (BARRON; COLEBROOK; IBRAHIM, 1986). Este efeito foi observado no espectro de CC1, já que absorção máxima da banda I situa-se em $\lambda = 350\text{ nm}$, comprimento de onda inferior ao da 3-O-metil-quercetina, que ocorre em $\lambda = 358\text{ nm}$ e ao da quercetina em 370 nm (BARRON et al., 1988).

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) obtido para CC1 (**Figura 24**) também foi similar ao relatado para a quercetina (AGRAWAL, 1989), exceto pelos valores de deslocamento químico atribuídos a C2, C3 e C4 (**Tabela 32**). Os dados obtidos no subespectro DEPT-135 (**Figura 25**) indicam a presença de 5 carbonos metínicos e ausência de carbonos metilênicos na molécula.

Os valores de deslocamento químico observados para C3 e carbonos vizinhos são compatíveis com a presença de grupamento sulfato nesta posição da aglicona. A introdução de grupo O-sulfato, retirador de elétrons, resulta em diminuição na densidade eletrônica dos carbonos *orto* e *para* posicionados a ele, e aumento na densidade eletrônica no carbono ligado ao grupo sulfato, resultando em deslocamento para valores mais afastados do TMS no primeiro caso, e em proteção do carbono que contém o grupo sulfato. Em flavonoides sulfatados na posição 3, o deslocamento do sinal referente ao carbono 2 é especialmente pronunciado (BARRON et al., 1988). Além disso, o espectro obtido para CC1 é semelhante àquele relatado por Barron, Colebrook e Ibrahim (1986) para quercetina-3-sulfato (**Tabela 32**).

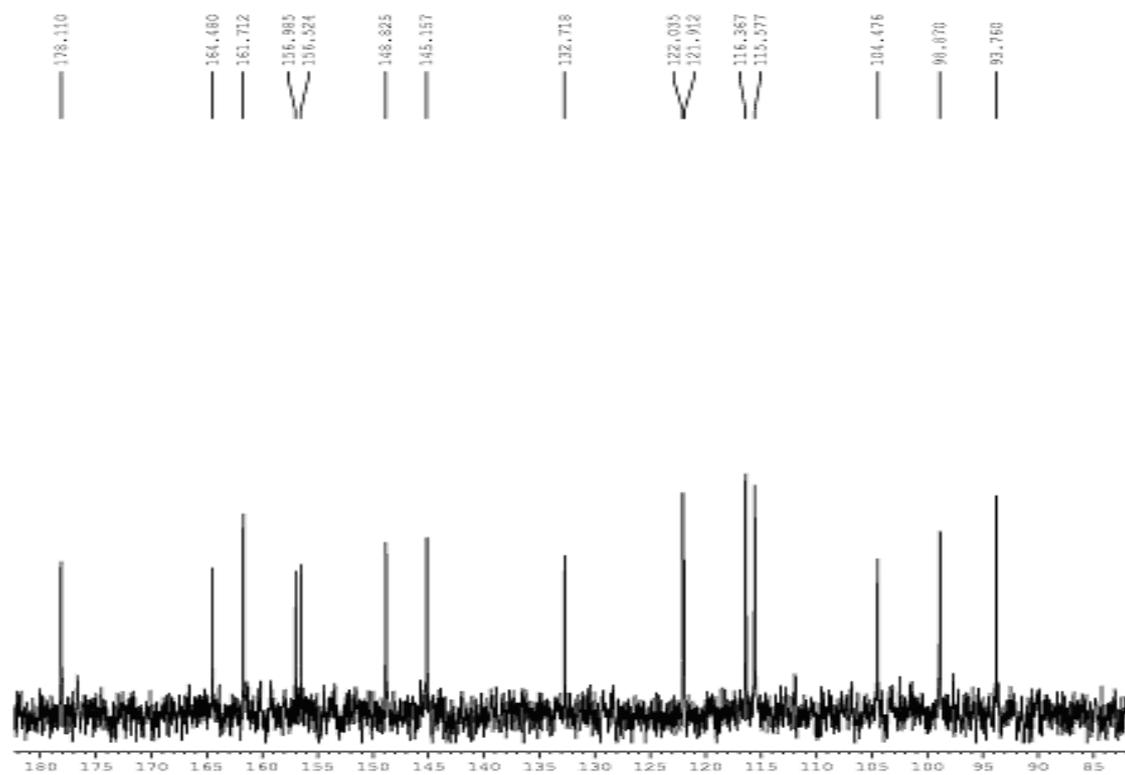


Figura 24: Espectro RMN de ^{13}C obtido para CC1 (100 MHz, DMSO- d_6).

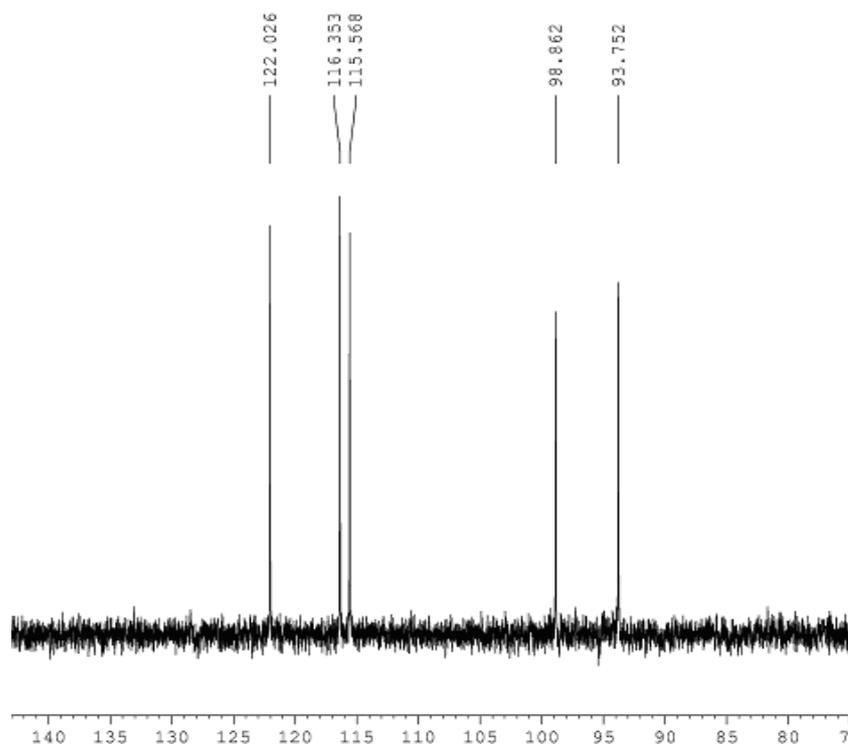


Figura 25: Subspectro DEPT-135 obtido para CC1 (100 MHz, DMSO-*d*6).

Tabela 32: Dados do espectro de RMN de ^{13}C obtido para CC1 e valores da literatura para quercetina e quercetina-3-sulfato.

C	CC1 ^a	Quercetina ^b	Quercetina-3-sulfato ^c
2	156,52	147,5	156,6
3	132,71	136,5	132,3
4	178,1	176,5	177,7
5	161,71	161,0	161,3
6	98,87	99,5	98,4
7	164,47	166,0	163,9
8	93,76	94,5	93,3
9	156,98	156,7	156,1
10	104,47	104,0	104,1
1'	122,03	123,0	121,6
2'	115,57	116,0	115,1
3'	145,15	145,7	144,7
4'	148,82	148,1	148,3
5'	116,36	116,5	115,9
6'	121,03	121,0	121,6

a. Dados obtidos no presente trabalho, 100 MHz, DMSO-*d*6.

b. Dados relatados por Agrawal (1989), DMSO-*d*6.

c. Dados relatados por Barron, Colebrook e Ibrahim (1986), 100 MHz, DMSO-*d*6.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 26) obtido para CC1 indicou a presença de cinco

sinais com valores de deslocamento químico característicos de hidrogênios aromáticos (δ 6,0 a 9,5 ppm), além de sinal largo em δ 12,8 ppm atribuído a grupos hidroxila. Dois dupletos com deslocamento químico de 7,62 e 6,81 ppm, e constante de acoplamento escalar de 7,6 Hz foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos *orto* posicionados H-6' e H-5' do anel B respectivamente (AGRAWAL, 1989), em função do valor da constante de acoplamento.

Os demais sinais, também localizados na região de hidrogênios aromáticos, são simpletos com deslocamentos químicos em δ 7,57; 6,38 e 6,17 ppm e foram atribuídos aos hidrogênios H-2', H-8 e H-6, respectivamente (**Tabela 33**). O sinal em 7,57 foi atribuído ao H-2' também por este ter ambiente eletrônico semelhante ao H-6' (7,62 ppm) sendo aquele mais protegido (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

Os valores de deslocamento químico atribuídos para CC1 são similares àqueles relatados por Barron, Colebrook e Ibrahim (1986) para a quercetina-3-sulfato, obtida em uma mistura com patuletina-3-sulfato (**Tabela 33**).

O sinal em δ 2,5 ppm é referente aos hidrogênios residuais do DMSO e aquele em δ 12,6 ppm foi atribuído aos hidrogênios das hidroxilas, enquanto o sinal em cerca de δ 3,5 ppm corresponde aos hidrogênios da água contida na amostra ou absorvida do ar pelo DMSO.

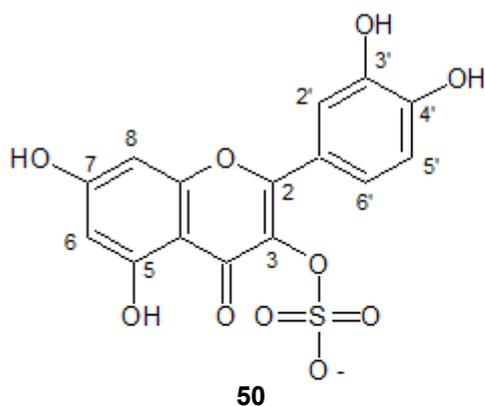
Tabela 33: Dados do espectro de RMN de ^1H obtido para CC1 e valores relatados na literatura para quercetina 3-sulfato.

H	CC1 (δ , ppm) ^a	Quercetina-3-sulfato (δ , ppm) ^b
6	6,17; s	6,16 ; d; $J = 2$ Hz
8	6,39; s	6,37; d; $J = 2$ Hz
2'	7,57; s	7,56; s
5'	6,81; d; $J = 7,6$ Hz	6,81; d; $J = 8,4$ Hz
6'	7,62, d; $J = 7,6$ Hz	7,62 ; dd; $J = 2$ e 8,4 Hz

^a Dados obtidos no presente trabalho; DMSO-*d*6, 400 MHz.

^b Dados relatados por Barron, Colebrook e Ibrahim (1986); DMSO-*d*6; 80,13 MHz.

A interpretação dos espectros obtidos e a comparação com dados da literatura possibilitaram identificar CC1 como sendo quercetina-3-sulfato (**50**). A ocorrência desse flavonoide na espécie já havia sido anteriormente descrita (FARIAS et al., 1998); porém, no presente trabalho foi realizada a identificação inequívoca dessa substância a partir dos dados espectrais disponíveis.



Considerando que (1) a quercetina-3-sulfato resultou no pico de maior área na análise por CLAE do extrato aquoso, preparação empregada popularmente; (2) que sua hidrólise resulta em quercetina, flavonoide cuja atividade vasodilatadora já foi relatada; (3) que no presente trabalho são descritos métodos de CLAE e UV para análise quantitativa de flavonoides de *C. carthagenensis*; (4) que os flavonoides apresentaram melhor correlação com a atividade vasodilatadora *in vitro*, dentre os metabólitos secundários quantificados; propõe-se o emprego de flavonoides totais como marcadores químicos para o controle de qualidade da espécie.

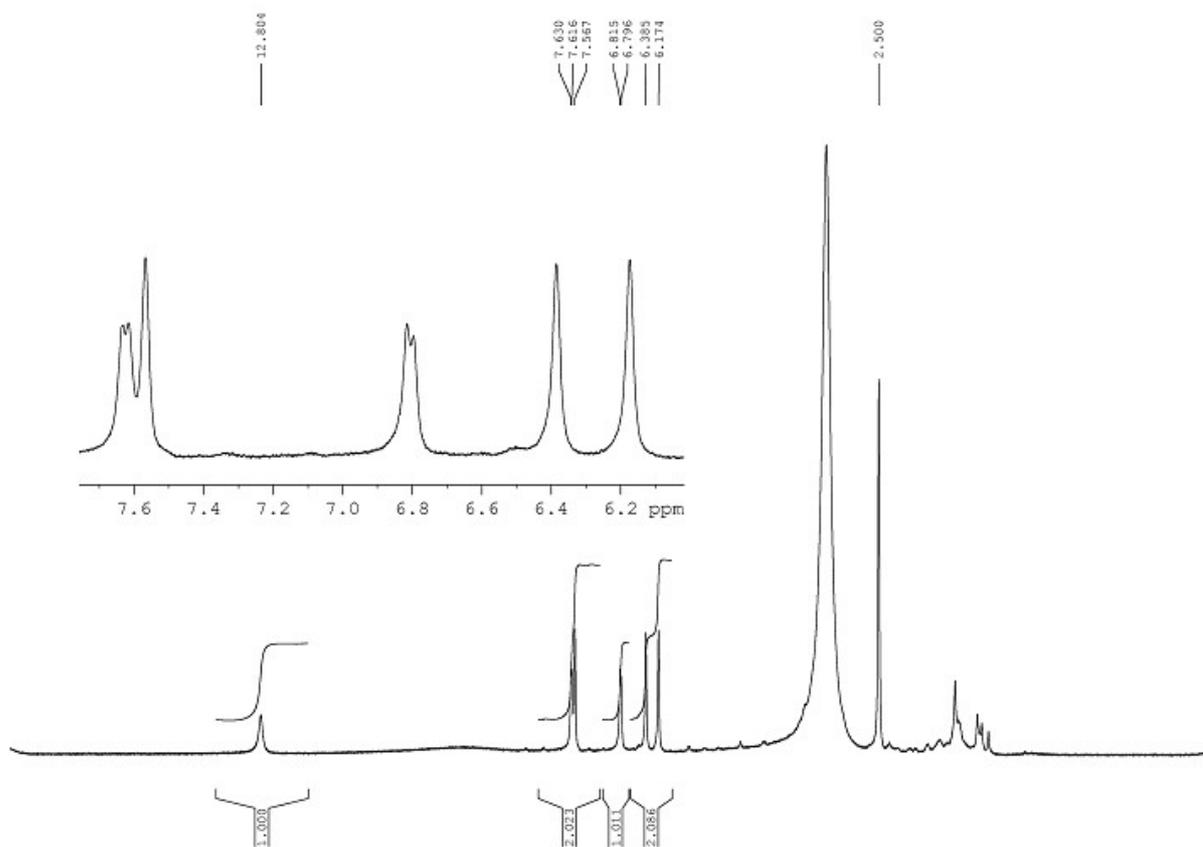


Figura 26: Espectro de RMN de ^1H obtido para CC1 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

5.6.2 Quercetina-3-sulfato e importância taxonômica

A ocorrência de quercetina-3-sulfato nunca foi anteriormente relatada para outra espécie de *Cuphea*. De outras espécies do gênero foram isolados glicosídeos de flavonóis, flavonas e flavanonas, assim como conjugados com o ácido glicurônico (SANTOS; SALATINO; SALATINO, 1995; CALZADA, 2005). Também não foram encontrados relatos na literatura sobre a presença de flavonoides sulfatados na família Lythraceae.

A presença ou ausência de flavonoides sulfatados não tem significado taxonômico na distinção entre famílias, já que ocorrem em famílias não relacionadas. No entanto, flavonoides tem sido empregados para distinguir gêneros, espécies e categorias infraespecíficas (BARRON et al., 1988; SALATINO et al., 2000), como descrito para Cyperaceae, Arecaceae, Zosteraceae (BARRON et al., 1988) e Apiaceae (HARBORNE; KING, 1976). A ocorrência de quercetina-3-sulfato em *C. carthagenensis* poderá auxiliar a identificação da espécie, já que algumas espécies de *Cuphea* são morfologicamente semelhantes (GRAHAM et al., 2006). Uma abordagem semelhante foi descrita para espécies de *Ammi* (Apiaceae) (HARBORNE; KING, 1976).

Supostamente o gênero *Cuphea* é o mais avançado⁸ da família Lythraceae tendo em vista suas características morfológicas (GRAHAM et al., 1993), presença de C-glicosídeos e metoxilação (SANTOS; SALATINO; SALATINO, 2000) e ocorrência de quercetina e canferol (HARBORNE, 1977). Parece existir relação entre O-metilação e conjugação com sulfato (BARRON et al., 1988), visto que estes derivados são encontrados em famílias com espécies herbáceas e/ou morfologicamente avançadas (BARRON et al., 1988) e, portanto, sua presença pode indicar que se trata de angiosperma quimicamente avançada (HARBORNE, 1977). Desta forma a presença de flavonoide sulfatado em *C. carthagenensis* fornece mais uma indicação sobre a posição evolutiva do gênero na família Lythraceae.

Para a proposição de relações evolutivas são empregados também dados genéticos e morfológicos, entre outros. Portanto, em uma discussão sobre tais relações para o gênero *Cuphea* e família Lythraceae faz-se necessário considerar publicações nestas áreas.

Dados mais recentes de análise cladística⁹ morfológica de espécies de Lythraceae

⁸ Os autores usam o termo avançado, mas atualmente o termo considerado mais adequado é “derivado”, para não remeter à ideia de que o mais avançado seja o melhor.

⁹ Cladística é o ramo da biologia que busca entender as relações evolutivas entre os organismos. São identificados clados, ou grupos monofiléticos, que possuam características derivadas exclusivas que reflitam origem evolutiva (um ancestral) comum (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007; AMORIN, 2009).

mostram grande politomia¹⁰ e ausência de sinapomorfia morfológica¹¹. Análise molecular de quatro sequências de genes resultou na formação de seis clados, os quais não estão de acordo com a taxonomia atual de Lythraceae baseada em morfologia (GRAHAM et al., 2005). Desta forma considera-se a hipótese de que a classificação atual deva ser revista. Tais divergências entre o sistema atual de classificação (sistema de Lineu), base para o *Code of Botanical Nomenclature*, e a taxonomia filogenética (conhecida como *Phylocode*) tem sido comum, indicando possibilidade de alteração no sistema de classificação (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Quanto ao gênero *Cuphea*, filograma com dados combinados das quatro sequências de genes indica que *Cuphea* possui características derivadas (GRAHAM et al., 2005) e, de acordo com a análise de sequências de nucleotídeos altamente variáveis de 53 espécies, é um gênero monofilético (GRAHAM et al., 2006). Ou seja, as espécies de *Cuphea* parecem realmente ter um ancestral comum.

Conforme descrito acima, a composição química de metabólitos secundários, como flavonoides, tem sido empregada no estudo das relações evolutivas entre espécies vegetais. Essa abordagem, no entanto, tem como desvantagem, em relação à comparação entre sequências de nucleotídeos e proteínas, de se tratar de procedimento não automatizado, o que torna muito lento o processo de determinação da composição de metabólitos secundários. O desenvolvimento de técnicas hífenadas, especialmente CLAE-RMN e CLAE-EM, tem contribuído para agilizar a identificação de metabólitos secundários, mas ainda assim trata-se de processo mais lento e que gera menor número de informações.

5.6.3 Elucidação estrutural de CC3

A substância isolada CC3 apresentou valor de Rf aproximadamente igual ao de CC1 em CCD de sílica gel (item 4.2.3), indicando tratar-se de flavonoide com substituinte polar. No entanto, após revelação com cloreto de alumínio e detecção no UV em $\lambda = 360$ nm, observou-se uma mancha com fluorescência verde e não amarela, como detectado para a quercetina-3-sulfato. Fluorescência amarela é usualmente desenvolvida por 5-hidroxi-flavonas (KRISHNASWAMY, 1996). Como CC3 não desenvolveu coloração amarela

¹⁰ Grande politomia é a presença de muitas ramificações na árvore filogenética sem a identificação de ancestralidade comum. Essa politomia representa ausência de conhecimento sobre as relações de parentesco entre os táxons terminais (AMORIN, 2009), neste caso as espécies.

¹¹ Ausência de sinapomorfia morfológica, significa ausência de característica morfológica comum, mais especificamente ausência de característica homóloga compartilhada pelos táxons terminais e ancestral comum.

talvez se trate de flavonoide sem hidroxila em C-5 ou com a mesma substituída.

O espectro no IV obtido para CC3 não indicou a presença de bandas de absorção características de grupo sulfato (BARRON et al., 1988), como no caso de CC1. Portanto, provavelmente CC3 é um flavonoide glicosilado.

A análise dos espectros no UV-Vis com o uso de reagentes de deslocamento permitiu chegar às conclusões resumidas na **Tabela 34**. Aspectos que diferiram CC3 de CC1 estão detalhados no texto a seguir.

Tabela 34: Resultados da análise do espectro de absorção no UV para CC3.

Reagentes e solventes	λ_{\max} (valores em nm)			Conclusão
	Banda II	Banda I	Banda III	
MeOH	255	367	Ausente	Possível flavonol com OH em C-3 livre
MeOH + NaOMe	270	422	320	Hidroxilas livres em ambos os anéis
MeOH + NaOAc	270	383	320	Hidroxilas em C-4' e/ou C-3 e C-7
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	263	380	Ausente	Grupo <i>orto</i> -diidroxí no anel B
MeOH + AlCl ₃	268	436	Ausente	Formação de complexo com Al ⁺³ no anel B
MeOH + AlCl ₃ + HCl	263	426	Ausente	Formação de complexo estável com OH em C-3

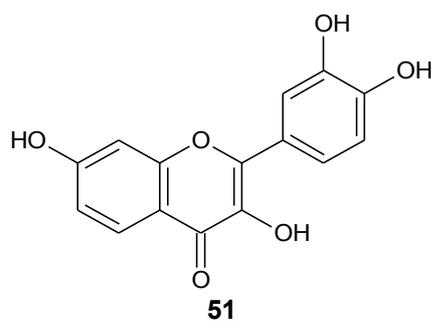
O espectro de absorção no ultravioleta registrado em metanol para CC3 apresentou λ_{\max} em 255 (banda II) e em 367 nm (banda I). A adição de metóxido de sódio promoveu deslocamento batocrômico em ambas as bandas, indicando presença de hidroxilas nos anéis A e B. Um deslocamento da banda I de cerca de 40 a 65 nm sem diminuição da sua intensidade, como observado para CC3 (55 nm), indica hidroxila livre em C-4'. A alteração no espectro observada 5 min após a adição de NaOAc, com diminuição na intensidade da banda II e intensificação da banda III indica que houve degradação no anel A (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

O deslocamento da banda I de $\lambda = 367$ para 436 nm com a adição de cloreto de alumínio indica formação de complexo com hidroxila em C-3 e/ou sistemas *orto*-diidroxí no anel B. Após adição de ácido clorídrico observou-se absorção máxima em $\lambda = 426$ nm, indicando, portanto, manutenção de complexo com cátion alumínio. Como ainda se observa deslocamento na banda II em relação ao espectro em metanol, provavelmente há um grupo hidroxila em C-3 (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970; BARRON et al., 1988).

Flavonóis com hidroxila livre em C-3 apresentam máximos de absorção em $\lambda = 250 - 280$ nm e $350 - 385$ nm (AGRAWAL, 1989), faixa de valores observada para CC3.

Reunindo as informações obtidas a partir da análise dos espectros de UV, com o uso

de aditivos, chega-se a conclusão que se trata de um flavonoide com hidroxilas nos carbonos 7, 3', 4' e 3, sendo o carbono 5 não substituído ou mais provavelmente glicosilado, em vista da polaridade de CC3 (**51**).



O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) obtido para CC3 (Figuras 27), é composto por 21 sinais, valor compatível com um flavonoide monoglicosilado. As atribuições dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C de CC3 encontram-se na **Tabela 38**.

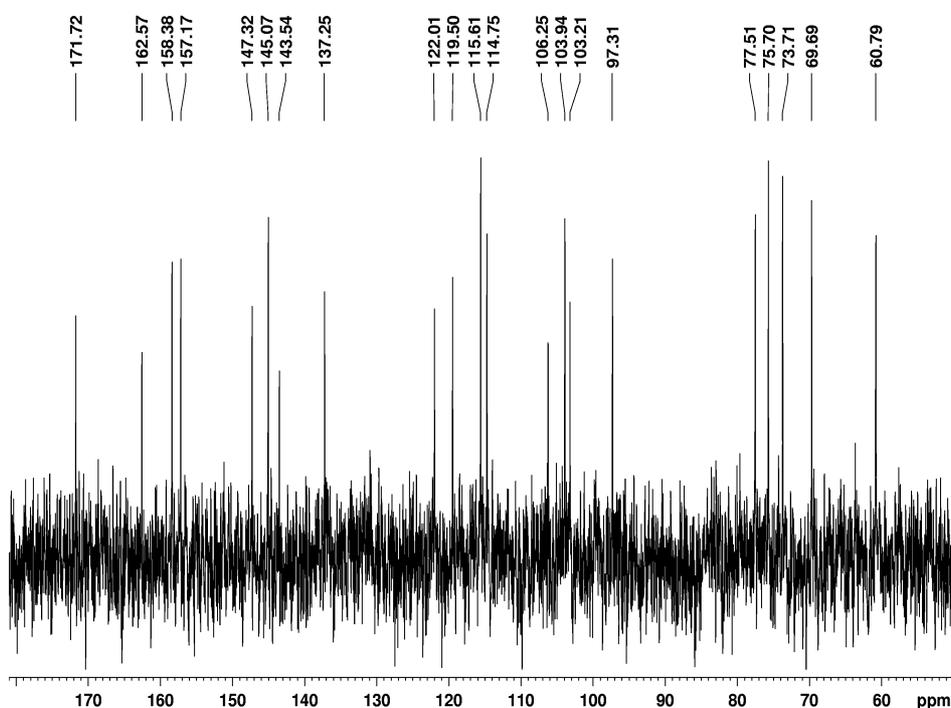


Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para CC3 (DMSO- d_6 , 100 MHz).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 29 e Tabela 37) obtido para CC3 indicou cinco sinais com valores de deslocamento químico característicos de hidrogênios aromáticos entre δ 6,65 e 7,66 ppm, um duplete em δ 4,79 ppm atribuído ao hidrogênio anomérico (H-1''), além de sinais atribuídos a outros hidrogênios do açúcar ligados a carbonos oxigenados (δ 3,17 a 3,77 ppm) parcialmente superpostos pelo sinal da água residual na amostra. Os sinais em δ 7,52 ppm (dd, $J = 8,5$ e 2,0 Hz) e 6,87 ppm (d, $J = 8,5$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos *orto* posicionados H-5' e H-6' do anel B, respectivamente, confirmando os dados do espectro no ultravioleta que indicou a presença de sistema *orto*-diidroxí neste anel.

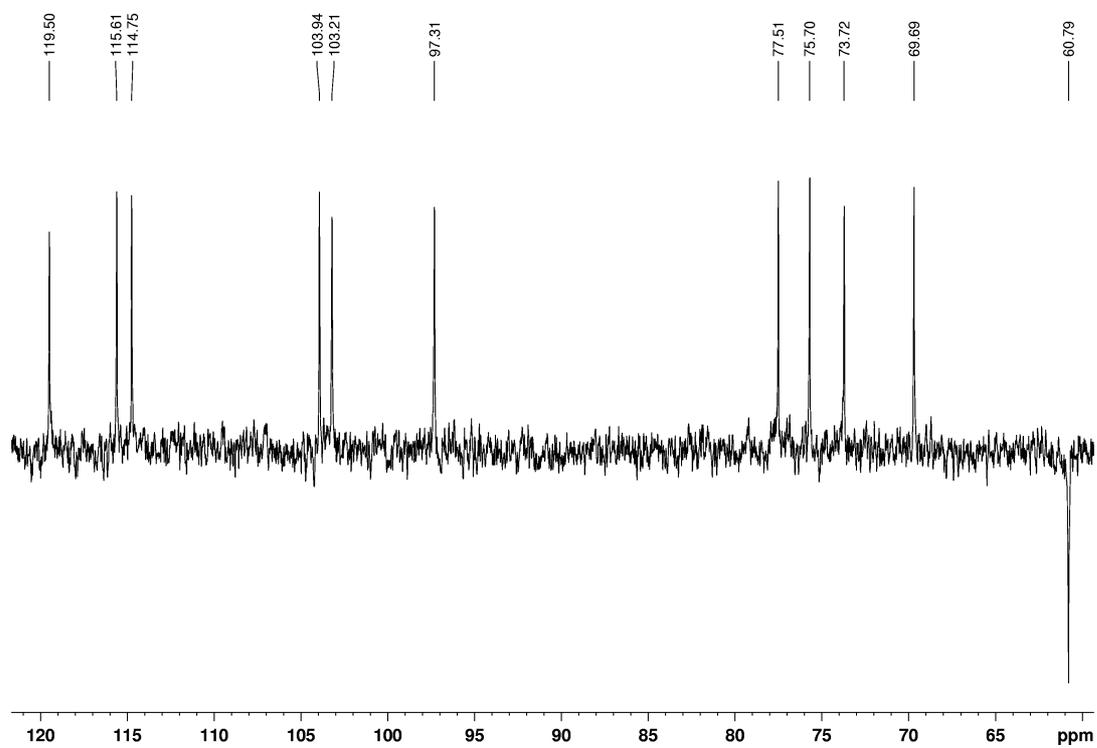


Figura 28: Subespectro DEPT-135 obtido para CC3 (DMSO-*d*6, 100 MHz).

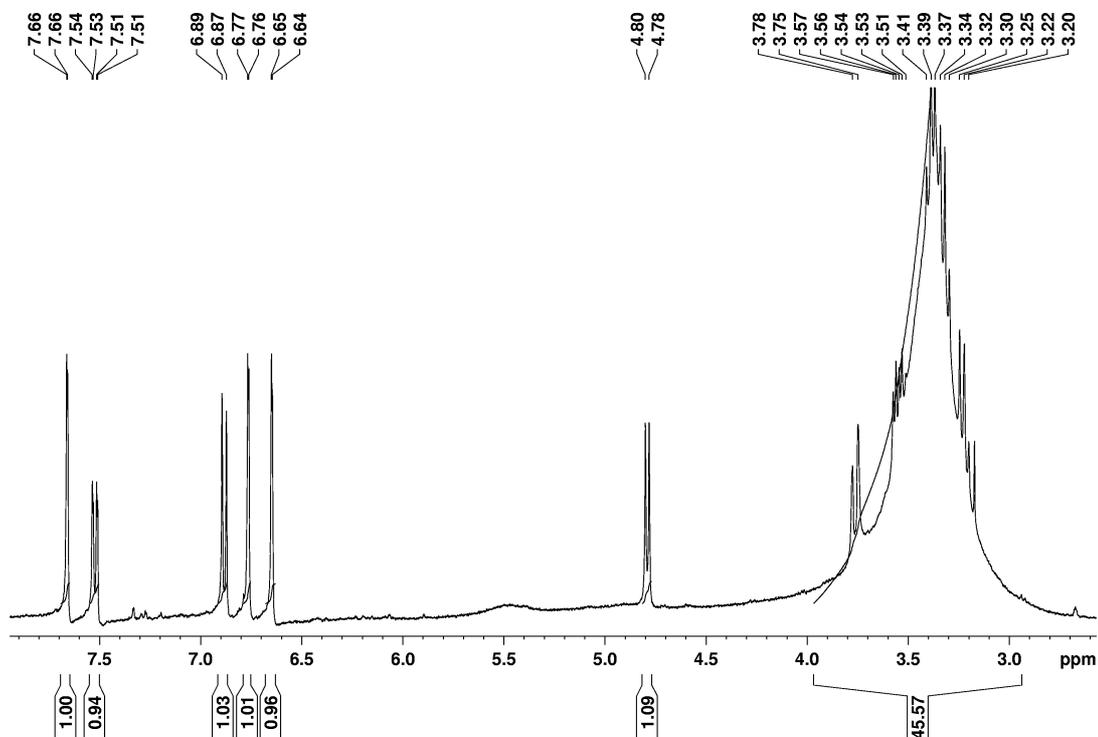


Figura 29: Espectro de RMN de ^1H obtido para CC3 (DMSO- d_6 , 400 MHz).

Os demais sinais de hidrogênios aromáticos presentes no espectro de CC3 apresentam-se como dupletos, com deslocamentos químicos de δ 7,66; 6,77 e 6,65 ppm e foram atribuídos a H-2', H-8 e H-6, respectivamente (**Tabela 37**). Os hidrogênios H-8 e H-6 apresentam constante de acoplamento escalar de 2 Hz, confirmando que estão meta posicionados, assim como H-2' e H-6' cuja constante de acoplamento é igual a 2,1 Hz. A análise desses dados espectrais confirmou o padrão de substituição em C-5 e C-7 no anel A, e de sistema catecólico no anel B, já indicados pelos dados de UV, sugerindo ser a quercetina a aglicona de CC3.

As atribuições dos sinais dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram confirmadas pelos experimentos bidimensionais HSQC (**Figura 30**) e HMBC. As correlações observadas estão dispostas nas Tabelas 35 e 36.

Tabela 35: Manchas de correlação observadas no mapa de contornos HSQC obtido para CC3.

H	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	C
2'	7,66	114,8	2'
6'	7,52	119,5	6'
5'	6,87	115,6	5'
6	6,77	103,2	6
8	6,65	97,3	8
1''	4,79	103,9	1''
6''a	3,77	60,8	6''
6''b	3,55		

Tabela 36: Manchas de correlação observadas no mapa de contornos HMBC obtido para CC3.

H	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	C
2'	7,66	119,5	6'
		147	4'
		145	3'
		143,5	2'
6'	7,52	115,6	5'
		143,5	2'
		147	4'
5'	6,87	122,01	1'
		145	3'
		147,3	4'
6	6,77	97,31	8
		106,25	10
		158,38	5
		162,57	7
8	6,65	103,21	6
		106,25	10
		157	9
		162	7
1''	4,79	158,38	5
6''a	3,77	60,8	6''
6''b	3,55		

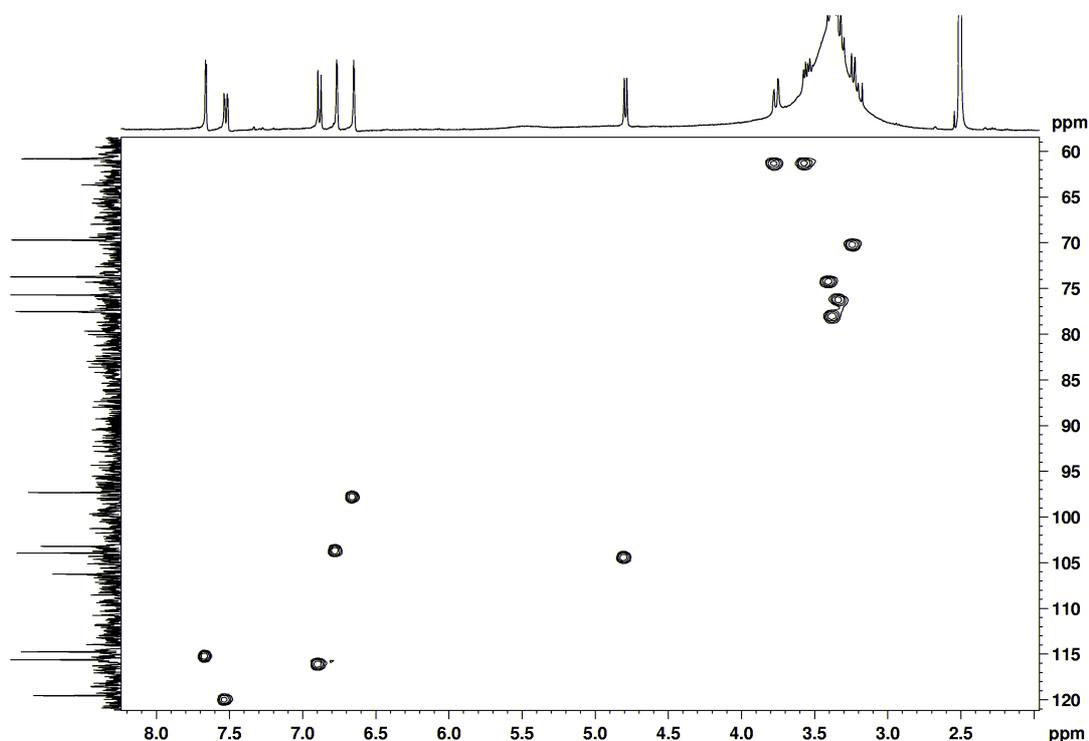


Figura 30: Resultado do experimento HSQC para CC3

As correlações heteronucleares de longa distância evidenciadas pelo experimento HMBC para os anéis A e B de CC3, juntamente com os demais resultados, possibilitaram identificar inequivocamente a aglicona de CC3 como sendo quercetina.

A presença de resíduo monossacarídico na estrutura foi confirmada pela presença de seis sinais no espectro de RMN de ^{13}C com valores de deslocamento químico compatíveis com carbonos oxigenados, entre δ 60,79 e 77,5 ppm (**Tabela 38**), sendo um deles atribuído a carbono metilênico, a partir do experimento DEPT-135, e os demais a carbonos metínicos (CH) (**Figura 28**). O mapa de contornos HSQC indicou a correlação entre o sinal do carbono metilênico (δ 60,79 ppm) com os sinais de hidrogênio em δ 3,77 e 3,55 ppm, valores compatíveis com aqueles relatados para o CH_2 da glicose (**Tabela 38**) (AGRAWAL, 1989; TAMURA et al., 2002). Os demais valores de deslocamento químico obtidos para o resíduo monossacarídico de CC3 também são compatíveis com a glicose (**Tabelas 35 e 36**).

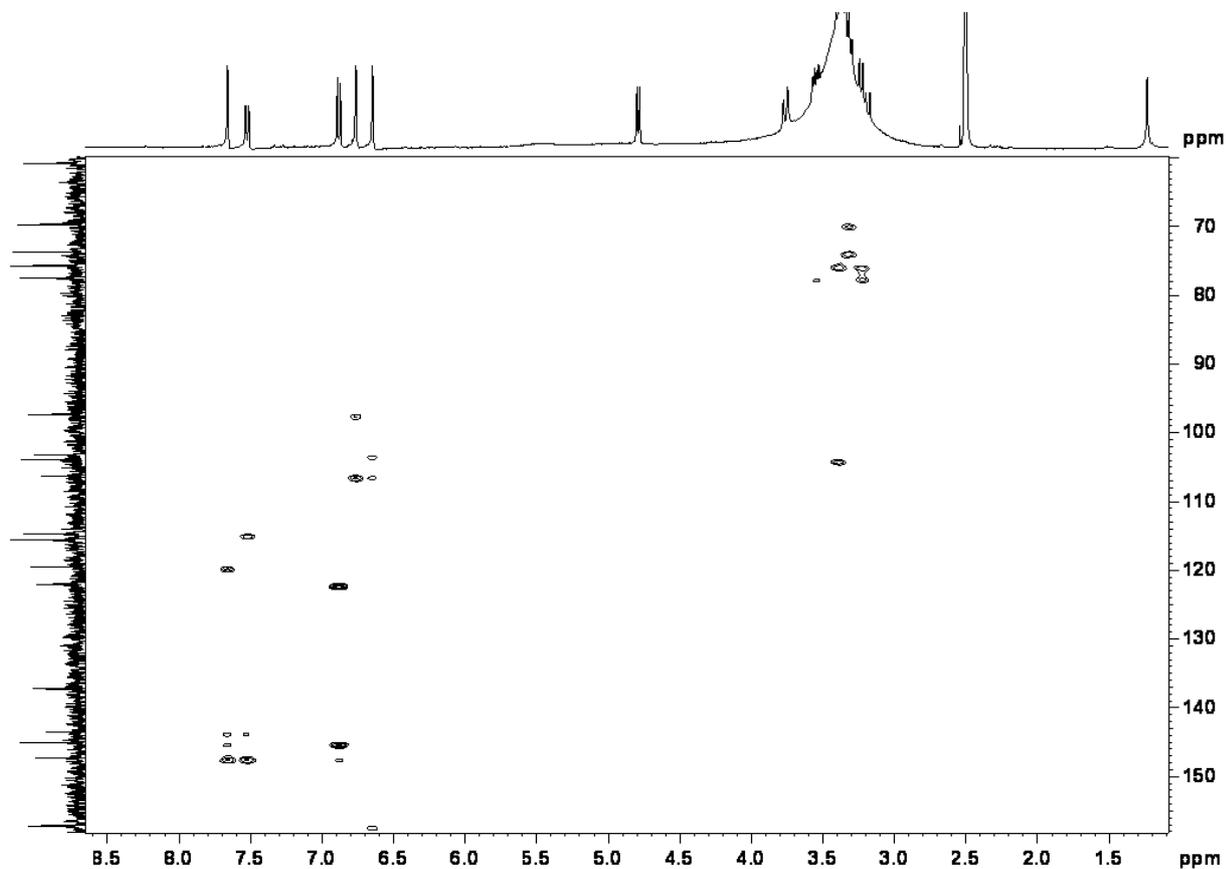


Figura 31: Mapa de correlação HMBC obtido para CC3.

Para identificar a posição de ligação da glicose em CC3 analisou-se, a princípio, o valor de deslocamento químico atribuído ao carbono da carbonila, em δ 171,72 ppm. De acordo com Agrawal (1989), valores entre δ 171 e 186 ppm podem ser atribuídos à carbonila de flavonol, sendo este modificado pela presença de substituintes em C-3 e C-5. Flavonóis não substituídos na posição 5, ou com grupo metoxila nessa posição, apresentam valores de deslocamento químico para C-4 de $172 \pm 1,4$ ppm; quando C-5 é hidroxilado o valor atinge δ $177,3 \pm 1,5$ ppm (AGRAWAL, 1989). A ausência de manchas de correlação nos mapas de contorno HSQC e HMBC entre o sinal atribuído a C-4 (δ 171,72 ppm) e qualquer sinal de hidrogênio indica que ambas as posições C-3 e C-5 são substituídas. Por sua vez, o valor do deslocamento químico de C-4 é incompatível com a hidroxilação de C-5, indicando, portanto, que o resíduo de glicose se liga nesta posição e que a hidroxila em C-3 não está substituída, confirmando que CC3 é um flavonol. Além disso, não se observou, para CC3, alteração no valor de deslocamento químico de C-3 em relação a quercetina, indicando que o ambiente eletrônico é o mesmo para ambas as substâncias (**Tabela 32**).

A configuração β da ligação glicosídica foi estabelecida a partir do valor da constante

de acoplamento escalar de 7,5 Hz do sinal atribuído a H-1" (δ 4,79 ppm, d) ligado ao carbono anomérico (δ 103,94 ppm) (Tabela 35). A análise dos dados espectrométricos obtidos permitiu definir a estrutura de CC3 como sendo a quercetina-5-O- β -glicopiranosídeo (52). Os valores de deslocamento químico obtidos no presente trabalho são similares àqueles relatados por Tamura e colaboradores (2002) para o mesmo composto, isolado do casulo do bicho da seda (*Bombyx mori*). A atribuição dos sinais dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C realizada para CC3 e os dados relatados na literatura para a quercetina-5-O- β -glicopiranosídeo (TANURA et al., 2002) estão dispostos nas Tabelas 37 e 38.

Tabela 37: Dados do espectro de RMN de ^1H obtidos para CC3 e valores relatados na literatura para quercetina-5-O- β -glicopiranosídeo.

H	CC3 (δ , ppm) ^a	quercetina-5-O- β -glucosídeo (δ , ppm) ^b
2'	7,66, d; $J = 2,1$ Hz	7,65; d; $J = 2$ Hz
6'	7,52; dd; $J = 8,5$ e $2,1$ Hz	7,52; dd; $J = 2$ Hz; $8,4$ Hz
5'	6,87; d; $J = 8,5$ Hz	6,88; d; $J = 8,4$ Hz
6	6,77; d; $J = 2$ Hz	6,75; d; $J = 2,4$ Hz
8	6,65; d; $J = 2$ Hz	6,62 ; d; $J = 2$ Hz
1"	4,79; d; $J = 7,5$ Hz	4,78; d; $J = 7,2$ Hz

^a Dados obtidos no presente trabalho; DMSO- d_6 , 400 MHz.

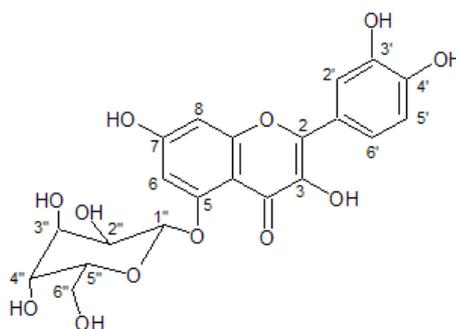
^b Dados relatados por Tamura et al. (2002); DMSO- d_6 ; 400 MHz.

A ocorrência de quercetina 5-O-glicopiranosídeo é rara em espécies vegetais (HIRAYAMA et al., 2008). Esta substância foi anteriormente isolada das raízes de *Rhaponticum carthamoides* (VARGA et al., 1982), de raízes de *Glycyrrhiza uralensis* (PAN, 1999), de partes aéreas de *Lactuca indica*, alface-da-Índia (KIMA; KIMB; LEEA, 2007) e do casulo do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) (KURIOKA; YAMAZAKI, 2002). Larvas de bicho-da-seda são capazes de metabolizar quercetina a quercetina-5-O-glicopiranosídeo no intestino, reação catalizada por UDP-glicosiltransferase com regioespecificidade para a posição 5 da quercetina (HIRAYAMA et al., 2008). Quercetina 5-O-glicopiranosídeo também está presente em *Lamium album* (Labiatae) (GLIENNIE; HARBORNE, 1971; HARBORNE, 1967), *Anthemis cotula* e em sete outras espécies da tribo Anthemideae-Compositae. Esta substância pode ser distinguida dos glicosídeos mais comuns pelo valor de Rf, cor, propriedades espectrais e pela instabilidade. Os 5-O-glicosídeos são hidrolisados por ácido cerca de sessenta vezes mais rapidamente que os 7-O-glicosídeos correspondentes, sendo relatado que são necessários apenas 35 s para hidrolisar 50% de uma amostra de quercetina-5-O-glicopiranosídeo (GLIENNIE; HARBORNE, 1971). A 5-O-glicosilação é um evento raro na natureza provavelmente por envolver reação termodinamicamente desfavorável, pois há quebra da ligação de hidrogênio entre a hidroxila em C-5 e carbonila (HARBORNE, 1967).

Tabela 38: Dados do espectro de RMN de ^{13}C obtidos para CC3 e valores relatados na literatura para quercetina-5-O- β -glicopiranosídeo (TAMURA et al., 2002).

C	Tipo de carbono	CC3 ^a	Quercetina-5-O- β -glicosídeo
2	C	143,5	143,5
3	C	137,3	137,2
4	C	171,7	171,7
5	C	158,4	158,4
6	CH	103,2	103,1
7	C	162,6	162,4
8	CH	97,3	97,3
9	C	157,2	157,1
10	C	106,3	106,3
1'	C	122	122,0
2'	CH	114,8	114,7
3'	C	145,1	145,0
4'	CH	147,3	147,3
5'	CH	115,6	115,6
6'	CH	119,5	119,5
1''	CH	103,9	103,9
2''	CH	73,7	73,7
3''	CH	75,7	75,7
4''	CH	69,7	69,7
5''	CH	77,5	77,5
6''	CH ₂	60,8	60,8

^aDados obtidos no presente trabalho, 100 MHz, DMSO-*d*₆.



52

Glicosídeos de flavonoides cujo açúcar está ligado à hidroxila em C-5 constituem interessantes indicadores taxonômicos de plantas superiores por serem relativamente raros e de fácil detecção (GLIENNIE; HARBORNE, 1971).

Quanto a atividade biológica da quercetina 5-O-glicopiranosídeo, foi demonstrado efeito hepatoprotetor contra vírus da hepatite B (HVB) *in vitro* (KIMA; KIMB; LEEA, 2007). Não foram encontrados estudos sobre atividades biológicas relacionadas a ação anti-hipertensiva.

5.6.4 Elucidação estrutural de CC4

A substância CC4 apresentou valor de Rf igual a 0,75 em CCD de sílica gel produzindo mancha com fluorescência amarelada após revelação com cloreto de alumínio a 5%, nas condições descritas no item 4.2.3.

Hidrólise ácida do extrato de *C. carthagenensis* resulta no desaparecimento do pico correspondente a CC4 e aumento da área do pico da quercetina, conforme descrito no item 5.7.2.2; portanto, supõe-se que a aglicona de CC4 seja a quercetina. A análise dos espectros no UV com o uso de reagentes de deslocamento indicou tal aglicona. Os resultados encontram-se resumidos na **Tabela 39**.

Tabela 39: Resultados da análise do espectro de absorção no UV para CC4, com o uso de reagentes de deslocamento.

Reagentes e solventes	λ_{\max} (valores em nm)			Conclusão
	Banda II	Banda I	Banda III	
MeOH	256,0	355,5	Ausente	Possível flavonol com OH em C3 livre ou substituída, chalcona (AGRAWAL, 1989)
MeOH + NaOMe	271,0	402,5	324,5	Hidroxilas livres em ambos os anéis
MeOH + NaOAc	273,0	391,0	322,5	Hidroxilas em C-4' e/ou C-3, e C-7
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	260,5	374,5	316,0	Grupo <i>orto</i> -diidroxí no anel B
MeOH + AlCl ₃	274,0	423,5	Ausente	Complexo estável com hidroxilas em C-3 ou C-5, ou formação de complexo lábil com sistemas <i>orto</i> -diidroxí
MeOH + AlCl ₃ + HCl	269,5	403,0	Ausente	Grupo <i>orto</i> -diidroxí no anel B

As variações nos valores de absorção máxima foram semelhantes àqueles obtidos para CC1. Adição de ácido clorídrico à solução contendo cloreto de alumínio resultou em deslocamento hipsocrômico da banda I de 20 nm, confirmando a presença de sistema *orto*-diidroxí no anel B. Em relação aos máximos registrados para o espectro em metanol, ainda se observa deslocamento batocrômico, indicando a existência de hidroxila livre em C-3 e/ou C-5 (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970; BARRON et al., 1988).

Provavelmente existe substituinte na hidroxila ligada no carbono 3, pois se observa deslocamento hipsocrômico entre 12 e 17 nm (14,5 nm) em relação ao espectro em metanol da quercetina, bem como deslocamento batocrômico entre 35 e 55 nm (47,5 nm) do espectro após adição de cloreto de alumínio e ácido clorídrico, em relação ao espectro original em metanol, além de não se observar degradação do espectro 5 min após a adição de metóxido de sódio (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

Com base nesses dados foi proposta a estrutura preliminar para CC4 (**53**).

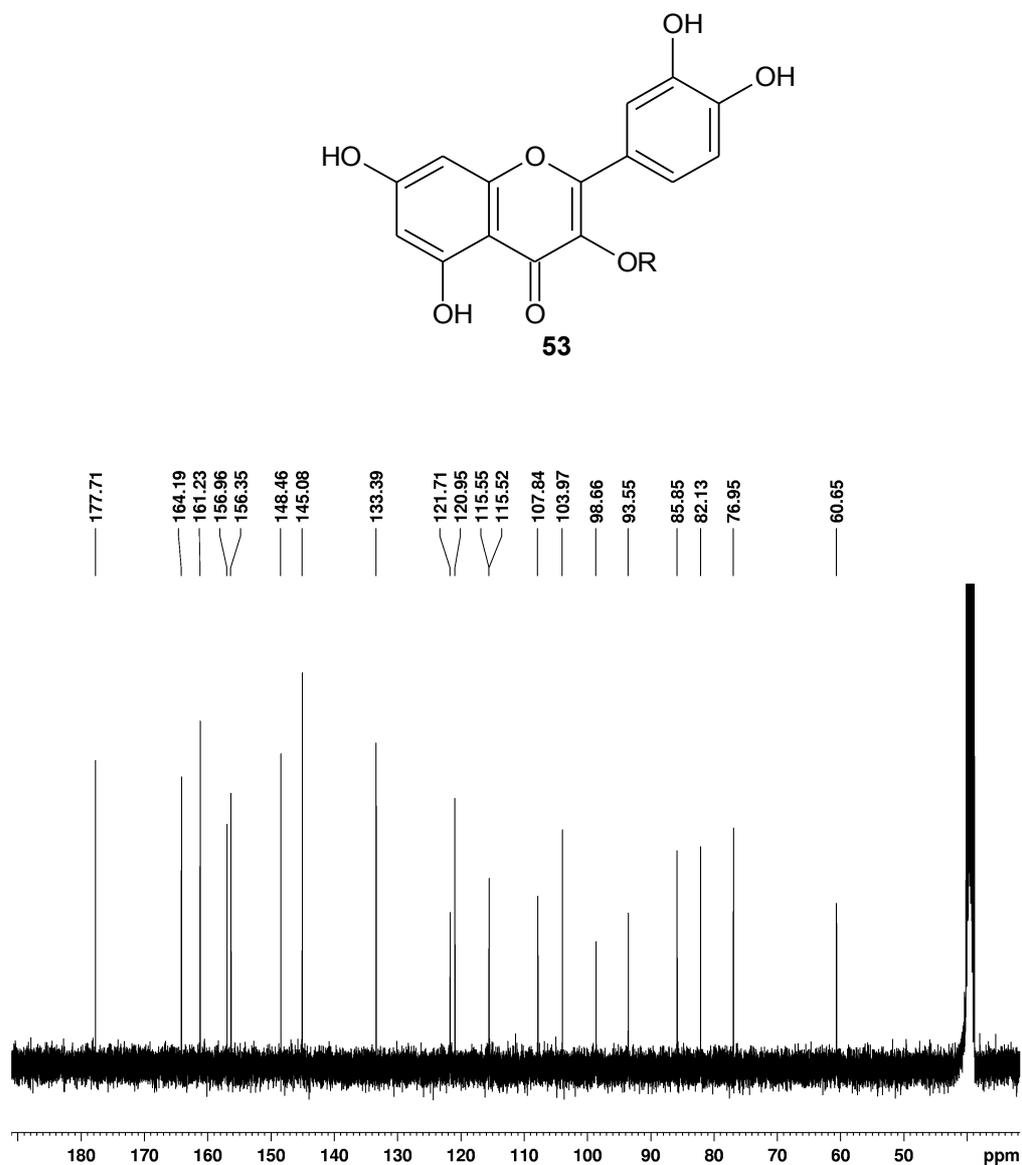


Figura 32: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para CC4 (DMSO- d_6 , 100 MHz).

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) registrado para CC4 mostra 20 sinais, compatível com um monoglicosídeo de pentose (**Figura 32**). As principais pentoses ocorrentes em espécies vegetais são: xilose, ribose, arabinose e apiose (DEWICK, 2002). A análise do subespectro-135 (**Figura 33**) indicou a presença de um sinal atribuído a carbono metilênico, em δ 60,4 ppm, compatível, portanto, com um resíduo de arabinofuranose (**54**) ou apiose (**55**). Comparando-se o espectro obtido para CC4 com aquele da quercetina observa-se que as alterações nos deslocamentos ocorreram de forma significativa apenas para os sinais correspondentes aos carbonos 2, 3 e 4, indicando substituição na hidroxila

em C-3. Reforçando esse resultado Slimestad, Torgils e Verheul (2008) descreveram valores de deslocamento químico semelhantes aos obtidos com CC4 para os carbonos 2, 3, 4, 9 e 10 de outros glicosídeos de flavonoides substituídos no C-3.

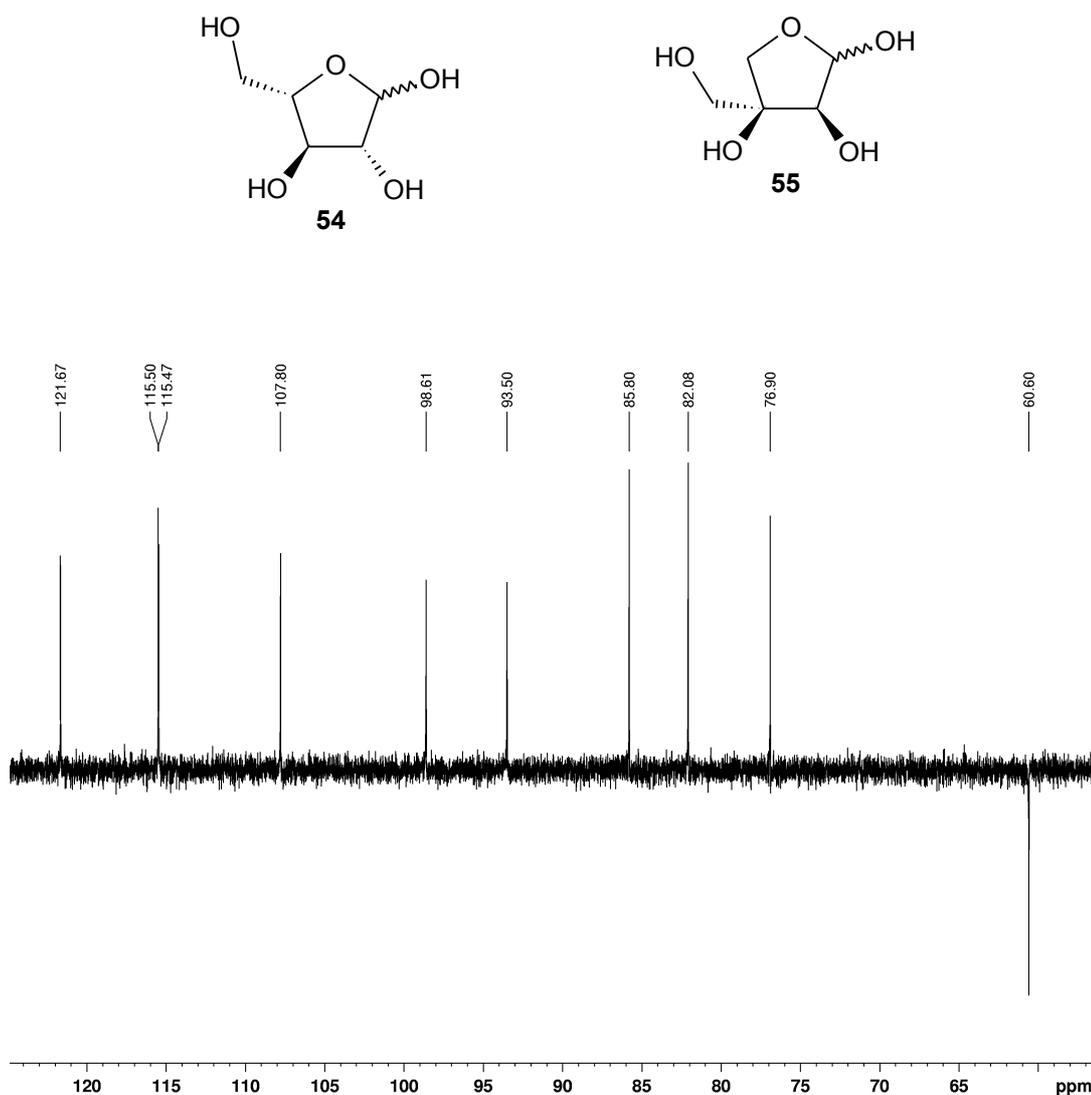


Figura 33: Subespectro DEPT-135 obtido para CC4 (DMSO-d6, 100 MHz)

A análise do espectro de RMN de ^1H obtido para CC4 (**Figura 34**) mostrou nove sinais, cada um com integral correspondente a um hidrogênio (**Tabela 41**). Os sinais com deslocamento químico de hidrogênios aromáticos, entre δ 7,48 e 6,85 ppm, correspondem àqueles da aglicona quercetina, e foram atribuídos conforme descrito nos itens 5.6.1 e 5.6.3. Os demais sinais foram atribuídos aos hidrogênios do açúcar. No espectro monodimensional

não puderam ser visualizados os sinais dos hidrogênios metilênicos do açúcar, que, de acordo com o experimento HSQC (Tabela 40, Figura 35) encontram-se em torno de δ 3,3 ppm, ou seja, encobertos pelo sinal dos hidrogênios da água residual na amostra.

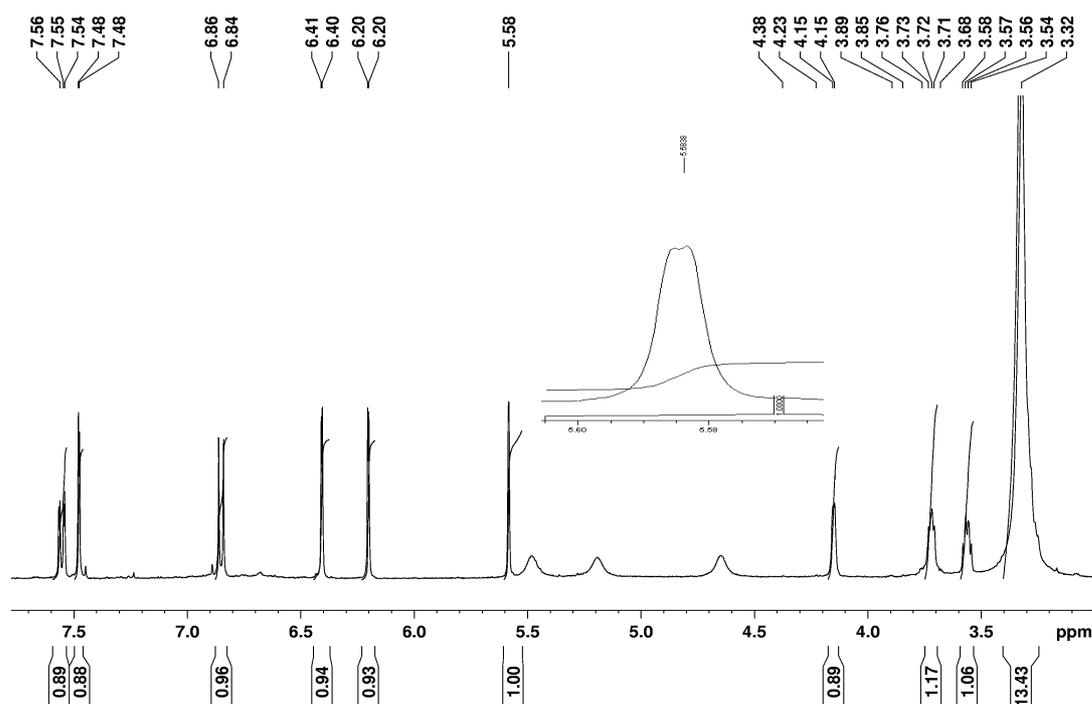


Figura 34: Espectro de RMN de ^1H obtido para CC4 (DMSO- d_6 , 400 Mhz), com expansão.

O sinal em δ 107 ppm no espectro de RMN de ^{13}C foi atribuído ao carbono anomérico, por apresentar o maior valor de deslocamento químicos dentre os carbonos metínicos do resíduo de açúcar. Este apresentou uma mancha de correlação, no mapa de contornos HSQC, com o sinal em δ 5,58 ppm, atribuído, portanto, a H-1". Este sinal apresentou-se como um simpleto largo e não como um duplete duplo esperado, resultante do acoplamento com H-2". Este resultado sugere um valor de constante de acoplamento escalar baixo, indicando a configuração α para a ligação glicosídica (Figura 34).

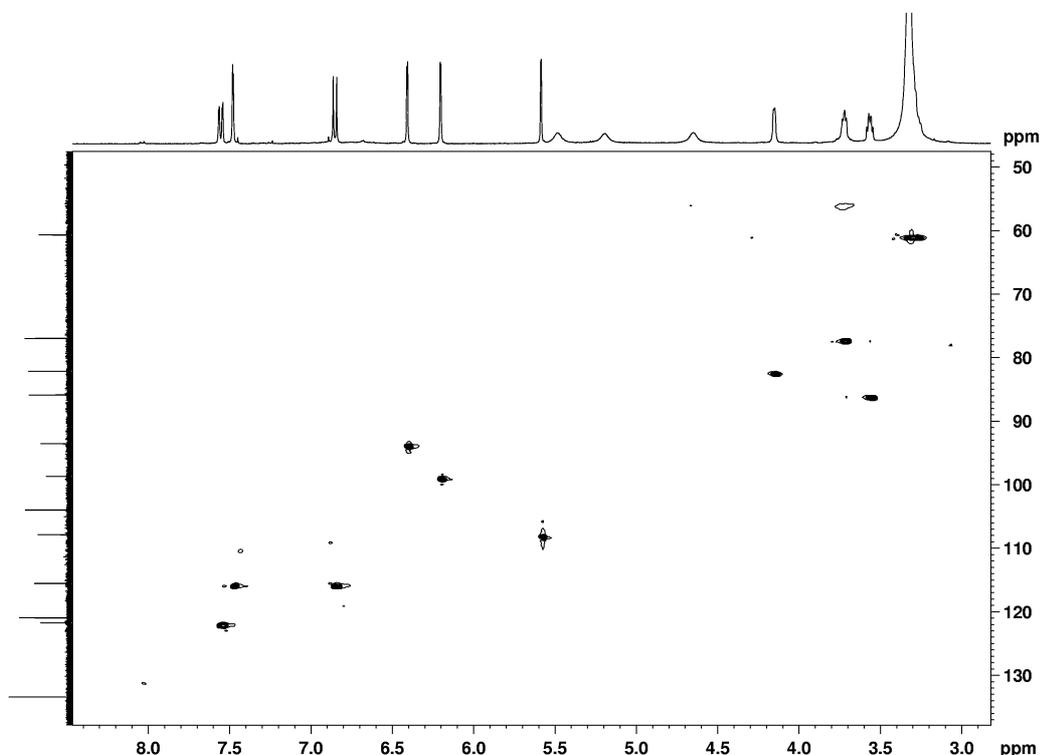
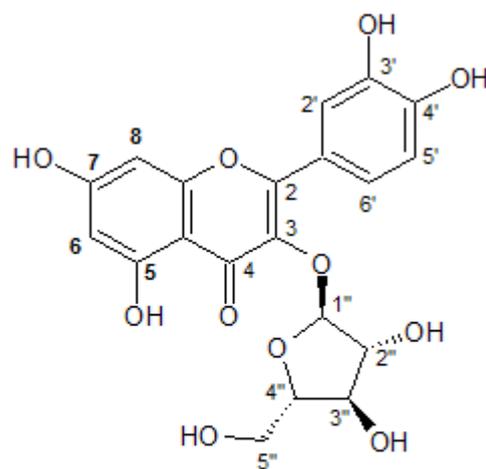


Figura 35: Mapas de correlação HSQC obtidos para CC4.

O único sinal que apresentou acoplamento visível no espectro de RMN de ^1H com os dois hidrogênios vizinhos foi aquele em δ 3,56 ppm (multiplete), atribuído a H-4". A multiplicidade do sinal dos hidrogênios metilênicos (δ 3,3 ppm) não pode ser observada, pois o sinal da água residual o encobriu. Através do mapa de contornos HSQC tal sinal foi atribuído aos hidrogênios CH_2 -5". O duplete em δ 3,72 ppm ($J = 5,0$ Hz) foi atribuído a H-3". Esses dados possibilitaram definir a arabinofuranose como sendo o açúcar presente em CC4, cuja estrutura então foi proposta como sendo quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo (**56**). Os dados espectrais obtidos para CC4 foram comparados com dados relatados na literatura para quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo (EK et al., 2006) e apresentaram boa correspondência (Tabelas 42 e 43).



56

Tabela 40: Manchas de correlação observadas no mapa de contornos HSQC obtido para CC4.

H	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)
6	98,6	6,2
8	93,6	6,4
2'	115,6	7,48
6'	121,7	7,55
5'	115,5	6,85
1''	107	5,58
2''	82,1	4,15
3''	77	3,72
4''	85,9	3,56
5''	60,7	3,3 *

* Sinal de CC4 encoberto pelo sinal da água.

Tabela 41: Dados do espectro de RMN de ¹H obtidos para CC4 e valores relatados na literatura para quercetina-3-O-α-arabinofuranosídeo.

H	CC4 (δ, ppm) ^a	quercetina-3-O-α-arabinofuranosídeo (δ, ppm) ^b
2'	7,48; d; J = 2,1 Hz	7,47; d; J = 2,2 Hz
5'	6,85; d; J = 8,5 Hz	6,85; d; J = 8,4 Hz
6'	7,55; dd; J = 2,1 e 8,5 Hz	7,55; dd; J = 2,2 e 8,4 Hz
6	6,20; d; J = 2 Hz	6,2; d; J = 2,0 Hz
8	6,41; d; J = 2 Hz	6,41; d; J = 2,0 Hz
1''	5,58; simpleto largo	5,58; J = 1,2 Hz
2''	4,15; d; J = 2,6 Hz	4,15; dd; J = 3,8 Hz
3''	3,72; J = 5 e ? Hz	3,71; dd; J = 6,2 Hz
4''	3,56; m	3,54; m; J = 3,7 e 5,2 Hz
5''a	Não visível	3,32; dd; J = -11,9
5''b		3,27; dd

^a Dados obtidos no presente trabalho; DMSO-*d*₆, 400 MHz.

^b Dados relatados por EK e colaboradores (2006); DMSO-*d*₆; 500 MHz.

Tabela 42: Dados do espectro de RMN de ^{13}C de CC4 e valores relatados na literatura para quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo (avicularina) (EK et al., 2006).

C	Tipo de carbono	CC4 ^a (δ , ppm)	Quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo ^b
2	C	157	156,9
3	C	133,4	133,4
4	C	177,7	
5	C	161,2	160,8
6	CH	98,6	98,4
7	C	164,2	163,8
8	CH	93,6	93,3
9	C	156,4	156,4
10	C	104	103,9
1'	C	121	120,9
2'	CH	115,6	115,3
3'	C	145,1	144,8
4'	C	148,5	148,1
5'	CH	115,5	115,3
6'	CH	121,7	121,5
1''	CH	107,8	107,6
2''	CH	82,1	81,9
3''	CH	77	76,6
4''	CH	85,9	85,6
5''	CH ₂	60,7	60,4

a. Dados obtidos no presente trabalho, 100 MHz, DMSO-*d*6.

b. Dados relatados por Ek e colaboradores (2006), DMSO-*d*6.

Não foram encontrados artigos sobre a potencial atividade hipotensora, vasodilatadora ou anti-hipertensiva da quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo, também denominada avicularina, ou sobre o isolamento desta substância a partir de outra espécie da família Lythraceae.

Foi demonstrada atividade antibacteriana de avicularina isolada de folhas de *Psidium guajava* (goiabeira) (METWALLY et al., 2010; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010) e atividade antifúngica (METWALLY et al., 2010).

5.7 Quantificação de metabólitos secundários por cromatografia líquida de alta eficiência

5.7.1 Quantificação de flavonoides

Os resultados das análises de correlação (item 5.4) indicaram que flavonoides podem estar associados à atividade vasodilatadora de *C. carthagenensis*; além disso, já foram descritos diversos flavonoides com atividade vasodilatadora, hipotensora e anti-hipertensiva. Portanto, buscou-se desenvolver, no presente trabalho, um método para

quantificação por CLAE dos flavonoides isolados e da quercetina em extrato bruto (etanólico) de *C. carthagenensis*.

CLAE é o método de escolha para análise quantitativa de flavonoides (RIJKE et al., 2006; NOVÁKOVÁ et al., 2010) em fluidos biológicos, bebidas, plantas e alimentos (RIJKE et al., 2006). Em geral, é utilizado o método do padrão externo para determinar a concentração de cada flavonoide, podendo-se citar, a título de exemplo, a determinação de quercetina-3-O- β -D-galactopiranosil-7-O- β -D-glicopiranoídeo, quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil-7-O- β -D-glicopiranosídeo, rutina, hiperina e quercitrina em *Houttuynia cordata* (MENG et al., 2009).

A análise de flavonoides intactos, por exemplo no caso de glicosídeos, é mais relevante em estudos relacionados a atividades biológicas (KELM; HAMMERSTONE; SCHMITZ, 2005), já que estas podem ser alteradas mesmo com pequenas diferenças estruturais, além disso é necessário considerar questões farmacocinéticas, conforme discutido no item 5.3.1.3.

5.7.1.1 Estabelecimento das condições cromatográficas

As principais condições de análise avaliadas encontram-se listadas na **Tabela 15**, no item 4.8.3.1, p. 71.

Inicialmente avaliou-se o emprego de metanol/água contendo 0,1% de ácido fosfórico como eluente em gradiente de 5 a 50% em 30 min. Observou-se que o uso de metanol promove uma melhor separação dos flavonoides das demais substâncias, que eluem com tempo de retenção inferior aos flavonoides, ao contrário da eluição com acetonitrila conforme descrito no item 5.1.2.

A escolha do comprimento de onda de detecção, $\lambda = 350$ nm, baseou-se no fato dos flavonoides apresentarem absorvância máxima em duas regiões do espectro, banda I na região entre 300 a 350 nm, e banda II na região entre $\lambda = 240$ a 285 nm, sendo que em $\lambda = 350$ nm obtém-se maior seletividade.

Portanto, foram adotadas duas estratégias para se alcançar melhor seletividade para flavonoides: (1) detecção em $\lambda = 350$ nm, e (2) eluente contendo metanol e água acidificada com 0,1% de ácido fosfórico.

As condições avaliadas encontram-se na **Tabela 15**, p. 71 e os principais cromatogramas obtidos, na **Figura 36**.

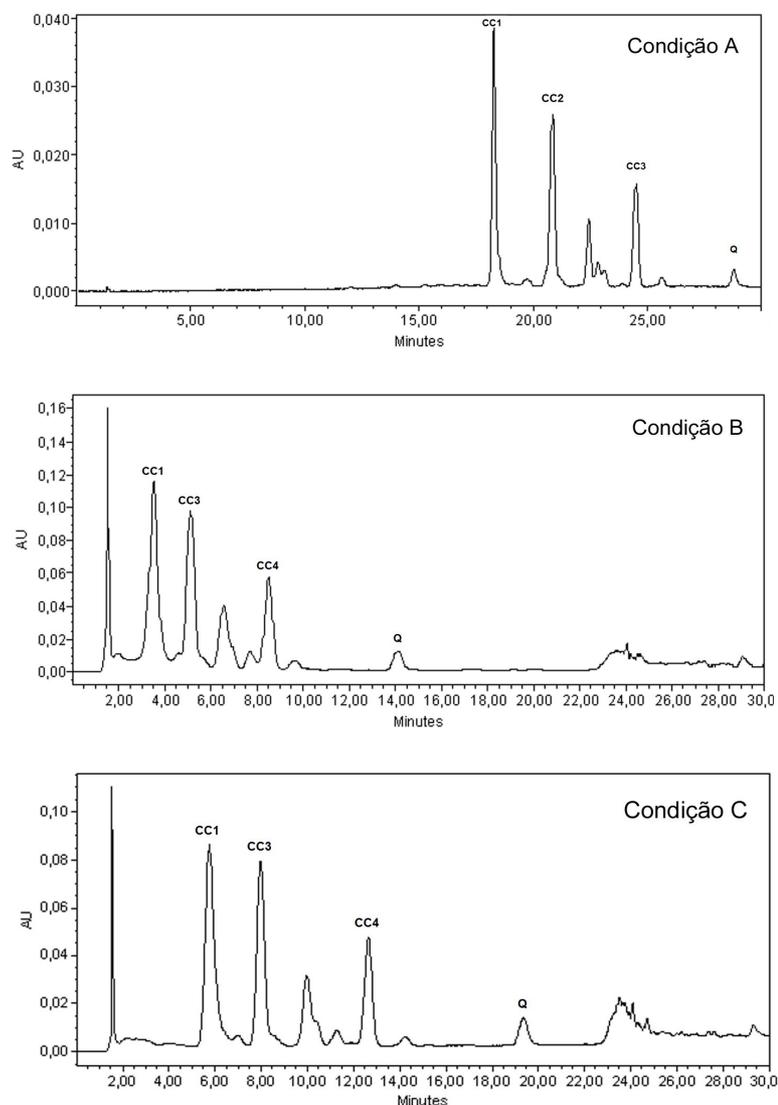


Figura 36: Cromatogramas, obtidos por CLAE, durante o desenvolvimento do método de análise quantitativa de flavonoides em *C. carthagenensis*. CC1 (quercetina-3-sulfato), CC3 (quercetina-5-O- β -glicospiranosídeo), CC4 (quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo) e Q (quercetina), com espectros de absorção no UV característicos de flavonoides. Condições cromatográficas: vide Tabela 16, página 43.

Na **Figura 36** consta, também, a identificação dos picos correspondentes a cada substância isolada e quercetina. Observou-se que o flavonoide sulfatado (quercetina-3-sulfato) foi o menos retido, seguido dos glicosídeos quercetina-5-O- β -glicopiranosídeo (CC3) e quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo (CC4). Glicosídeos de pentoses usualmente apresentam maiores tempo de retenção em análises por CLAE com coluna de ODS do que daqueles de hexoses (RIO et al., 2004; OZGA et al., 2007).

A seguir serão descritos os principais resultados e alterações efetuadas nas

condições cromatográficas.

Condição A

Esta condição foi definida a partir da constatação, na corrida exploratória, de que todas as substâncias com espectro de absorção no ultravioleta característico de flavonoides eluíam com até 20% do modificador orgânico (acetonitrila contendo 0,1% de ácido fosfórico). Como a força de eluição do metanol é inferior à da acetonitrila (SNYDER, 1997), estabeleceu-se como condição inicial gradiente de eluição de 5 a 50% de metanol em 30 min.

O cromatograma obtido nessa condição indicou a ausência de picos majoritários no intervalo até 15 min (**Figura 36**). Através da equação da reta que representa o incremento na proporção de metanol em função do tempo determinou-se que seria possível diminuir o tempo de análise aumentando-se a proporção inicial de metanol para 35% (condição B).

Snyder (1997) sugere que durante o desenvolvimento de métodos cromatográficos inicialmente seja ajustado o fator de retenção, através de alterações na força da fase móvel. No entanto, esta estratégia pode levar à diminuição na resolução. A fim melhorar a resolução, na condição B a inclinação do gradiente foi diminuída de 1,5 para 0,75% MeOH x min⁻¹.

Condição B

A análise do cromatograma apresentado na **Figura 36** e dos parâmetros citados na **Tabela 43** indica que a resolução obtida foi inferior àquela da condição A. Portanto, a modificação proposta na inclinação do gradiente não foi suficiente para compensar a perda de resolução. Por outro lado, a alteração na amplitude do gradiente conseguiu reduzir de forma satisfatória o tempo de análise.

Assim, para aumentar a resolução do pico correspondente à substância CC1, na condição C empregou-se menor proporção inicial de metanol, 30%

Condição C

A modificação introduzida resultou em aumento na resolução do picos majoritários (**Tabela 43**). Snyder (1997) sugere valores de resolução iguais ou superiores a 1,5, preferencialmente 2,0, para determinações quantitativas.

A seletividade da condição cromatográfica foi avaliada a partir da pureza espectral dos picos de interesse. Para tanto, foram extraídos espectros de absorção no ultravioleta no ápice e nas porções médias ascendente e descendente dos picos correspondentes a CC1,

CC3, CC4 e quercetina, resultando em espectros sobreponíveis. Portanto, conclui-se que, se não existirem substâncias com mesmos máximos de absorção eluindo nos tempos de retenção correspondentes aos picos majoritários, os mesmos podem ser considerados puros, ou seja, são resultantes da absorção no ultravioleta de apenas uma substância. Considerou-se que os resultados obtidos demonstram a pureza espectral dos picos e, portanto, a seletividade do sistema cromatográfico.

As condições avaliadas são semelhantes àquelas comumente empregadas na análise de flavonoides, tanto de agliconas quanto de glicosídeos e outros derivados. Os sistemas de eluição geralmente são binários, com solução aquosa acidificada com ácido acético, perclórico, fosfórico ou fórmico e como modificador orgânico metanol ou acetonitrila. A separação em geral ocorre em coluna de fase reversa; o fluxo fica entre 1,0 e 1,5 ml/min e a temperatura da coluna entre 25 e 40 °C, sendo injetados volumes de 1 a 100 µl, resultando em corridas com duração máxima de uma hora (MERKEN; BEECHER, 2000).

Foram realizadas outras tentativas para melhorar a resolução, mas em nenhuma delas obteve-se resolução superior àquela obtida na condição C.

Não foi possível, por exemplo, separar as substâncias que eluem em torno de 10 min (**Figura 36**, condição C), cujo espectro de absorção no ultravioleta é compatível com aquele de flavonoides. Esse fato decorre possivelmente da grande semelhança estrutural entre tais compostos. Fato esse já relatado na literatura científica, por exemplo em revisão elaborada por Kelm, Hammerstone e Schmitz (2005) onde se discute que a análise de glicosídeos de flavonoides por CLAE é dificultada devido a possibilidade de coeluição ou baixa resolução, resultante da grande semelhança estrutural deles. A separação deste flavonoide permitiria sua quantificação como quercetina.

Uma alternativa viável para a quantificação simultânea de glicosídeos e agliconas flavônicas é a cromatografia líquida de ultra eficiência. Nováková e colaboradores (2010) relataram métodos para determinação de catequinas, flavonoides na forma de O-glicosídeos e outros polifenóis em folhas de *Camellia sinensis*, o chá-verde, empregando tal técnica. São obtidos tempos de análise reduzidos com resolução equivalente à CLAE convencional em função do uso de colunas com menor tamanho de partícula (inferior a 2 µm). Os autores obtiveram separação satisfatória de 29 polifenóis em corrida de 20 min, para análise de rutina, miricetina, quercetrina, quercetina, narigenina, luteolina, hesperetina e canferol.

Os parâmetros cromatográficos avaliados para a condição otimizada encontram-se listados na **Tabela 43**.

Tabela 43: Parâmetros cromatográficos avaliados durante o desenvolvimento do método de análise quantitativa de flavonoides em *C. carthagenensis*.

Condição	Parâmetros	Picos			
		CC1	CC3	CC4	Q
A	Tempo de retenção	18,3	20,9	24,5	28,8
	R (pico anterior)	n.c.	7,2	5,1	n.c.
	R (pico seguinte)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
	Fator de cauda	1,2	0,81	0,93	0,94
B	Tempo de retenção	3,5	5,1	8,5	14,1
	R (pico anterior)	4,9	0,39	1,4	n.c.
	R (pico seguinte)	?	1,86	1,86	n.c.
	Fator de cauda	0,99	1,3	1,0	0,93
C	Tempo de retenção	5,7	7,9	12,7	19,4
	R (pico anterior)	1,7	1,9	1,5	n.c.
	R (pico seguinte)	2,0	2,8	2,9	n.c.
	Fator de cauda	1,3	1,4	0,98	1,03

Nota: R, resolução; n.c., não calculado; CC1, quercetina-3-sulfato; CC3, quercetina-5-O-glicopiranosídeo; CC4, quercetina-3-O-arabinofuranosídeo e Q, quercetina.

5.7.1.2 Curvas analíticas

As curvas analíticas foram construídas a partir da análise cromatográfica de soluções de quercetina diidratada. Foram submetidas à análise as massas de quercetina que constam na **Tabela 44**, que resultaram em picos com as áreas listadas nesta tabela. O gráfico correspondente está representado na **Figura 37**.

Foram obtidas duas curvas por regressão linear, em dias distintos, com coeficientes de determinação de 0,9999 e 1,000.

Análise de covariância ($p \geq 0,05$) indicou equivalência entre as retas, sendo então a equação da reta obtida com os valores médios:

$$AP = 2,89 \times m + 0,02$$

Onde:

AP = área do pico

m = massa de quercetina diidratada em μg

Tabela 44: Áreas dos picos obtidas da análise de soluções de quercetina diidratada por CLAE, empregadas na determinação das curvas analíticas.

Massa injetada (μg)	Área do pico ($\times 10^6$)	
	Dia 1	Dia 2
0,098	0,269	
0,10		0,278
0,392	1,091	
0,40		1,130
0,98	2,722	
1,0		2,842
2,94	8,673	
3,0		8,771
4,90	14,222	
5,0		14,519
7,84	22,707	
8,0		23,229
9,8	28,348	
10,0		28,898

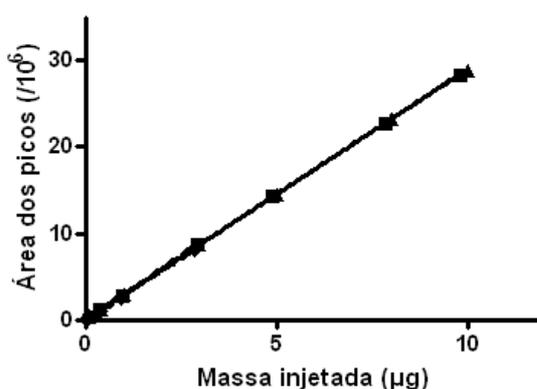


Figura 37: Curvas analíticas de quercetina diidratada utilizadas para doseamento de flavonoides por CLAE.

A partir das curvas analíticas, após correção para expressar o resultado em quercetina anidra e incorporar as diluições efetuadas, chegou-se à seguinte fórmula para cálculo de flavonoides:

$$\% \text{ Flavonoides} = \frac{AP \times 3,09}{m}$$

Onde:

AP = área do pico

m = massa em miligramas

O desenvolvimento deste cálculo se encontra no Apêndice C.

As curvas analíticas para quercetina diidratada foram repetidas após cerca de dois

anos. Os resultados podem ser visualizados na **Tabela 45** e no gráfico representado na **Figura 38**.

Tabela 45: Áreas dos picos obtidas da análise de soluções de quercetina diidratada por CLAE, empregadas na determinação das curvas analíticas.

Massa injetada (μg)	Área do pico ($\times 10^6$)	
	Dia 1	Dia 2
0,0382	0,0838	
0,0389		0,0811
0,0954	0,235	
0,0972		0,257
0,382	1,02	
0,389		1,04
0,954	2,61	
0,972		2,66
2,862	8,24	
2,92		8,53

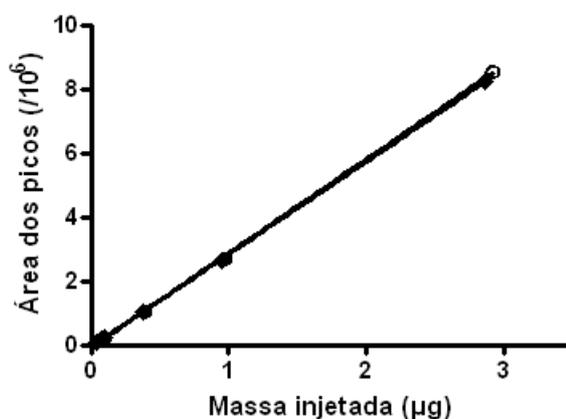


Figura 38: Curvas analíticas de quercetina diidratada utilizadas para doseamento de flavonoides por CLAE.

Foram obtidos valores de r^2 de 0,9998 e 0,9996, para as curvas em dois dias distintos. Como houve coincidência entre as retas (regressão linear seguida de análise de covariância; $p \geq 0,05$), a equação da reta foi obtida os com valores médios:

$$AP = 2,92 \times m - 0,075$$

Onde:

AP = área do pico

m = massa de quercetina diidratada em μg

A partir das curvas analíticas, após correção para expressar o resultado em quercetina anidra e incorporar as diluições efetuadas, chegou-se à seguinte fórmula para

cálculo de flavonoides nos extratos e frações de *C. carthagenensis*:

$$\% \text{ Flavonoides} = \frac{AP \times 3,06}{m}$$

Onde:

AP = área do pico

m = massa em miligramas

O desenvolvimento deste cálculo se encontra no Apêndice C.

A análise das curvas obtidas com intervalo de dois anos indicou equivalência estatística entre elas. Portanto, os resultados gerados por elas são estatisticamente semelhantes mesmo após desgaste da coluna. Este dado sugere que a substância de referência não precisaria ser analisada todas as vezes em que o método for aplicado, o que precisa ser melhor avaliado.

Quercetina foi selecionada como substância de referência pela disponibilidade comercial a um custo relativamente baixo e por ser a aglicona dos três flavonoides isolados de *C. carthagenensis*. A concentração dos flavonoides foi calculada como quercetina anidra. Neste caso, não se considerou as diferenças de absorvidade molar para os flavonoides quantificados, ou seja, todos foram calculados como se sua absorvidade molar fosse a mesma da quercetina anidra.

Uma das dificuldades na análise de drogas e extratos vegetais, bem como de fitoterápicos, é o alto custo das substâncias de referência, quando disponíveis comercialmente, e a morosidade para sua obtenção pelo próprio laboratório que pretende realizar as análises quantitativas, por processos de isolamento como aqueles descritos nos itens 4.6 e 5.5. Outras técnicas, também limitadas de obtenção, seriam por cultura de tecidos, biotransformação e síntese. Além do fator custo, existe a restrição da indisponibilidade comercial de diversas destas substâncias (KELM; HAMMERSTONE; SCHMITZ, 2005). Trata-se, portanto, de método exato, mas dispendioso. Como alternativa, pode-se calcular o teor de diferentes substâncias de uma mesma classe expressando-o em relação a uma substância de fácil aquisição, caso da quercetina no presente trabalho.

Também foram construídas curvas analíticas para quercetina-3-sulfato e quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo a fim de comparar os resultados da quantificação dos flavonoides como quercetina e com base em suas curvas analíticas específicas.

Os dados utilizados para a construção das curvas analíticas de quercetina-3-sulfato

estão descritos na **Tabela 46**, e aqueles obtidos para a quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo constam da **Tabela 47**. A massa de quercetina-5-O- β -glicopiranosídeo isolada não foi suficiente para construção de curvas analíticas.

Tabela 46: Áreas dos picos obtidas da análise de soluções de quercetina-3-sulfato por CLAE, empregadas na determinação das curvas analíticas.

Massa injetada (μg)	Área do pico ($\times 10^6$)	
	Dia 1	Dia 2
0,020	0,041	
0,036		0,054
0,100	0,162	
0,181		0,266
0,200	0,374	
0,360		0,691
1,00	0,21	
1,81		3,750
2,00	3,90	
3,62		7,24

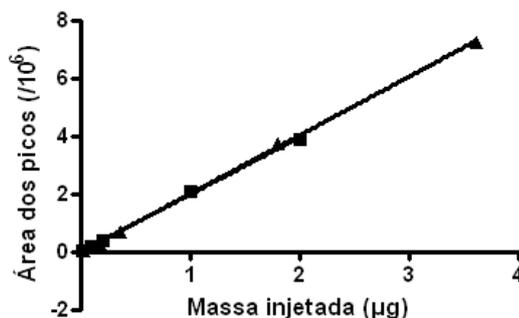


Figura 39: Curvas analíticas de quercetina-3-sulfato.

Foram obtidos r^2 iguais a 0,9990 e 0,9994.

A equação obtida após constatação da semelhança estatística entre as curvas é:

$AP = 2,01 \times m - 0,02$, onde: AP = área do pico e m = massa em miligramas

Partindo desta equação chegou-se a fórmula de cálculo do teor de quercetina-3-sulfato, usando o mesmo esquema que consta no Apêndice C:

$$\% \text{ de quercetina-3-sulfato} = \frac{AP \times 5,03}{m \text{ (mg)}}$$

As curvas construídas a partir das soluções de quercetina-3-O-arabinofuranosídeo

em dois dias distintos ($r^2 = 1,000$ e $0,9999$) também foram estatisticamente equivalentes, sendo obtida a equação resultante dos valores médios.

Tabela 47: Áreas dos picos obtidas da análise de soluções de quercetina-3-O-arabinofuranosídeo por CLAE, empregadas na determinação das curvas analíticas.

Massa injetada (μg)	Área do pico ($\times 10^6$)	
	Dia 1	Dia 2
0,0234	0,0229	
0,03		0,0435
0,117	0,185	
0,125		0,227
0,234	0,398	
0,25		0,410
1,17	1,98	
1,25		2,11
2,34	3,98	
2,5		4,26

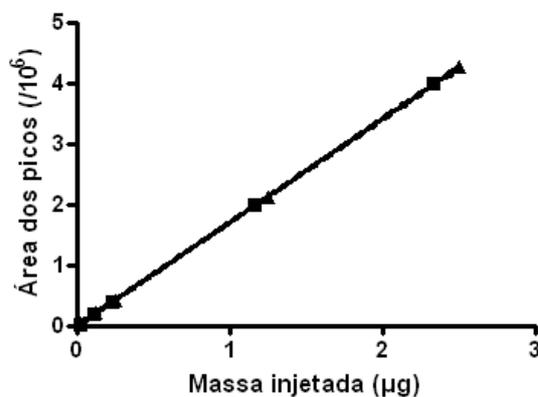


Figura 40: Curvas analíticas de quercetina-3-sulfato utilizadas para doseamento de flavonoides por CLAE.

Foi obtida a seguinte equação:

$$AP = 1,70 \cdot m - 0,007, \text{ onde: } AP = \text{área do pico, } m = \text{massa em miligramas}$$

E a seguinte fórmula para cálculo do teor de quercetina-3-O-arabinofuranosídeo:

$$\% = \frac{AP \times 3,88}{m \text{ (mg)}}$$

5.7.1.3 Precisão

A validação parcial do método foi efetuada para o extrato bruto (etanólico).

A fim de desenvolver um método de execução fácil e rápida, o preparo da amostra envolveu a solubilização de 15,0 mg do extrato bruto em 1,00 ml de metanol em frasco plástico do tipo *safe-lock* com capacidade de 2,0 ml. Para auxiliar na solubilização do extrato foi necessário manter a mistura em banho de ultrassom por menos de 1 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi analisado no sistema de CLAE, conforme descrito no item 4.8.3.3.

Precisão intradia

A precisão intradia foi calculada para três níveis de tomada de amostra. A concentração de cada flavonoide (**Tabela 48**), foi calculada com base nas curvas analíticas de quercetina. No Apêndice C consta o desenvolvimento da equação para quantificação dos flavonoides como quercetina anidra.

Tabela 48: Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) da concentração (porcentagem m/m) de cada flavonoide no extrato bruto de *C. carthagenensis* calculada como quercetina anidra para avaliação da precisão intradia do método quantitativo de CLAE, n = 3.

Nível	Média ± DP (CV %)			
	Quercetina-3-sulfato	Quercetina-5-O-β-glicopiranosídeo	Quercetina-3-O-α-arabinofuranosídeo	Quercetina
10 mg	0,555 ± 0,012 ^a (2,23)	0,390 ± 0,001 ^b (0,18)	0,229 ± 0,001 ^c (0,38)	0,083 ± 0,0014 ^d (1,71)
15 mg	0,553 ± 0,011 ^a (1,97)	0,386 ± 0,008 ^b (2,05)	0,224 ± 0,004 ^c (1,92)	0,0885 ± 0,0019 ^d (2,14)
20 mg	0,573 ± 0,01 ^a (1,73)	0,403 ± 0,002 ^b (0,46)	0,232 ± 0,001 ^c (0,48)	0,0895 ± 0,0014 ^d (1,55)

Nota: letras iguais indicam resultados equivalentes.

Os resultados das concentrações de cada flavonoide foram comparados por ANOVA, sendo constatada a igualdade estatística entre os mesmos ($p \geq 0,05$), o que mostra a precisão do método em três níveis de concentração.

Os valores de coeficiente de variação determinados encontram-se abaixo de 5%, indicando que a precisão intradia do método é adequada (BRASIL, 2003). Ademais, os resultados das concentrações de cada flavonoide foram comparados por ANOVA, sendo constatada a igualdade estatística entre os mesmos ($p \geq 0,05$), o que indica a precisão do

método em três níveis de concentração. Considerando que se trata de método por CLAE a precisão poderia ser ainda maior.

Precisão interdia

Os resultados das análises realizada, com cerca de 15 mg de extrato bruto, em dois dias diferentes encontram-se na **Tabela 49**. Ou seja, o ensaio foi realizado para um único nível de concentração conforme estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2003) e ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005).

Tabela 49: Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) da concentração (porcentagem m/m) de cada flavonoide no extrato bruto de *C. carthagenensis* calculada como quercetina anidra para avaliação da precisão interdia do método quantitativo de CLAE, n = 3.

Dia	Média ± DP (CV %)			
	Quercetina-3-sulfato	Quercetina-5-O-β-glucosídeo	Quercetina-3-O-α-arabinofuranosídeo	Quercetina
1	0,505 ± 0,016 (3,10) ^a	0,377 ± 0,013 (3,42) ^b	0,219 ± 0,008 (3,61) ^c	0,0853 ± 0,0038 (4,50) ^d
2	0,518 ± 0,008 (1,55) ^a	0,364 ± 0,004 (1,00) ^b	0,207 ± 0,002 (0,84) ^c	0,0770 ± 0,0011 (1,45) ^e

Nota: letras iguais indicam resultados equivalentes.

Através de teste t de Student verificou-se que os teores dos marcadores quantificados não apresentaram diferenças significativas nos dois dias de análise ($p > 0,05$), com exceção dos resultados para quercetina, cujos picos apresentaram as menores áreas. Portanto, o método não se mostrou preciso para a quercetina. Essa diferença talvez aconteça em função do solvente empregado, o metanol, solubilizar melhor os flavonoides glicosilados que a quercetina.

Como alterações futuras no método para melhorar esse resultado sugere-se (1) aumento na tomada da amostra, o que poderia resultar em problemas de solubilidade, (2) alteração no solvente, o que poderia levar a necessidade de se alterar a condição cromatográfica, (3) deixar de quantificar a quercetina e apenas estabelecer um limite máximo para este metabólito, considerando que se trata do produto de degradação dos flavonoides isolados.

5.7.1.4 Diferentes formas de cálculo do teor de flavonoides

Os resultados obtidos no dia 2 do ensaio de precisão interdia (**Tabela 49**) para quercetina-3-sulfato (CC1) e quercetina-5-O-arabinofuranosídeo (CC4) foram recalculados

das seguintes formas: (1) a partir das curvas analíticas específicas para cada analito; (2) a partir das curvas analíticas da quercetina corrigindo-se o resultado de acordo com a massa molecular do analito (**Tabela 50**).

Tabela 50: Comparação entre os teores de flavonoides quantificados por CLAE, obtidos a partir de diferentes formas de cálculo.

Substância de referência	Cálculo pela curva específica	Cálculo com correção conforme massa molecular	Cálculo pela curva de quercetina
Quercetina-3-sulfato	0,852 ± 0,013 ^a	0,656 ± 0,01 ^b	0,518 ± 0,008 ^c
Quercetina-3-O-arabinofuranosídeo	0,263 ± 0,002 ^a	0,297 ± 0,003 ^b	0,207 ± 0,002 ^c

Nota: Letras distintas na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Os resultados apresentados na **Tabela 50** mostram que o cálculo do teor de cada flavonoide com base na curva analítica da quercetina, mesmo após correção pela massa molecular do composto analisado, foi diferente daquele obtido empregando-se curva analítica específica para cada substância. Essa variação é decorrente de diferenças na absorvidade molar das substâncias.

Gray e colaboradores (2006) compararam dois métodos para quantificação de flavonoides em *Ginkgo biloba*, a fim de selecionar aquele mais adequado como método farmacopeico. Ambos envolveram hidrólise e cálculo do teor de flavonoides com base na concentração das agliconas quercetina, canferol e isoramnetina, mas diferiam quanto a forma de cálculo e condições de reação. Um deles estabelece cálculo da concentração de cada glicosídeo com base no teor da aglicona, empregando-se fator de correção, a partir da massa molecular; o outro método considera apenas um fator de correção para todos os glicosídeos, com base em média da massa molecular, além de usar apenas a quercetina como substância de referência. O método mais exato, em relação a forma de cálculo, é o primeiro, pois considera a absorção de cada aglicona. Tal método apresenta também como vantagem o modo mais simples de preparo da amostra.

Uma proposta futura para aprimorar o método seria avaliar a possibilidade de se empregar fator de resposta, conforme estabelecido pelo FDA (1994), por exemplo, para análise de impurezas para as quais não existem padrões de referência.

Pereira e colaboradores (2004) usaram a correção pelo fator de resposta. Os autores usaram rutina como padrão externo em método que apresentou níveis aceitáveis de precisão e exatidão. O uso da rutina como padrão não apresentou diferenças significativas em relação ao uso dos flavonoides orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina. Tal fato é de

grande importância, uma vez que os padrões das espécies de *Passiflora* tem custo elevado.

5.7.1.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir de estudo de recuperação. Os percentuais de recuperação foram calculados para os flavonoides expressos como quercetina anidra (**Tabela 51**). Não foi calculada a recuperação para a quercetina-5-O- β -glicopiranosídeo por não ter sido isolada massa suficiente deste flavonoide para os experimentos. Os valores basais, correspondentes ao extrato sem adição de marcadores químicos, são aqueles que constam na **Tabela 49**. Tanto o ICH quanto a ANVISA preconizam que a exatidão seja determinada em três concentrações; no entanto, foi adicionada apenas uma concentração de cada analito, em função da pequena disponibilidade de massa.

Tabela 51: Resultados do ensaio de recuperação do método para quantificação de flavonoides por CLAE em *C. carthagenensis*, calculados como quercetina

Analito	Média \pm DP	CV (%)
Quercetina-3-sulfato	143,9 \pm 3,1	2,2
Quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo	124,7 \pm 0,9	0,8
Quercetina	90,8 \pm 2,7	3

Foram obtidos valores inadequados de recuperação para a quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo e para a quercetina-3-sulfato, conforme esperado, em função das diferenças entre as curvas analíticas para cada flavonoide.

Assim, a fim de avaliar se os valores de recuperação obtidos se devem à forma de cálculo ou a outro aspecto do método, os cálculos foram refeitos com base nas curvas analíticas específicas para a quercetina-3-sulfato e quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo (**Tabela 52**).

Foram obtidos percentuais de recuperação no intervalo 90 a 111 % (**Tabela 52**) para os dois flavonoides avaliados indicam exatidão do método quando se utiliza para cálculo as equações referentes às curvas analíticas para cada flavonoide. De acordo com a ANVISA são aceitas variações de até 15% de recuperação (BRASIL, 2003). Considerando que se trata de método de quantificação por CLAE poderiam ser obtidos melhores resultados, conforme descrito no item anterior.

Tabela 52: Resultados de recuperação para o método de quantificação de flavonoides por CLAE em extrato bruto de *Cuphea carthagenensis*, n = 3, calculados a partir da equação obtida por meio da curva analítica de cada flavonoide.

Analito	Média ± DP	CV (%)
Quercetina-3-sulfato	111,0 ± 3,7	3,3
Quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo	103,2 ± 0,8	0,8
Quercetina	90,8 ± 2,7	3

O método de adição de substância de referência foi escolhido para avaliar a exatidão devido a impossibilidade de se utilizar outras estratégias. As opções seriam comparar os resultados obtidos com aqueles de outro método já validado (BRASIL, 2003a; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005), o que, de acordo com a pesquisa bibliográfica realizada, não existe; ou aplicar o método desenvolvido a extrato com concentração conhecida dos analitos (BRASIL, 2003a INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005), o que também não é possível pelo motivo citado anteriormente e por não ser viável se conseguir a matriz sem o analito a fim de adicionar quantidades conhecidas do mesmo.

5.7.1.6 Análise dos extratos e frações

Os extratos e frações de *C. carthagenensis* foram analisados pelo método desenvolvido para doseamento de flavonoides por CLAE. A tomada de amostra foi diferenciada para os extratos e frações, com base no teor de flavonoides determinado pelo método espectrofotométrico (5.2.1.3). Foram pesados cerca de 20 mg das frações aquosas, 10 mg do precipitado, fração butanólica, extrato bruto e aquoso. Os resultados foram calculados como quercetina anidra (**Tabela 53**). Ou seja, com exceção do teor determinado para a quercetina, as demais concentrações apresentam erro devido às diferenças de absorvidade molar da substância de referência.

Os valores de coeficiente de variação em torno de 5% para o precipitado indicam a necessidade de melhorar a precisão do método para esta matriz. No caso do extrato aquoso, os valores elevados de CV estão relacionados a problema de solubilização, já que houve formação de precipitado durante o preparo da amostra. Os resultados obtidos indicam ser necessário realizar adaptação do método para o extrato aquoso.

Tabela 53: Teores percentuais médios (n = 3) de flavonoides totais seguidos dos valores de desvio padrão e coeficiente de variação (entre parêntesis), determinados nos extratos e frações de *C. carthagenensis*, calculados como quercetina anidra por CLAE.

Extrato e frações	Teor percentual de cada flavonoide			
	Quercetina-3-sulfato	Quercetina-5-O-β-glicopiranosídeo	Quercetina-3-O-α-arabinofuranosídeo	Quercetina
AQinsol.	0,399 ± 0,014 (3,52)	0,0132 ± 0,001 (1,44)	n.q.	n.q.
AQsol.	0,394 ± 0,011 (2,83)	0,0422 ± 0,0316 (1,85)	n.q.	n.q.
EB	0,553 ± 0,011 (1,97)	0,386 ± 0,008 (2,05)	0,224 ± 0,004 (1,92)	0,0885 ± 0,0019 (2,14)
EA	0,742 ± 0,148 (19,9)	0,101 ± 0,022 (21,8)	n.q.	n.q.
BU	1,61 ± 0,04 (2,5)	1,66 ± 0,03 (1,91)	0,225 ± 0,005 (2,36)	2,22 ± 0,02 (0,78)
ppt	6,14 ± 0,31 (5,06)	0,503 ± 0,019 (3,68)	0,292 ± 0,013 (4,32)	0,179 ± 0,009 (5,12)

Nota: n.q., não quantificado, picos inexistentes.

Faz-se necessário também validação completa do método.

Como proposta de continuidade para este estudo propõe-se determinação dos valores de referência e avaliação da capacidade o método em diferenciar espécies de *Cuphea*.

A fim de garantir que o método desenvolvido seja capaz de diferenciar as diversas espécies de *Cuphea*, uma proposta futura de pesquisa seria a comparação entre *Cuphea* spp. que ocorrem no país: *Cuphea aperta* Koehne, *C. calophylla* Cham. & Schltdl., *C. carthagenensis* (Jacq.) MacBride, *C. circaeoides* Sm. ex Sims, *C. fuscinervis* Koehne, *C. micrantha* Kunth, *C. repens* Koehne, *C. tenuissima* Koehne.

Além disso, seria importante a aplicação do método desenvolvido em diversos espécimes de *C. carthagenensis* para determinação dos valores de referência para o teor de flavonoides na espécie. Poderiam ser feitas coletas sistemáticas em diversas regiões e biomas do país, já que a distribuição geográfica é ampla.

A estabilidade da droga vegetal também poderia ser avaliada a fim de ser estabelecido o prazo de validade.

5.7.2 Tentativa de desenvolvimento de método de CLAE para quantificação simultânea de ácido gálico, elágico e quercetina em extrato hidrolisado

Conforme descrito no item 5.2.4, no extrato bruto de *C. carthagenensis* foram detectados taninos, flavonoides e saponinas, aparentemente predominando os taninos hidrolisáveis.

5.7.2.1 Otimização das condições cromatográficas para separação dos ácidos gálico, elágico e quercetina

Os resultados preliminares (dados não mostrados), empregando-se como condições de análise aquelas otimizadas para o doseamento de flavonoides (Condição C, **Tabela 15**, p.71), indicaram a necessidade de aumentar o tempo de retenção do ácido gálico e a resolução entre os picos dos compostos de interesse. As principais condições avaliadas e as modificações introduzidas estão descritas brevemente a seguir. Buscou-se obter uma condição cromatográfica que resultasse em resolução superior a 1,5 para os picos de interesse, fator de cauda menor que 1,5 e corrida cromatográfica de até 20 min. Snyder (1997) sugere valores de resolução igual ou superiores a 1,5, preferencialmente 2,0, para determinações quantitativas. O FDA recomenda valores de fator de cauda menores que 2,0 (FDA, 1994).

A **Tabela 54** resume o processo de desenvolvimento das condições cromatográficas, que teve início com eluição em gradiente linear de ácido fosfórico 0,1% (A) e metanol (B), de 5% B a 45% B em 20 min (item 5.1.2).

Tabela 54: Resumo das modificações efetuadas durante o desenvolvimento das condições cromatográficas para quantificação dos ácidos gálico e elágico, e quercetina por CLAE.

Condição	Modificações realizadas		Objetivo
	% de MeOH	Tempo (min)	
2	2 – 6	6	Conhecer comportamento das substâncias isoladas.
	6 – 35	2	
	35 – 50	1	
3	2 – 6	6	Separar ácidos gálico e elágico, e quercetina em extrato hidrolisado.
	6 – 35	2	
	35 isocrático	5	
	35 – 50	15	
4	2 – 6	4	
	6 – 35	1	
	35 isocrático	4	
	35 - 50	15	

Condição 2

A proporção de 45% de metanol da condição 1 não foi suficientemente forte para resultar em eluição da quercetina no tempo de 20 min proposto para a corrida cromatográfica. Por isso, na condição número 2 a proporção final de metanol foi de 50%. Outro objetivo foi aumentar o tempo de retenção do ácido gálico através da diminuição na força de eluição no início da corrida.

Foi observada assimetria anterior para o pico correspondente ao ácido gálico; provavelmente a acidez do eluente não foi suficiente para manter todo o ácido gálico na forma não ionizada.

Condição 3

A partir deste ponto os experimentos foram realizados com o extrato bruto hidrolisado. Observou-se que, após procedimento de hidrólise, o pico correspondente ao ácido gálico apresentava-se simétrico, sendo este fato atribuído à acidez da solução injetada.

Inclusão de segmento isocrático na eluição resultou em melhor resolução do pico correspondente ao ácido elágico, mas ainda insuficiente. Nesta condição obteve-se resolução adequada para análise quantitativa apenas do ácido gálico e da quercetina.

Condição 4

Com a diminuição no tempo de cada segmento foi possível reduzir o tempo de análise obtendo-se resolução maior que 1,5 entre os picos de interesse.

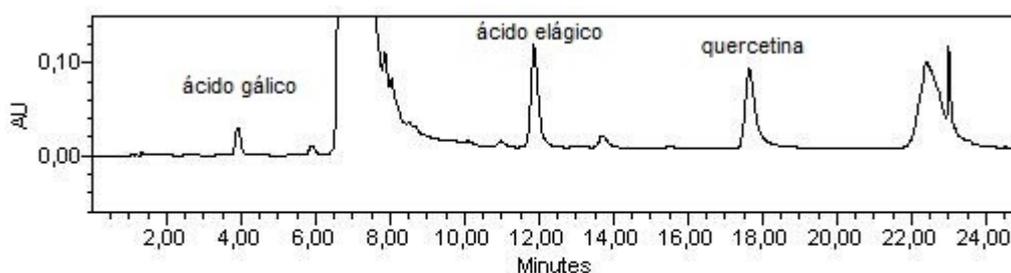


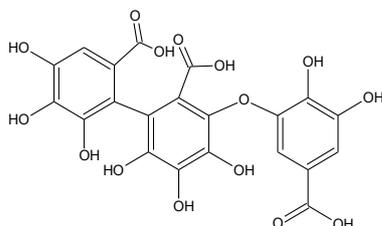
Figura 41: Cromatograma, obtido por CLAE, otimizado para análise de ácido gálico, ácido elágico e quercetina em extrato etanólico hidrolisado de *C. carthagenensis* Condições cromatográficas: condição 4 (Tabela 54 e item 4.8.3.1).

Para a condição selecionada foram atingidos os objetivos quanto a resolução, fator de cauda, pureza espectral e tempo de análise. Os parâmetros de avaliação da adequação das condições cromatográficas encontram-se na **Tabela 55**.

Tabela 55: Parâmetros de adequabilidade de sistema obtidos para quantificação por CLAE de ácido gálico, ácido elágico e quercetina em extrato hidrolisado de *C. carthagenensis*.

Parâmetro	Ácido gálico	Ácido elágico	Quercetina
Fator de retenção (k)	2,58	9,89	15,23
Resolução	12,06	2,67	5,17
Fator de cauda	1,06	1,31	1,45

A condição obtida foi adequada para separação dos ácidos gálico e elágico e da quercetina; no entanto, ao se comparar os cromatogramas obtidos após injeção de cada substância de referência separadamente, antes e após hidrólise, observou-se a presença de um derivado do ácido gálico. Ou seja, o ácido gálico sofre transformação no meio empregado para a hidrólise. Possivelmente o derivado formado é o galato de metila, pois o emprego de metanol como solvente favorece a ocorrência de reações de esterificação. Vrhovsek e colaboradores (2006) obtiveram, após hidrólise ácida em metanol de extratos de espécies de amora, ácido elágico e galato de metila. Mertz e colaboradores (2007) detectaram a ocorrência, em espécies de amora, tanto de ácido sanguisórbico (**57**) quanto de sanguisorbato de metila, e a concentração total dos produtos se manteve aproximadamente constante após a hidrólise.



57

Portanto, fez-se necessário desenvolver uma nova condição cromatográfica para obter resolução adequada para o pico correspondente ao derivado formado.

Como condição inicial foi obtido o cromatograma apresentado na **Figura 42**, onde encontram-se identificados os picos de interesse.

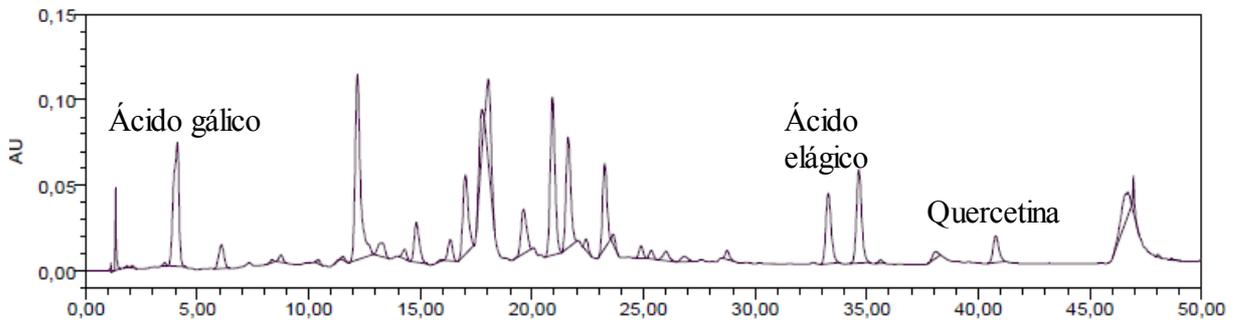


Figura 42: Cromatograma, obtido por CLAE, para extrato hidrolisado. Condições cromatográficas: eluição em gradiente de 2 a 46% de metanol em ácido fosfórico a 0,1%, fluxo 1,0 ml/min, coluna ODS, temperatura de 40 °C, detecção no UV em $\lambda = 271$ nm.

Foram feitas modificações no perfil da eluição (inclinação do gradiente, uso de gradiente segmentado, tempo de corrida), visando obter resolução e seletividade adequadas para os picos de interesse, de modo semelhante aos procedimentos descritos anteriormente para otimização de condições cromatográficas do método de quantificação de flavonoides.

Diversas tentativas de diminuir o tempo de eluição resultaram em resolução e pureza espectral inadequadas para os dois primeiros picos, e sobreposição de picos, mas foi possível otimizar a condição cromatográfica mantendo apenas três segmentos. Portanto a condição cromatográfica otimizada inclui: eluição em gradiente de água contendo 0,1% de ácido fosfórico (A) e metanol (B): 0 min, 2% B; 15 min, 12% B; 16 min, 22% B; 38 min, 44% B; coluna de ODS; fluxo de 1 ml/min, temperatura 40 °C e foram atingidos os objetivos quanto aos parâmetros de adequabilidade do sistema (Figura 43 e Tabela 56).

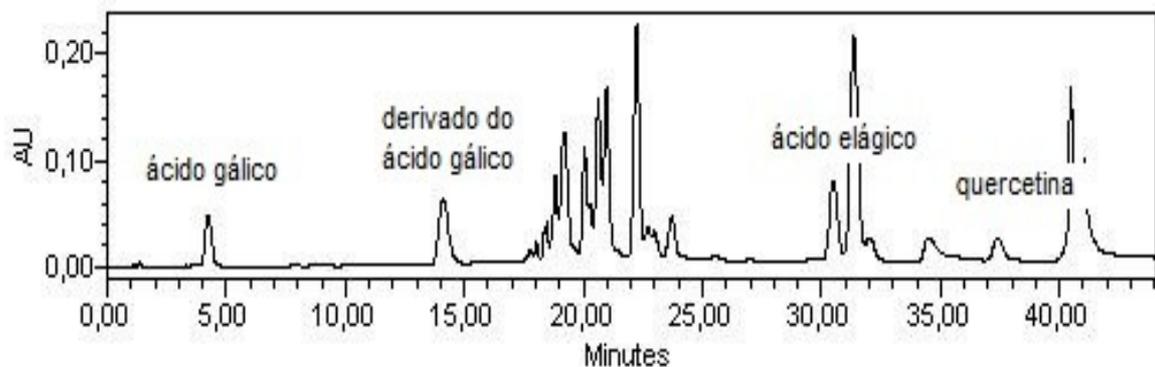


Figura 43: Cromatograma otimizado para análise de ácido gálico e seu derivado, ácido elágico e quercetina em extrato bruto etanólico de *C. carthagenensis*.

Tabela 56: Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos para quantificação por CLAE de ácido gálico, galato de metila (derivado do ácido gálico), ácido elágico e quercetina em extrato hidrolisado de *Cuphea carthagenensis*.

Parâmetro	Ácido gálico	Derivado do ácido gálico	Ácido elágico	Quercetina
Resolução	9,65	15,83	1,5	3,6
Fator de cauda	1,07	1,20	1,00	1,08

Quanto ao comprimento de onda de detecção foram obtidos cromatogramas em $\lambda = 271$ e 254 nm, que correspondem, respectivamente, às absorções máximas do ácido gálico e seu derivado (271 nm) e do ácido elágico e quercetina (254 nm). Como as menores áreas dos picos são obtidas para a quercetina, o comprimento de onda de 254 nm foi selecionado para o método, já que não foi constatada diferença quanto a precisão e pureza espectral.

5.7.2.2 Avaliação das condições de hidrólise de flavonoides e taninos no extrato bruto

A fim de otimizar as condições de hidrólise do extrato bruto, visando obter teores máximos de quercetina e dos ácidos gálico e elágico, foram avaliadas as variáveis concentração da solução de ácido clorídrico (2 e 4 M) e tempo de hidrólise (15, 30, 60 e 90 min). Os resultados foram analisados a partir das áreas dos picos correspondentes aos produtos de hidrólise, corrigidos em função da massa de extrato bruto pesada inicialmente. Os resultados obtidos para os ácidos gálico, elágico e quercetina encontram-se nas Tabelas 57, 58 e 59, respectivamente. A condição cromatográfica 4 (Tabela 19, página 76) foi empregada nas análises, já que neste ponto da pesquisa não se tinha conhecimento da formação do derivado do ácido gálico.

Tabela 57: Áreas dos picos correspondentes ao ácido gálico nos cromatogramas obtidos por CLAE para o extrato bruto hidrolisado de *C. carthagenensis*, seguido do desvio padrão e coeficiente de variação (%), $n = 3$.

Concentração de HCl	Tempo de hidrólise em min			
	15	30	60	90
2 M	$0,494820 \pm 0,021180$ (4,28)	$0,680741 \pm 0,038893$ (5,71)	$0,975219 \pm 0,023097$ (2,37)	$1,245349 \pm 0,045105$ (3,62)
4 M	$0,780687 \pm 0,015152$ (1,94)	$1,175291 \pm 0,050509$ (4,30)	$1,619612 \pm 0,011257$ (0,70)	$2,028488 \pm 0,021422$ (1,06)

Tabela 58: Áreas dos picos correspondentes ao ácido elágico nos cromatogramas obtidos por CLAE para o extrato bruto hidrolisado de *C. carthagenensis*, seguido do desvio padrão e coeficiente de variação (%), n = 3.

Concentração de HCl	Tempo de hidrólise em min			
	15	30	60	90
2 M	0,870954 ± 0,028953 (3,32)	1,353558 ± 0,102412 (7,57)	2,300849 ± 0,049329 (2,14)	3,291345 ± 0,121774 (3,70)
4 M	1,567191 ± 0,078536 (5,01)	3,038350 ± 0,211885 (6,97)	4,857482 ± 0,20513 (0,42)	6,534414 ± 0,087882 (1,34)

Tabela 59: Áreas dos picos correspondente à quercetina nos cromatogramas obtidos por CLAE para o extrato bruto hidrolisado de *C. carthagenensis*, seguido do desvio padrão e coeficiente de variação (%), n = 3.

Concentração de HCl	Tempo de hidrólise em min			
	15	30	60	90
2 M	2,178809 ± 0,050390 (2,31)	2,159890 ± 0,003973 (0,18)	2,073604 ± 0,019085 (0,92)	1,976292 ± 0,036947 (1,87)
4 M	2,023468 ± 0,104731 (5,18)	1,845318 ± 0,035814 (1,94)	1,719030 ± 0,021171 (1,23)	1,505067 ± 0,020846 (1,32)

Tempo de hidrólise de 15 e 30 min e concentração do ácido clorídrico de 2 M produziu as maiores áreas do pico para a quercetina, sendo necessárias condições mais drásticas para os ácidos gálico e elágico: 90 min e solução de HCl 4 M. Mertens-Talcott, Talcott e Percival (2003) ao quantificar ácido elágico e quercetina em uvas empregaram concentrações diferentes de ácido clorídrico para a hidrólise de cada substância, respectivamente 2 M e 0,5 M. No presente trabalho optou-se por desenvolver o método com uma única condição de hidrólise para as três substâncias, a fim de facilitar sua execução.

Assim, manteve-se a concentração do ácido clorídrico em 4 M e foram avaliados os tempos de hidrólise de 90, 120 e 150 min (**Tabela 60**).

Observou-se um aumento nos valores das áreas dos picos correspondentes aos ácidos gálico e elágico no maior intervalo de tempo avaliado, sendo, portanto, necessário otimizar as condições de hidrólise. Por outro lado, apesar de não se observar diferença estatisticamente significativa, os valores absolutos das áreas dos picos da quercetina reduziram nos tempos avaliados, assim como no experimento anterior, sugerindo uma possível degradação da quercetina. Merken e colaboradores (2000) relataram a degradação do flavonoide miricetina com hidrólise, resultando em recuperação de apenas 70%.

Tabela 60: Área dos picos nos cromatogramas obtidos por CLAE correspondentes ao extrato bruto submetido à hidrólise com HCl 4M, seguida do desvio padrão e coeficiente de variação (%), n = 3.

Substância	Tempo de hidrólise em min		
	90	120	150
Ácido gálico	1,960484 ± 0,057171 (2,92) ^a	2,146631 ± 0,126753 (5,90) ^a	2,487529 ± 0,092132 (3,70) ^b
Ácido elágico	6,089747 ± 0,067629 (1,11) ^a	7,024900 ± 0,477680 (6,80) ^a	8,509089 ± 0,240601 (2,83) ^b
Quercetina	1,468234 ± 0,059269 (4,04) ^a	1,317054 ± 0,087341 (6,63) ^a	1,322424 ± 0,036175 (2,74) ^a

Nota: Letras diferentes na mesma linha indicam grupos significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) após análise por ANOVA one-way seguido de teste de Tukey.

A seguir foram avaliados os tempos de hidrólise de 6 e 8 h, em comparação com os 150 min do experimento anterior. Essas análises foram realizadas com condições de análise por CLAE distintas das anteriores, visto que também foi determinada a área do pico correspondente ao derivado do ácido gálico, possivelmente o galato de metila, formado durante e hidrólise (**Tabela 61**).

Tabela 61: Áreas dos picos de interesse nos cromatogramas, obtidos por CLAE, após hidrólise do extrato bruto de *C. carthagenensis* com ácido clorídrico 4 M, seguidas dos desvios padrão e coeficientes de variação (%), n = 3.

Substância	Tempo de hidrólise em horas		
	2,5	6	8
Ácido gálico	2,19 ± 0,04 (1,74) ^a	3,05 ± 0,25 (8,31) ^b	3,65 ± 0,075 (2,05) ^c
Galato de metila	4,48 ± 0,10 (2,26) ^a	5,96 ± 0,21 (3,55) ^b	6,60 ± 0,15 (2,24) ^c
Ácido elágico	3,57 ± 0,05 (1,44) ^a	3,67 ± 0,07 (1,79) ^{a,b}	3,78 ± 0,05 (1,2) ^b
Quercetina	1,74 ± 0,01 (0,37) ^a	1,44 ± 0,02 (1,44) ^b	1,27 ± 0,05 (3,93) ^c

Nota: Letras diferentes na mesma linha indicam grupos significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) após análise por ANOVA one-way seguido de teste de Tukey.

Tendo em vista as diferenças significativas das áreas dos picos correspondentes ao ácido gálico e ao galato de metila, para os tempos de 6 e 8 h, realizaram-se novos experimentos de hidrólise variando a duração da reação (10 h) e a concentração do ácido clorídrico (8 M).

Nas **Tabelas 62 a 65** estão dispostos os resultados obtidos após 8 e 10 h de hidrólise utilizando HCl 4 M e após 6 e 8 h de reação com HCl 8 M. As corridas cromatográficas foram repetidas após um dia, a fim de avaliar a estabilidade das mesmas, já que na solução injetada permanece o meio ácido, que pode resultar tanto em aumento no teor dos produtos de hidrólise quanto em sua degradação.

Tabela 62: Áreas dos picos correspondentes ao ácido gálico em cromatogramas, obtidos por CLAE, com detecção em $\lambda = 271$ nm, para extrato de *C. carthagenensis* submetido a diferentes condições de hidrólise, com repetição da corrida cromatográfica após um dia.

Replicatas	Área do pico ($\times 10^6$)							
	HCl 4 M				HCl 8 M			
	8 h		10 h		6 h		8 h	
1	2,12	2,10	1,88	1,87	2,17	2,16	2,29	2,26
2	1,88	1,81	1,90	1,90	2,09	2,05	2,04	2,02
3	1,66	1,62	1,75	1,76	1,92	1,92	2,27	2,24
Média	1,89 ^a	1,85 ^a	1,84 ^a	1,84 ^a	2,06 ^a	2,04 ^a	2,20 ^a	2,17 ^a
DP	0,23	0,24	0,08	0,06	0,13	0,12	0,14	0,13
CV (%)	12,00	13,10	4,00	4,10	6,00	6,00	6,00	6,00

Nota: Letras iguais na mesma linha indicam grupos significativamente equivalente ($\alpha = 0,05$) após análise por ANOVA one-way seguido de teste de Tukey.

Tabela 63: Áreas dos picos correspondentes ao derivado do ácido gálico em cromatogramas, obtidos por CLAE, para extrato de *C. carthagenensis* com detecção em $\lambda = 271$ nm, submetido a diferentes condições de hidrólise, com repetição da corrida cromatográfica após um dia.

Replicatas	Área do pico ($\times 10^6$)							
	HCl 4 M				HCl 8 M			
	8 h		10 h		6 h		8 h	
1	3,40	3,42	3,60	3,62	3,85	3,91	3,98	4,01
2	3,37	3,29	3,50	3,56	4,01	4,04	4,18	4,24
3	3,33	3,32	3,52	3,58	3,94	4,05	3,83	3,85
Média	3,37 ^a	3,34 ^a	3,54 ^a	3,59 ^a	3,94 ^b	4,00 ^b	4,00 ^b	4,03 ^b
DP	0,04	0,06	0,06	0,03	0,08	0,08	0,18	0,20
CV (%)	1,23	1,94	1,61	0,95	2,08	1,90	4,40	4,84

Nota: Letras iguais na mesma linha indicam grupos significativamente equivalente ($\alpha = 0,05$) após análise por ANOVA one-way seguido de teste de Tukey.

Tabela 64: Áreas dos picos correspondentes ao ácido elágico em cromatogramas, obtidos por CLAE, com detecção em $\lambda = 254$ nm, para extrato de *C. carthagenensis* submetido a diferentes condições de hidrólise, com repetição da corrida cromatográfica após um dia.

Replicatas	Área do pico ($\times 10^6$)							
	HCl 4 M				HCl 8 M			
	8 h		10 h		6 h		8 h	
1	1,95	1,95	1,96	1,98	1,89	1,68	1,92	1,91
2	1,95	1,90	1,92	1,94	1,90	1,90	1,93	1,94
3	1,94	1,92	1,90	1,93	1,89	1,90	1,86	1,85
Média	1,95 ^a	1,92 ^a	1,93 ^a	1,95 ^a	1,89 ^a	1,82 ^a	1,90 ^a	1,90 ^a
DP	0,07	0,03	0,03	0,02	0,02	0,13	0,04	0,04
CV (%)	0,38	1,36	1,68	1,18	0,90	7,00	2,02	2,28

Nota: Letras iguais na mesma linha indicam grupos significativamente equivalente ($\alpha = 0,05$) após análise por ANOVA one-way seguido de teste de Tukey.

Tabela 65: Áreas dos picos correspondentes a quercetina em cromatogramas obtidos por CLAE, com detecção em $\lambda = 254$ nm, para extrato de *C. carthagenensis* submetido a diferentes condições de hidrólise, com repetição da corrida cromatográfica após um dia.

Replicatas	Área do pico ($\times 10^6$)							
	HCl 4 M				HCl 8 M			
	8 h		10 h		6 h		8 h	
1	0,531	0,525	0,488	0,491	0,341	0,298	0,329	0,331
2	0,580	0,568	0,444	0,445	0,382	0,384		
3	0,578	0,572	0,527	0,529	0,391	0,402	0,301	0,304
Média	0,563 ^a	0,555 ^a	0,487 ^a	0,488 ^a	0,372 ^b	0,361 ^b	0,315 ^b	0,317 ^b
DP	0,028	0,026	0,042	0,042	0,027	0,056	0,020	0,019
CV (%)	4,94	4,68	8,55	8,57	7,27	15,4	6,37	5,98

Nota: Letras iguais na mesma linha indicam grupos significativamente equivalente ($\alpha = 0,05$) após análise por ANOVA one-way seguido de teste de Tukey.

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as áreas dos picos referentes ao ácido gálico, galato de metila, ácido elágico e quercetina para 8 e 10 h de hidrólise com HCl 4 M. No entanto, os valores de coeficiente de variação foram elevados para quercetina (4,68 a 8,57%) e ácido gálico (4 a 13%), ao contrário do galato de metila (CV entre 0,95 e 2,08), derivado do ácido gálico formado durante a hidrólise. Como alternativa, poder-se-ia quantificar o derivado ao invés do ácido gálico. Quanto a quercetina, os valores de CV obtidos sugerem que talvez não seja possível manter a quantificação

simultânea desse metabólito com os ácidos.

O aumento na concentração do ácido forneceu resultados ainda menos adequados de precisão para a quercetina (**Tabela 65**). Além disso, os valores das áreas dos picos foram inferiores àqueles obtidos com HCl 4 M (ANOVA, $p < 0,05$), sugerindo degradação da quercetina.

Para o derivado do ácido gálico, o uso de maior concentração de HCl, no caso 8 M, resultou em maiores áreas dos picos, indicando possível deslocamento do equilíbrio químico no sentido de formação do produto.

Um dos problemas detectados para o método em desenvolvimento foi o alto valor dos coeficientes de variação obtidos, que indicam falta de precisão. A fim de superar esta deficiência, avaliou-se o uso de outro recipiente para realizar a reação de hidrólise: trocou-se o tubo plástico do tipo falcon para frasco de vidro com batoque e tampa. A hidrólise foi realizada com HCl 4 M, durante 8 h, condição definida a partir dos resultados anteriores. Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 66**.

Tabela 66: Áreas dos picos nos cromatogramas obtidos por CLAE, com detecção em $\lambda = 271$ nm, para o extrato de *C. carthagenensis* submetido a hidrólise (ácido clorídrico 4 M, durante 8 h), em tubo de vidro com batoque e tampa.

Repetição	Área do pico ($\times 10^6$)			
	Ácido gálico	Galato de metila	Ácido elágico	Quercetina
1	2,23	3,58	0,830	0,454
2	2,19	3,38	0,770	0,399
3	2,42	3,46	0,820	0,430
4	1,76	3,3	0,740	0,403
5	1,95	3,63	0,790	0,325
Média	2,11	3,33	0,790	0,400
DP	0,25	0,23	0,004	0,050
CV (%)	12,03	7,03	4,700	12,090

As análises foram realizadas com seis repetições, no entanto, um dos tubos teve seu conteúdo perdido por aumento excessivo da pressão no interior do mesmo. Portanto, o tubo de vidro não se mostrou seguro para realizar a hidrólise. Além disso, como pode ser observado pelos valores de coeficiente de variação obtidos (**Tabela 66**), a precisão não é adequada, provavelmente em função das diferenças de pressão em cada um dos tubos, o que resulta em diferentes condições reacionais. Observou-se, também, a evaporação de volumes diferentes do solvente nos tubos, entre 0,3 e 0,6 ml, o que também demonstra a

desigualdade de condições entre as repetições.

Desse modo, tanto o tubo do tipo falcon quanto o tubo de vidro com batoque e tampa mostraram-se inadequados para a reação em questão. Uma alternativa seria realizar a hidrólise com tubo selado conforme descrito por Mattila e Kumpulainen (2002) para análise de ácidos fenólicos em diversos frutos comestíveis. O aumento na pressão do meio reacional poderia, neste caso, permitir a diminuição no tempo de reação, já que a mesma aconteceria em temperatura mais elevada.

Outra estratégia avaliada no presente trabalho para aumentar a precisão do método foi determinar o coeficiente de variação resultante da soma das áreas dos picos correspondentes ao ácido gálico e galato de metila. Obteve-se um coeficiente de variação de 26%, ainda pior que os resultados anteriores. Portanto, não é possível melhorar a precisão do método através da análise do ácido gálico pela soma das áreas dos picos correspondentes a substância original (ácido gálico) e seu derivado (galato de metila).

Quanto aos flavonoides, alguns trabalhos descritos na literatura adotam uma abordagem semelhante para a análise de flavonoides em extratos hidrolisados, podendo-se citar, a título de exemplo, os relatos de Olsen, Aaby e Borge (2009) e de Olszewaka e colaboradores (2008) que testaram diferentes métodos de extração, tipos de solvente, relação droga / solvente extrator, duração da extração e métodos de hidrólise. Os primeiros autores quantificaram diversos flavonoides, incluindo canferol-3-O-sinapoil-glicosídeo-7-O-diglicosídeo e quercetina-3-O-sinapoil-glicosídeo-7-O-diglicosídeo, tanto na sua forma original usando rutina como substância de referência, quanto após hidrólise usando as agliconas canferol e quercetina como substâncias de referência. As análises foram realizados em *Brassica oleracea* ssp. *oleracea*, uma subespécie de couve. Foi empregado HCl 2 M, e a hidrólise foi realizada em frasco selado em banho-maria, por 60 min. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que condição semelhante a esta foi adequada, nos experimentos iniciais (**Tabela 59**), para quantificação de quercetina em *C. carthagenensis*.

Olszewaka e colaboradores (2008) quantificaram quercetina, sexangularetina, canferol e isoramnetina em três espécies de *Sorbus*, cujos extratos foram submetidos à hidrólise. O material vegetal foi desengordurado com clorofórmio, sendo em seguida aquecido sob refluxo por 1 hora com ácido clorídrico a 25% e metanol.

Diversos autores recomendam a hidrólise prévia do extrato para análise de agliconas de flavonoides resultantes, devido a dificuldade na obtenção de substâncias de referência, conforme discutido no item 5.7.1.2. Após a hidrólise, os materiais vegetais podem ser padronizados quanto ao teor de agliconas, o que reduz o número de substâncias de

referência necessárias nas análises (KELM; HAMMERSTONE; SCHMITZ, 2005; RIJKE et al., 2006; OLSZEWSKA, 2007; OLSZEWSKA, 2008) e, conseqüentemente, o custo já que as agliconas geralmente são mais acessíveis. Um exemplo é a quantificação de agliconas em *Ginkgo biloba* conforme preconizado pela Farmacopeia Europeia (EUROPEAN Pharmacopoeia, 2005c). Segundo o método, após hidrólise para obtenção das agliconas, as áreas dos picos de interesse são somadas, sendo todas expressas em quercetina. Portanto, neste caso, apenas quercetina é usada como substância de referência.

Quanto a análise de taninos hidrolisáveis, Mertz e colaboradores (2007) analisaram, por CLAE-EM (espectrometria de massas), ácido elágico obtido após hidrólise ácida de amora preta (*Rubus glaucus* e *Rubus adenotrichus*). A hidrólise foi realizada em metanol e HCl 4 M, em banho-de-óleo a 100 °C, sendo monitorada em cada hora, até 6 h após o início da reação. Segundo os autores, a liberação de ácido elágico manteve-se constante após 5 h de reação. De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, para análise de ácido elágico não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos com 6 e 8 h, para a concentração de HCl de 4 M.

Vrhovsek e colaboradores (2006) avaliaram a concentração de HCl (1,2; 2 e 4 M) e o tempo de reação (1, 2, 4, 6 e 20 h) mais adequados para hidrólise de ácido elágico em extratos de espécies de amora. Com o HCl 4 M a concentração de ácido elágico permaneceu constante após 6 h de reação; para o sanguisorboato de metila foram necessárias 4 h e para o galato de metila apenas 1 hora. Tais resultados para o ácido gálico diferem dos resultados obtidos para *C. carthagenensis*, já que não se conseguiu estabilizar a concentração deste composto.

Outro método aplicado a 0,5 g de diversos frutos foi hidrólise em meio contendo 10 ml de água, 20 ml de metanol, 5 ml de HCl concentrado, durante 20 h, a 85 °C, sendo o volume completado com metanol até 50 ml (MATTILA; KUMPULAINEN, 2002). Vasco e colaboradores (2009) efetuaram determinação de elagitaninos e derivados de ácido elágico através de método praticamente igual, mas com acidificação até pH 0,6 do meio reacional. No entanto, considera-se o tempo de hidrólise empregado pelos autores (20 h) excessivamente longo para análise rotineira, em controle de qualidade.

Não foi possível chegar a uma condição de hidrólise adequada para a quantificação simultânea de ácido gálico, ácido elágico e quercetina em extrato bruto de *C. carthagenensis*, pois para cada substância uma condição diferenciada foi definida. Porém, as possibilidades de otimização das condições não foram esgotadas. Formas de se dar continuidade ao desenvolvimento deste método seriam: estudar o equilíbrio químico estabelecido entre o ácido gálico e o seu derivado, estudar a influência do uso de recipiente

vedado na precisão do método, tentar efetuar também doseamento de proantocianidinas entre outros.

Quercetina e os ácidos gálico e elágico fazem parte da composição de muitas espécies alimentícias, e são farmacologicamente ativos. Seria desejável realizar estudos interdisciplinares que relacionem alimentos funcionais e fitoterapia, já que espécies vegetais de ambas as categorias podem contribuir para a melhoria no estado de saúde, especialmente os alimentos por uma questão de segurança.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maior parte dos estudos sobre atividade farmacológica não inclui informações sobre composição química quantitativa dos potenciais marcadores químicos. Considerando as variações na composição química de extratos vegetais e o potencial reflexo destas variações na atividade terapêutica faz-se necessário conhecer o perfil qualitativo e quantitativo dos mesmos. Neste sentido, o presente estudo contribui para o conhecimento a respeito da espécie *Cuphea carthagenensis* de uma forma mais abrangente, inclusive aplicando a correlação como métodos estatístico destinado a testar existência de relação entre composição química quantitativa e atividade farmacológica.

Além disso, foram realizados, além dos estudos *in vitro*, foram iniciados estudos *in vivo*, sendo que ambos mostraram que não existe vantagem no fracionamento, ou seja, o extrato bruto apresenta atividade máxima, considerando o conjunto de resultados obtidos. Para a quercetina-3-arabinofuranose foi possível desenvolver método de isolamento que envolver apenas partição do extrato etanólico e uma corrida cromatográfica.

O isolamento de flavonoides incluiu comparação entre diferentes métodos para o isolamento de quercetina-3-sulfato resultando em melhor rendimento e rapidez no processo.

Outro aspecto inovador deste estudo é propor dois métodos para quantificação de metabólitos secundários considerando o custo elevado das substâncias de referências. Sendo que, para o método para quantificação de flavonoides por CLAE foram avaliados diferentes formas de cálculo para os resultados.

Quanto ao método para quantificação de taninos hidrolisáveis e agliconas de flavonoides, foi possível conhecer o comportamento de tais metabólitos em reações de hidrólise avaliando-se diferentes variáveis: tempo, recipiente, concentração de ácido.

7 CONCLUSÃO

- a) O extrato etanólico bruto, a fração *n*-butanólica, o precipitado e a fração aquosa solúvel em metanol de *C. carthagenensis* foram igualmente ativos em ensaio *in vitro* de vasodilatação em anéis de aorta. Na mesma direção, o extrato bruto a fração *n*-butanólica apresentaram efeito hipotensor em camundongos, após administração oral. Esses dados indicam, de forma preliminar, que extratos e frações da espécie têm potencial uso medicinal, sendo necessário dar continuidade à avaliação de atividades farmacológicas relacionadas ao seu emprego em hipertensão.
- b) Quercetina-3-sulfato, um dos constituintes principais do extrato aquoso de *C. carthagenensis*, utilizado popularmente com finalidades medicinais, não apresenta atividade vasodilatadora *in vitro*.
- c) De acordo com os doseamentos espectrofotométricos realizados, taninos são os metabólitos secundários majoritários desta espécie, prevalecendo os hidrolisáveis.
- d) No extrato etanólico bruto de *C. carthagenensis* predominam constituintes com polaridade superior às agliconas de flavonoides. Presença de flavonoides foi confirmada por CCD e pelo isolamento dos flavonoides majoritários; de proantocianidinas por CCD e pelo doseamento espectrofotométrico; de taninos hidrolisáveis por CCD, pela diferença entre os resultados obtidos nos doseamentos espectrofotométricos e por CLAE após hidrólise do extrato, pela detecção dos ácidos gálico e elágico.
- e) Os resultados obtidos no doseamento espectrofotométrico de taninos totais em *C. carthagenensis* atestaram a validade de se utilizar polivinilpolipirrolidona como adsorvente, em substituição ao pó de pele.
- f) A atividade vasodilatadora *in vitro* de preparações de *C. carthagenensis* está relacionada aos teores de flavonoides, taninos e proantocianidinas totais, com valores de coeficiente de correlação decrescentes nesta ordem. Considera-se que estes grupos de metabólitos secundários são potenciais marcadores químicos para a espécie.
- g) Fazem parte da composição química de *C. carthagenensis* os flavonoides quercetina-3-sulfato, quercetina-5-O- β -glicopiranosídeo, quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo e quercetina, os três primeiros resultam em picos majoritários nos cromatogramas de preparações da espécie analisados por CLAE ($\lambda = 350$ nm). À exceção do primeiro, a ocorrência desses s é aqui apresentada pela primeira vez

para *C. carthagenensis*.

- h) O método de quantificação de flavonoides por CLAE desenvolvido apresentou precisão adequada para os glicosídeos e o flavonoide sulfatado. O método se mostrou exato para o cálculo dos teores a partir das curvas analíticas de cada substância; porém, não foi obtida exatidão satisfatória para os resultados expressos em quercetina.
- i) A hidrólise ácida do extrato bruto de *C. carthagenensis* revelou a quercetina como única aglicona de flavonóide detectada na espécie, além dos ácidos gálico e elágico como produtos dos taninos hidrolisáveis. São necessários maior tempo de reação e maior concentração de ácido clorídrico para a hidrólise completa dos taninos hidrolisáveis em relação às condições estabelecidas para obtenção de quercetina. As tentativas realizadas mostraram-se inadequadas para desenvolver um método preciso e robusto para análise simultânea dos ácidos elágico e gálico (produtos de hidrólise de taninos hidrolisáveis) e da quercetina (produto de hidrólise de flavonóides).

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T. DA S.; LIMA, A.; LIMA, M.V. Determinação de tanino em pedúnculo de cajú: método vanilina versus método butanol ácido. **Química nova**, v. 26, n. 5, p. 763-765, 2003.
- AGRAWAL, P.K. (ed.). **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier Science, 1989.
- AHENE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- AMORIN, D de S. **Fundamentos de sistemática filogenética**. Ribeirão Preto: Holos, 2002.
- ANDERSEN, Ø.M.; MARKHAM, K.R. (ed.) **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.
- ANDERSEN, M.L.; SKIBSTED, L.H. Modification of the levels of polyphenols in wort and beer by addition of hexamethylenetetramine or sulfite during mashing. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5232-5237, 2001.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; SINCERO, T.C.M.; SILVA, A.C. DA; SAVI, L.A.; GAIDO, C.M.; BETTEGA, J.M.R.; MANCINI, M.; ALMEIDA, M.T.R. DE; BARBOSA, R.A.; FARIAS, M.R.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 76, n. 3-4, p. 374-378, 2005.
- ANGONESI, D.; SEVALHO, G. Atenção Farmacêutica: fundamentação conceitual e crítica para um modelo brasileiro. **Ciência e saúde coletiva**, v.15, suppl.3, p. 3603-3614, 2010.
- APARICIO-FERNANDEZ, X.; YOUSEF, G.G.; LOARCA-PINA, G.; MEJIA, E.D.; LILA, M.A. Characterization of polyphenolics in the seed coat of black jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of agriculture and food chemistry**, v. 53, p. 4615-4622, 2005.
- APPEL, H.M.; GOVENOR, H.L.; D'ASCENZO, E.S.; SCHULTZ, J.C. Limitations of Folin assays of foliar phenolics in ecological studies. **Journal of chemical ecology**, v. 27, n. 4, 2001. Abstract
- AQIL, F.; AHMAD, I.; MEHMOOD, Z. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used medicinal plants. **Turkish journal of biology**, v. 30, p. 177-183, 2006.
- AVANCINI, C.; WIEST, J.M.; DALL'AGNOL, R.; HAAS, J.S.; von POSER, G.L. Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in southern Brazil. **Latin american journal of pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 894-899, 2008. Resumo.
- BAKER, D.; CHUN, M.; OZA, U.; TAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery (Review). **Natural products reports**, v. 24, p. 1225-1244, 2007.
- BALA, I.; BHARDWAJ, V.; HARIHARAN, S.; RAVI KUMAR, M.N.V. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 40, p. 206-210, 2006.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v.29, n.1, p. 113-123, 2006.

BARRON, D.; COLEBROOK, L.D.; IBRAHIM, R.K. An equimolar mixture of quercetin-3-sulphate and patuletin-3-sulphate from *Flaveria chloraefolia*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 7, p. 1719-1721, 1986.

BARRON, D.; VARIN, L.; IBRAHIM, R.K.; HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Sulphated flavonoids: an update. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2375-2395, 1988.

BIAVATTI, M.W.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L.M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S.N.; PRADO, S.R.T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical traits. **Journal of ethnopharmacology**, v.93, p.385-389, 2004.

BOBE, G.; WEINSTEIN, S.J.; ALBANES, D.; HIRVONEN, T.; ASHBY, J.; TAYLOR, P.R.; VIRTAMO, J.; STOLZENBERG-SOLOMON, R.Z. Flavonoid intake and risk of pancreatic cancer in male smokers (Finland). **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 17, n. 3, 2008.

BOVE, C.P.; GIL, A. dos S.B.; MOREIRA, C.B.; ANJOS, R.F.B. dos. Hidrófitas fanerogâmicas de ecossistemas aquáticos temporários da planície costeira do estado do Rio de Janeiro. **Acta botânica brasileira**, v. 17, n. 1, p. 119-135, 2003.

BRAGA, F.C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, B. de. Screening the Brazilian flora for anti-hypertensive plant species for *in vitro* angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. **Phytomedicine**, v. 7, p. 245-250, 2000.

BRANDÃO M.G.L.; ZANETTI, N.N.S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C.F.F.; SANTOS, A.P.; MONTEMÓR, R.L. Brazilian plants described by European naturalists in 19th century and in Pharmacopoeia. **Journal of ethnopharmacology**, v. 120, p. 141-148, 2008.

BRANQUINHO, F. T. B. **Da “química” da erva nos saberes popular e científico**. 1999. Tese (Doutorado em Sociologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999. Departamento de Sociologia do Instituto de Filosofia e Ciências Sociais da, São Paulo. 1999. Disponível em: <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=000175314> Acesso em: 01/08/2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 10, de 9 de março de 2010a. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, 10 de março de 2010. Disponível em: http://200.214.130.94/dab/docs/legislacao/resolucao10_09_03_10.pdf Acesso em: 26/03/2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010b. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, 05 de abril de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003a. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, 31 de maio de 2003a. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>> Acesso em: 09 mar 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Primeira Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica**: Relatório final. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL.

Ministério da Saúde. **Inquérito domiciliar sobre comportamentos de risco e morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis**: Brasil, 15 capitais e Distrito Federal, 2002-2003. 2004. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/inquerito/> Acesso em: 14/10/2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. 2006a. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf Acesso em: 11/07/2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos**. Série B. Textos Básicos de Saúde, 2006b. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf Acesso em: 24/06/2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. 2007. Disponível em: http://www.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/Programa_Nacional_de_Plantas_Medicinais_e_Fitoter%C3%A1picos..pdf Acesso em: 08/11/2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Seminário Nacional de Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Assistência Farmacêutica**: Recomendações. Brasília, 2003b. Disponível em: http://dtr2001.saude.gov.br/sctie/portal_daf/fitoterapia/Seminarios_sctie/recomendacoes.pdf Acesso em: 31/08/2005.

BRITO, A.R.M.S. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. **Journal of ethnopharmacology**, v. 54, n. 2-3, p. 131-138, 1996.

BRIXIUS, K.; WILLMS, S.; NAPP, A.; TOSSIOS, P.; LADAGE, D.; BLOCH, W.; MELHORN, U.; SCHWINGER, R.H.G. *Crataegus* special extract WS® 1442 induces an endothelium-dependent, NO-mediated vasorelaxation via eNO-Phosphorylation at serine 1177. **Cardiovascular drugs and therapy**, v. 20, p. 177-184, 2006.

BURKE, R.W.; DIAMONDSTONE, B.I.; VELAPOIDI, R.A.; MENIS, O. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for cholesterol. **Clinical chemistry**, v. 20, n. 7, p. 794-801, 1974.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin American: a personal view. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 131-134, 2005.

CALZADA, F. Additional antiprotozoal constituents from *Cuphea pinetorum*, a plant used in Mayan traditional medicine to treat diarrhea. **Phytotherapy research**, v. 19, n. 8, p. 725-727, 2005.

CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, supl. 1, n. 1, p. 558-565, 2000.

CARRARA, D. **Possangaba**: o pensamento médico popular. Maricá: ed. Ribro Soft, 1995.

CAVALCANTI, T.B., GRAHAM, S. Lythraceae In: **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB008744> Acesso em: 18/01/2010.

CERDÁ, B.; LLORACH, R.; CERÓN, J.J.; ESPÍN, J.C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. **European journal of nutrition**, v. 42, p. 18-28, 2003.

CHAO, P.D.L.; HSIU, S.L.; HOU, Y.C. Bioavailability, metabolism, and pharmacokinetics of glycosides in Chinese herbs. **Herbs: challenges in chemistry and biology ACS symposium series**, v. 925, p. 212-223, 2006.

CHEN, K.; PITTMAN, R.N.; POPEL, A.S. Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 7, 2008.

CHEN, L.G.; YEN, K.Y.; YANG, L.L.; HATANO, T.; OKUDA, T.; YOSHIDA, T. Macrocyclic ellagitannin dimmers, cuphiins D1 and D2, and accompanying tannins from *Cuphea hyssopifolia*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 307-312, 1999.

CHEN, Z.; HU, Y.; WU, H.; JIANG, H. Synthesis and biological evaluation of flavonoids as vasorelaxant agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 14, p. 3949–3952, 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.

CHEN, Y.; WANG, Y.; WANG, X. A causal relationship discovery-based approach to identifying active components of herbal medicine. **Computacional biology and chemistry**, v. 30, p. 148-154, 2006.

COE, F.G. Rama midwifery in eastern Nicaragua. **Journal of ethnopharmacology**, v. 117, p. 136–157, 2008.

CORRÊA, P.M. **Dicionário d e plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, IBDF, 1984.

CÔRTEZ, S. F.; VALADARES, Y. M.; DE OLIVEIRA, A. B.; LEMOS, V. S.; BARBOSA, M. P. T.; BRAGA, F. C. Mechanism of endothelium-dependent vasodilatation induced by proanthocyanidin-rich fraction from *Ouratea semiserrata* (Mart. & Nees) Engl. **Planta medica**, v. 68, n. 5, p. 412-415, 2002.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000. Vol. III.

COSTA, J.S.D. da; FUCHS, S.C.; OLINTO, M.T.A.; GIGANTE, D.P.; MENEZES, A.M.B.; MACEDO, S.; GEHRKE, S. Cost-effectiveness of hypertension treatment: a population-based study. **São Paulo medical journal**, v. 120, n. 4, p. 100-104, 2002.

CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; GENZINI, L.; GARELLA, D. Phytotherapeutics: an evaluation of the potential of 1000 plants. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 35, p. 11–48, 2010.

- CUNHA, A.P. da. (coord.) **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.
- CUTLAN, A.R.; BONILLA, L.E.; SIMON, J.E.; ERWIN, J.E. Intra-Specific variability of feverfew: correlations between parthenolide, morphological traits and seed origin. **Planta medica**, v. 66, p. 612-617, 2000.
- D'AVILA, M.C. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul. 1910. Tese – Faculdade Livre de Medicina e Pharmacia de Porto Alegre. APUD DICKEL, M.L.; RATS, S.M.; RITTER, M.R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 1, P. 60-71, 2007.
- DESHPANDE, S.S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D K. Tannin analysis of food products. **Critical reviews in food science and nutrition**, vol. 24, n. 4, p. 401-449, 1986 APUD AGOSTINI-COSTA, T. DA S.; LIMA, A.; LIMA, M.V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método vanilina versus método butanol ácido. **Química nova**, v. 26, n. 5, p. 763-765, 2003.
- DEZANET, A.; KREPSKY, P.B.; MATHIONI, S.M.; FARIAS, M.; NODARI, R.O. Development, biomass production and flavonoid contents in plants of *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) Macbride submitted to different substracts, irrigation systems and leaf pruning. **Latin american journal of pharmacy**, v. 26, p. 51-56, 2007.
- DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. Chinchester: John Wiley & Sons, 2002.
- DICKEL, M.L.; RATS, S.M.; RITTER, M.R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 1, P. 60-71, 2007.
- DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plant popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 69-91, 2002.
- DONER, L.W.; BÉCARD, G.; IRWIN, P.L. Binding of flavonoids by polyvinylpyrrolidone. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 41, p. 753-757, 1993.
- DONG, T.T.X.; CUI, X.M.; SONG, Z.H.; ZHAO, K.J.; JI, K.J.; JI, Z.N.; LO, C.K.; TSIM, K.W.K. Chemical assessment of roots of *Panax notoginseng* in China: regional and seasonal variation in its active constituents. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, p. 4617-4623, 2003.
- DOUGLAS, J.A.; SMALLFIELD, B.M.; BURGESS, E.J.; PERRY, N.B.; ANDERSON, R.E.; DOUGLAS, M.H.; GLIENNIE, V.I. Sesquiterpene lactones in *Arnica montana*: a rapid analytical method and the effects of flower maturity and simulated harvesting on quality and yield. **Planta medica**, v. 7, p. 166-177, 2004.
- DUFF, J.C.; BILLS, E.J. Reactions between hexamethylenetetramine and phenolic compounds. Part I. A new method for the preparation of 3- and 5-aldehydosalicylic acids. **Journal of the chemical society**, p. 1987-1988, 1932. Disponível em: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1932/JR/jr9320001987> Acesso em: 28/08/2011.
- EDWARDS, P. Pests and pathogens: plants responses to foliar attack. In: AYRES, P. (ed.) Oxford: Bios Scientific Publishers Limited, 1992. p.69-84. APUD: GRAY, D. E.; PALLARDY, S. G.; GARRETT,

H.E.; ROTTINGHAUS, G.E. Acute drought stress and plant age effects on alkalamide and phenolic acid content in purple coneflower roots. **Planta medica**, v. 69, p. 50-55, 2003.

EDWARDS, R.L.; LYON, T.; LITWIN, S.E.; RABOVSKY, A.; SYMONS, J.D.; JALILI, T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. **The journal of nutrition**, v. 137, p. 2405-2411, 2007.

EK, S.; KARTIMO, H.; MATTILA, S.; TOLONEN, A.A. Characterization of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*). **Journal of agriculture and food chemistry**, v. 54, p. 9834-9842, 2006.

ESPAÑA. Ministerio de sanidad, política social e igualdad. **Consenso sobre atención farmacéutica**. 2002. Disponível em: <www.msc.es/profesionales/farmacia/consenso/home.htm> Acesso em: 09/12/2010.

ESPÍN, J.C.; GARCÍA-CONESA, M.T.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Nutraceuticals: facts and fiction. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2986-3008, 2007.

EUROPEAN Pharmacopoeia 5. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005a. Vol. 2, p. 1169-1170. Mon. *Calendula*.

EUROPEAN Pharmacopoeia 5. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005b. Vol. 2, p. 1712-1714. Mon. *Crataegus*.

EUROPEAN Pharmacopoeia 5. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005c. Vol. 2, p. 1657-1657. Mon. *Ginkgo biloba*.

FARIAS, M.R.; DAROS, M.R.; SIMAS, M.E.; CKLESS, K.; SCHULDT, E.Z.; RIBEIRO-DO-VALE, R.M. Isolamento e identificação de quercetina-3-sulfato, constituinte antioxidante de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) McBride. In: XV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1998, Águas de Lindóia. **Programa e Resumos do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**: 1998. p.125.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

FARMACOPEIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. Parte II, p. 176 Quarto fascículo. Mon. *Stryphnodendron adstringens*.

FARMACOPEIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. Parte II, p. 134-3. Terceiro fascículo. Mon. *Calendula officinalis*.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Validation of chromatographic methods**. 1994. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf>> Acesso em: 18/01/2011.

FERNANDES, F.R.; SANTOS, A.L. dos; ARRUDA, A.M.S. de; VASQUES-PINTO, L. de M.C.; GODINHO, R.O.; TORRES, L.M.B.; LAPA, A.J.; SOUCCAR, C. Antinociceptive and antiinflammatory activities of the aqueous extract and isolated *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F.

Macbr. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 12, supl. 1, 2002.

FERREIRA, H.C.; SERRA, C.P.; ENDRINGER, D.C.; BRAGA, F.C.; CÔRTEZ, S.F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**, v. 14, n. 7 e 8, p. 473-478, 2007.

FITZPATRICK, D.F.; HIRSCHFIELD, S.L.; COFFEY, R.G. Endothelium-dependent vasorelaxing of wine and other grape products. **Annual journal of physiology**, v. 265, H774-H778, 1993. APUD MACHHA, A.; GILANI, A.U.; MUSTAFA, M.R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life sciences**, v. 74, n. 5, p. 603-612, 2003.

FRANZ, G.; KOEHLER, H. **Drogen und Naturstoffe**. Grundlagen und Praxis der chemischen Analyse. Berlin: Springer, p.148-149, 1992.

FREIRE, R.M. **Levantamento das plantas de uso medicinal nas comunidades do Canto dos Aracás e Costa da Lagoa, Ilha de Santa Catarina, Florianópolis, SC**. 1996. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1996.

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

GALVANI, F.R.; BARRENECHE, M. de L. Levantamento das espécies vegetais utilizadas em medicina popular no município de Uruguaiana (RS). **Revista da FZVA (Faculdade de zootecnia, veterinária e agronomia)**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 1994.

GASPEROTTI, M.; MASUERO, D.; VRHOVSEK, U.; GUELLA, G.; MATTIVI, F. Profiling and accurate quantification of *Rubus* ellagitannins and ellagic acid conjugates using direct UPLC-Q-TOF HDMS and HPLC-DAD analysis. **Jornal of agriculture and food chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4602-4616, 2010.

GHEBRETINSAE, A.G.; GRAHAM, S.A.; CAMILO, G.R.; BARBER, J.C. Natural infraspecific variation in fatty acid composition of *Cuphea* (Lythraceae) seed oils. **Industrial crops and products**, v. 27, p. 279-287, 2008.

GLIENNIE, C.W.; HARBORNE, J.B. Flavone and flavonol 5-glucosides. **Phytochemistry**, v. 10, n. 6, p. 1325-1329, 1971.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, 374-381, 2007.

GONZÁLEZ, A.G.; VALENCIA, E.; EXPÓSITO, T.S.; BARRERA, J.B.; GUPTA, P. Chemical components of *Cuphea* species: carthagenol: a new triterpene from *C. carthagenensis*. **Planta medica**, v. 60, p. 592-593, 1994.

GRAHAM, S.A. *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. **Botanical series** (Field Columbian Museum), v. 8, p. 124, 1930. Disponível em: http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast Acesso em: 12/10/2005.

GRAHAM, S.A. Relacionamentos entre as espécies autógamas de *Cuphea* P. Browne seção *Brachyandra* Koehne (Lythraceae). **Acta botânica brasileira**, v. 12, n. 3, p. 203-214, 1998.

GRAHAM, S.A.; CRISCI, J.V.; HOCH, P.C. Cladistic analysis of the Lythraceae *sensu lato* based on morphological characters. **Botanical journal of the Linnean Society**, v. 113, p. 1-33, 1993.

GRAHAM, S.A.; FREUDENSTEIN, J.V.; LUKER, M. A phylogenetic study of *Cuphea* (Lythraceae) based on morphology and nuclear rDNA ITS sequences. **Systematic botany**, v. 31, n. 4, p. 764-778, 2006.

GRAHAM, S.A.; HALL, J.; SYTSMA, K.; SHI, S.H. Phylogenetic analysis of the Lythraceae based on four gene regions and morphology. **International journal of plant sciences**, v. 166, n. 6, p. 995-1017, 2005.

GRAY, D. E.; UPTON, R.; CHANDRA, A.; PORTER, A.; HARRIS, R. K. Quantitative analysis of flavonol glycosides in *Ginkgo biloba*: a comparison of two analytical methods. **Phytochemical analysis**, v. 17, p. 56-62, 2006.

GRENAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H. **Pharmacopees Traditionelles en Guyane**. Paris: Orstom, 1987. APUD SCHULDT, E.Z.; FARIAS, M.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; CKLESS, K. Comparative study of radical scavenger activities of crude extract and fractions from *Cuphea carthagenensis* leaves. **Phytomedicine**, v. 11, n. 6, p. 523-529, 2004.

GUIMARÃES-BEELLEN, P.M.; BERCHIELLI, T.T.; BUDDINGTON, R.; BEELLEN, R. Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivos brasileiros de medicina veterinária e zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 910-917, 2006.

GUPTA, M.P. **Industrial utilization, production and quality standardization of MAPs**. In: Workshop: Strategies for MAPs development and conservation of endangered medicinal plants in the southern cone. Montevideo: International Centre for Science and High Technology, 2004. Disponível em: <http://www.ics.trieste.it/SearchResults.aspx?search=medicinal> Acesso em: 04/09/2004.

HAGERMAN, A.; HARVEY-MUELLER, I.; MAKKAR, H.P.S. **Quantification of tannins in tree foliage**: a laboratory manual. Vienna: FAO/IAEA, 2000. p. 4-7.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of epidemiology**, v. 15, n. 9, p. 686-699, 2005.

HARBORNE, J.B. Comparative biochemistry of flavonoids V: Luteolin-5-glucoside and its occurrence in the Umbelliferae. **Phytochemistry**, v. 6, p. 1569-1573, 1967.

HARBORNE, J.B. Flavonoids and the evolution of the angiosperms. **Biochemical systematics and ecology**, v. 5, p. 7-22, 1977.

HARBORNE, J.B., KING, L. Flavonoid sulphates in the Umbelliferae. **Biochemical systematics and ecology**, v. 4, p. 111, 1976.

HEINONEN, M., LEHTONEN, P.J.; HOPIA, A. Antioxidative activity of berry and fruit wines and liquor. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, p. 25-31, 1998.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E.M. **Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2004.

HIRAYAMA, C.; ONO, H.; TAMURA, Y.; KONNO, K.; NAKAMURA, M. Regioselective formation of quercetin 5-O-glucoside from orally administered quercetin in the silkworm, *Bombyx mori*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 5, p. 1141-1149, 2008.

HOEHNE, F.C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Graphicars, 1939. p. 355. APUD: DICKEL, M.L.; RATS, S.M.; RITTER, M.R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 1, p. 60-71, 2007.

HOUGHTON, P.J.; HOWES, M.J.; LEE, C.C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of ethnopharmacology**, v. 110, p. 391-400, 2007.

HOUGHTON, P.J.; RAMAN, A. **Laboratory handbook for the fractionation of natural product extracts**. London: Chapman & Hall, 1998.

HÜMER, M.; SCHELLER, G.; KAPELLEN, T.; GEBAUER, C.; SCHMIDT, H.; KIESS, W. [Use of herbal medicine in German children – prevalence, indications and motivation] [Article in German]. **Deutsche medizinische wochenschrift**, v. 135, n. 19, p. 959-964, 2010. Resumo.

INSTITUTE OF PACIFIC ISLANDS FORESTRY. **Pacific island ecosystems at risk**. *Cuphea carthagenensis*. 2006. Disponível em: http://www.hear.org/pier/species/cuphea_carthagenensis.htm Acesso em: 02/08/2008.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of analytical procedures: text and methodology**. 2005. Disponível em: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf> Acesso em: 22/07/2008

INTERNATIONAL PLANT NAME INDEX, THE (IPNI). **Royal Botanic Gardens**, Harvard University Herbaria, Australian National Herbarium. 2010. Disponível em: <http://www.ipni.org/> Acesso em: 21/06/2010.

IVANOVA, D.; GEROVA, D.; CHERVENKOV, T.; YANKOVA, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 96, p. 145-150, 2005.

KÄHKÖNEN, M.P., HOPIA, A.I., VUORELA, H.J.; RAUHA, J-P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, p. 3954-3962, 1999.

KANTZ, K.; SINGLETON, V.L. Isolation and determination of polymeric polyphenols using Sephadex LH-20 and analysis of grape tissue extracts. **American journal of enology and viticulture**, v. 41, n. 3, p. 223-228, 1990. Resumo.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International journal of food science & technology**, v. 37 p. 153-161, 2002.

KELM, M.A.; HAMMERSTONE, J.F.; SCHMITZ, H. Identification and quantification of flavanols and proanthocyanidins in foods: how good are the datas? **Clinical & developmental immunology**, v. 12, n. 1, p. 35-41, 2005.

KIM, S.H.; KANG, K.W.; KIM, K.W.; KIM, N.D. Procyanidins in *Crataegus* extract evoke endothelium-dependent vasodilatation in rat aorta. **Life sciences**, v. 67, n. 2, p. 121-31, 2000.

KIMA, K.H.; KIMB, Y.H.; LEEA, K.R. Isolation of quinic acid derivatives and flavonoids from the aerial parts of *Lactuca indica* L. and their hepatoprotective activity *in vitro*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, N. 24, P. 6739-6743, 2007.

KREGE, J.H.; HODGIN, J.B.; HAGAMAN, J.R.; SMITHIES, O. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. **Hypertension**, v. 25, p. 1111-1115, 1995.

KREPSKY, P.B.; FARIAS, M.R.; CÔRTEZ, S.F.; BRAGA, F.C. Quercetin-3-sulfate: A chemical marker for *Cuphea carthagenensis*. **Biochemical systematics and ecology**, v. 38, n.1, p. 125-127, 2010.

KRISHNASWAMY, N.R. Learning Organic Chemistry Through Natural Products. **Resonance**, v. 1, n. 9, 1996. Disponível em: <http://www.ias.ac.in/resonance/Sept1996>.

KURIOKA, A.; YAMAZAKI, M. Purification and identification of flavonoids from the yellow green conoon shell (sasamayu) of the silkworm, *Bombyx mori*. **Bioscience biotechnology and biochemistry**, v. 66, n. 6, p. 1396-1399, 2002.

KUSANO, K.; IWASHINA, T.; KITAJIMA, J.; MISHIO, T. Flavonoid diversity of *Saussurea* and *Serratula* species in Tien Shan Mountains. **Natural product communications**, v. 2, n. 11, p. 1121-1128, 2007.

LOKE, W.M.; JENNER, A.M.; PROUDFOOT, J.M.; MCKINLEY, A.J.; HODGSON, J.M.; HALLIWELL, B.; CROFT, K.D. A metabolite profiling approach to identify biomarkers of flavonoid intake in humans. **The journal of nutrition**, v. 139, n. 12, p. 2309-2314, 2009.

LI, J.W.H.; VEDERAS, J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161-165, 2009.

LIMA, R.X., SILVA, S.M., KUNYIOSHI, Y.S., SILVA, L.B. Etnobiologia de comunidades continentais da Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba - Paraná - Brasil. **Etnoecológica**, v. 4, n. 6, p. 33-55, 2000. Disponível em www.etnoecologica.org.mx/Etnoecologica_vol4_n6/frame_sup_art_delima.htm. Acesso em: 20/10/2004.

LIMA, C.B. de; BELLETTINI, N.M.T.; SILVA, A.S. da; CHEIRUBIM, A.P.; JANANI, J.K.; VIEIRA, M.A.V.; AMADOR, T.S. Uso de plantas medicinais pela população da zona urbana de Bandeirantes, PR. **Revista brasileira de biociências**, v. 5, supl. 1, p. 600-602, 2007.

LIMA-LANDMAN, M.T.R.; BORGES, A.C.R.; CYSNEIROS, R.M.; LIMA, T.C.M. DE; SOUCCAR, C., LAPA, A.J. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An *in vivo* approach to the hypotensive mechanism. **Phytomedicine**, v. 14, p. 314-320, 2007.

LORENZO, M.A. de. **Estudo do efeito do tipo ansiolítico da *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr (Sete-sangrias) em camundongos**. 2000. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000. Resumo. Disponível em: http://www.farmaco.ufsc.br/ppgf/divulgacao_teses.php Acesso em: 01/03/2006.

LOURTEIG, A. Lythraceae. In: **Flora Ilustrada Catarinense**. Reitz, R. (ed.). Itajaí, SC: Herbario

Barbosa Rodrigues, 1969.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, p. 35-164, 1970.

MACEDO, J.F. Plantas ocorrentes no campus da Universidade Federal de Minas Gerais utilizadas na medicina popular. **Daphne**, Belo Horizonte, v. 6, n. 3, p. 51-60, 1996. APUD: RONDON NETO, R.M.; GAMA, J.R.V. Biomassa acima do solo de espécies herbáceas e subarborescentes com potencial medicinal em uma vegetação secundária. **Ciência florestal**, v. 13, n. 1, p. 19-24, 2003.

McMURROUGH, I.; MADIGAN, D.; SMYTH, M.R. Adsorption by polyvinylpyrrolidone of catequins and proanthocyanidins from beer. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 43, p. 2687-2691, 1995.

MAKKAR, H.P.S.; GAMBLE, G.; BEECKER, K. Limitation of the butanol-hydrochloric acid-iron assay for bound condensed tannins. Analytical, nutritional and clinical methods section. **Food chemistry**, v. 66, p. 129-133, 1999.

MAKSIMOVIĆ, Z.; MALENČIĆ, Đ.; KOZAČEVIĆ, N. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. **Bioresorce technology**, v. 96, n. 8, p. 873-877, 2005.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. **Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis**. Disponível em: <http://www.bichoonline.com.br/artigos/apa0014.htm> Acesso em: 30/05/2008.

MARODIN, M.S.M.; BAPTISTA, L.R. de M. O uso de plantas com fins medicinais no município de Dom Pedro de Alcântara, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 4, n. 1, p. 57-68, 2001.

MARONI, B.C.; DI STASI, L.C.; MACHADO, S.R. **Plantas medicinais do cerrado de Botucatu**. São Paulo: ed. UNESP, 2006.

MARQUESINI, N.R. **Plantas utilizadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil**. 1995. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

MARTINS, D.; ROQUE, N.F. Constituents of *Cuphea aperta*. **Fitoterapia**, v. 66, n. 2, p. 187, 1995. Resumo.

MATHIONI, S.M.; LIN, S.S.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Armazenamento, viabilidade e dormência de sementes de populações naturais de sete-sangrias (*Cuphea carthagenensis* (Jacq.) Macbride). **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 8, n. 1, p. 45-51, 2005. Resumo.

MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 3660-3667, 2002.

McNEILL, J.R.; JURGENS, T.M. A systematic review of mechanisms by which natural products of plant origin evoke vasodilatation. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 84, p. 803-821, 2006.

MELZER, J.; SALLER, R.; MEIER, B., Aspects of quality of primary care provided by physicians certified in phytotherapy in Switzerland. **Forschende komplementmedizin**, v. 15, n. 2, p. 82-88, 2008.

MENG, J.; LEUNG, S.-Y.; DONG, X.-P.; ZHOU, Y.-S.; JIANG, Z.-H.; ZHAO, Z.-Z. Simultaneous quantification of eight bioactive components of *Houttuynia cordata* related Saururaceae medicinal plants by on-line high performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray mass spectrometry. **Fitoterapia**, v. 80, p. 468–474, 2009.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. **Journal of agriculture and food chemistry**, v. 48, n. 3, 2000.

MERTENS-TALCOTT, S.U.; TALCOTT, S.T.; PERCIVAL, S.S. Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 Human Leukemia Cells. **The journal of nutrition**, v. 133, p. 2669-2674, 2003.

MERTZ, C.; CHEYNIER, V.; GÜNATA, Z.; BRAT, P. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, p. 8616–8624, 2007.

METWALLY, A.M.; OMAR, A.A.; HARRAZ, F.M.; EL SOHAFY, S.M. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaves. **Pharmacognosy magazine**, v. 6, n. 23, p. 212–218, 2010.

MING, L.C.; SILVA, S.M.P. da; SILVA da SILVA, M.A.; HIDALGO, A. de F.; MARCHESE, J.A.; CHAVES, F.C.M. **Manejo e cultivo de plantas medicinais**: Algumas reflexões sobre as perspectivas e necessidades no Brasil. I Seminário Matogrossense de Etnobiologia e Etnoecologia e II Seminário Centro-Oeste de Plantas Medicinais, 2002, Cuiabá. Artigo referente a palestra. Disponível em: <http://www.ufmt.br/etnoplan/artigos/> Acesso em: 22/07/2008.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. Grupo Interministerial de Propriedade Intelectual. **Lista não-exaustiva de nomes associados à biodiversidade de uso costumeiro no Brasil**. 2006. Disponível em: <http://www2.desenvolvimento.gov.br/sitio/sti/publicacoes/lisBiodiversidade/listbiodiversidade.php> Acesso em: 24/05/2008.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN (MOBOT). **Tropicos**. 2010. Disponível em: <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html> Acesso em: 21/06/2010.

MOLAN, A.L.; SIVAKUMARAN S.; SPENCER, P.A.; MEAGHER, L.P. Green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins inhibit the motility of infective larvae of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* *in vitro*. **Research in veterinary science**, v. 77, n. 3, p. 239-243, 2004.

MONTANARI JR., I. **Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas**. 2002. Disponível em <http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/artigos/producao.htm>. Acesso em: 28/08/11.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P. de; ARAÚJO, E. de L; AMORIN, E.L.C.de. Tannis: from chemistry to ecology. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOREIRA, N.J. **Suplemento ao dicionário de plantas medicinaes brasileiras**. Rio de Janeiro:

- Typographia Gonçalves Dias, 1871. p. 57. APUD: DICKEL, M.L.; RATS, S.M.; RITTER, M.R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 1, P. 60-71, 2007.
- MORELLO, S.; VELLECCO, V.; ALFIERI, A.; MASCOLO, N.; CICALA, C. Vasorelaxant effect of the flavonoid galangin on isolated rat thoracic aorta. **Life sciences**, v. 78, p. 825-830, 2006.
- NACZK, M.; GRANT, S.; ZADERNOWSKI, R.; BARRE, E. Protein precipitating capacity of phenolics of wild blueberry leaves and fruits. **Food chemistry**, v. 96, p. 640-647, 2006.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007 .
- NOVÁKOVÁ, L.; SPÁČIL, Z.; SEIFRTOVÁ, M.; OPLETAL, L.; SOLIČKA, P. Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures. **Talanta**, v. 80, p. 1970–1979, 2010.
- OJIMA, I. Modern natural products chemistry and drug discovery. **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, n. 9, 2008.
- OLIVEIRA, F.Q.; ANDRADE-NETO, V.; KRETTLI, A.U.; BRANDÃO, M.G.L. New evidences of antimicrobial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. **Journal of ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 39-42, 2004.
- OLIVEIRA, H.V. de. Systema de materia medica vegetal. Rio de Janeiro: Eduardo e Henrique Laemmert, 1854. p. 284. APUD: DICKEL, M.L.; RATS, S.M.; RITTER, M.R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 1, p. 60-71, 2007.
- OLSEN, H.; KJERSTI, A.ABY; IREN, B.G. Characterization and quantification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in curly kale (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* var. *sabellica*) by HPLC-DAD-ESI-MSn. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, p. 2816-2825, 2009.
- OLSZEWSKA, M. Quantitative HPLC analysis of flavonoids and chlorogenic acid in the leaves and inflorescences of *Prunus serotina* Ehrh. **Acta chromatographica**, v.19, p. 253-269, 2007.
- OLSZEWSKA, M. Separation of quercetin, sexangularetin, kaempferol and isorhamnetin for simultaneous HPLC determination of flavonoid aglycones in inflorescences, leaves and fruits of three Sorbus species. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 48, p. 629-635, 2008.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA (UNICEF). **Conferência Internacional sobre cuidados primários de saúde**. Declaração de Alma-Ata. 1978. Disponível em: www.opas.org.br/coletiva/uploadArq/Alma-Ata.pdf Acesso em: 31/08/2005.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. Ginebra. 2002. Disponível em: <http://opas.org.br/publicmo.cfm?codigo=67> Acesso em: 10/10/2005.
- OSSES, I. S. E. **Avaliação do efeito de plantas medicinais com ação hipotensora/ anti-hipertensiva na atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina I (ECA)**. 2000.

Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2000. 89p. Resumo. Disponível em: http://www.capes.gov.br/capes/portal/conteudo/10/Teses_Dissertacoes.htm Acesso em: 01/03/2006.

OZGA, J.A.; SAEED, A. ; WISMER, W.; REINECKE, D.M. Characterization of cyanidin- and quercetin-derived flavonoids and other phenolics in mature saskatoon fruits (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, p. 10414–10424, 2007.

DIAS, J.E.; LAUREANO, L.C. (Coordenação). **Farmacopeia popular do Cerrado**. 1. ed., Goiás (GO): Articulação Pacari, 2009.

PAGLIANIRI, W.F.M. **Levantamento das plantas de uso medicinal no distrito de Ribeirão da Ilha, Florianópolis, SC**. 1995. Trabalho de Conclusão do Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1995.

PAN, Y. [Isolation and identification of saxifragin from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch]. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 24, n. 5, p. 295-319, 1999. Resumo.

PEREIRA, C.A.; YARIWAKE, J.H.; LANÇAS, F.M.; WAUTERS, J.N.; TITS, M.; ANGENOT, L. A HPTLC densitometric determinations of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata*, *P. caerulea* and comparison with a HPLC method. **Phytochemical analysis**, v. 15, n. 4, p. 241-248, 2004.

PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.W.; PAGOTTO, L.A.Z.; FRANÇA, S.C. Influência de período e condições de armazenamento no teor de fenóis totais em *Maytenus aquifolium*. In: XIV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1996, Florianópolis. **Programa e Resumos do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**: 1996. p.32.

PEREZ-CASTORENA, A.L.L.; MALDONADO, E. Triterpenes and flavonoids glycosides from *Cuphea wrightii*. **Biochemical systematics and ecology**, v. 31, p. 331-334, 2003.

PERRY, N.B.; KLINK, J.W. VAN; BURGESS, E.J.; PARMENTER, G.A. Alkamide levels in *Echinaceae purpurea*: effects of processing, drying and storage. **Planta medica**, v. 66, p. 54-56, 2000.

PINTO, A.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, N.P. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

PINTO, M. da S.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Food chemistry**, v. 107, p. 1629–1635, 2008.

PITTLER, M.H.; GUO, R.; ERNST, E. Hawthorn extract for treating chronic heart failure. **Cochrane database of systematic reviews**, v. 23, n. 1, 2008.

PIZZI, A.; MITTAL, K.L. **The handbook of adhesive technology**. 2nd ed., New York: Marcel Dekker, 2003.

PORTER, L.J.; HRSTICH, L.N.; CHAN, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, v. 25, p. 223, 1986. Resumo.

PORTUGAL. Ordem dos farmacêuticos. **Indicação farmacêutica**. 2006. Disponível em: <www.ofporto.org/upload/documentos/354791-Ind_Farmaceutica.pdf> Acesso em: 09/12/2010.

QUETTIER-DELEU, C.; GRESSIER, B; VASSEUR, J.; DINE, T.; BRUNET, C.; LUYCKX, M.; CAZIN, M.; CAZIN, J.-C.; BAILLEUL, F; TROTIN, F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. **Journal of ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 35-42, 2000.

SCHOFIELD, P; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal feed science and technology**, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, 2001.

SOUZA, J.R.P.; ROCHA, J.N.; MORAIS, H.; CARAMORI, P.H.; JOHANSSON, L.A.P.S.; MIRANDA, L.V. Desenvolvimento da espinheira-santa sob diferentes intensidades luminosas e níveis de poda. **Horticultura brasileira**, v. 26, n. 1, p. 40-44, 2008.

RATES, S.M.K.. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 11, n. 2, 2001.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*. **Journal of medicinal plants research**, v. 4, n. 5, p. 393-396, 2010.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REIS, M.S.; MARIOT, A.; STEENBOOK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

REZENDE, B.A.; CÔRTEZ, S.F.; SOUZA, F.B.; LULA, I.S.; SCHMITT, M.; SINISTERRA, R.D.; LEMOS, V.S. Complexation with beta-cyclodextrin confers oral activity on the flavonoid dioclein. **International journal of pharmaceuticals**, v. 367, p. 133-139, 2009.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, v. 2, n. 4, 1997.

RIJKE, E. DE; OUT, P.; NIESEN, W.M.A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U.A.T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of chromatography A**, v. 1112, p. 31-63, 2006.

RIO, D. del; STEWART, A.J.; MULLEN, W.; BURNS, J.; LEAN, M.E.J.; BRIGHENTI, F.; CROZIER, A. HPLC-MSⁿ analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2807-2815, 2004.

RISHTON, G.M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **The american journal of cardiology**, v. 101, n. 10, supplement, 2008.

ROBARDS, K.J. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of chromatography A**, v. 1000, p. 657-691, 2003.

ROLIM, A.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; SALGADO-SANTOS, M.N.; VELASCO, M.V. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) commercial extract. **Journal of the AOAC international**, v. 88, n. 4, 2005.

RONDON NETO, R.M.; GAMA, J.R.V. Biomassa acima do solo de espécies herbáceas e subarborescentes com potencial medicinal em uma vegetação secundária. **Ciência florestal**, v. 13, n. 1, p. 19-24, 2003.

ROSS, K.A.; BETA, T.; ARNTFIELD, S.D. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. **Food chemistry**, v. 113, p. 336–344, 2009.

ROUÉ, M. Novas perspectivas em etnoecologia: “Saberes tradicionais” e gestão dos recursos naturais. In: DIEGUES, A.C. (org.) **Etnoconservação: novos rumos para a proteção da natureza nos trópicos**. São Paulo: Ed. Hucitec, 2000.

SANTOS, D.Y.A.C. dos; SALATINO, M.L.F.; SALATINO, S. Flavonoids of species of *Cuphea* (Lythraceae) from Brazil. **Biochemical systematics ecology**, v. 23, n. 1, p. 99-103, 1995.

SANTOS, M.; KOLCHRAIBER, F.C.; GOMES, P.; SOARES, R.; KRAKOWIAK, P.; MARCHI, R.; VALLIN, A.C.C.; LIMA-LANDMAN, M.T. LAPA, A.J.; SOUCCAR, C. Efeito do tratamento crônico com o extrato de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) Macbr na fertilidade e na capacidade reprodutora de ratas. Efeito na geração F1. In: XV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1998, Águas de Lindóia. **Programa e Resumos do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil: 1998**. p.79.

SANTOS, S. da C.; MELLO, J.C.P. de. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

SCHEFFER, M.C. Produção de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Raies) na região metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil. In: ALEXIADES, M.N.; SHANLEY, P. (ed.) **Productos forestales, medios de subsistencia y conservación: estudios de caso sobre sistemas de manejo de productos forestales no maderables**. Bogor, Indonesia: CIFOR, XV, 2004, 499p. Vol. 3, cap. 17. Disponível em: www.cifor.cgiar.org/publications/pdf_files/Books/NTFPLatin_America/Chapter17-Chapter20.PDF. Acesso em: 11/09/2004.%

SCHULDT, E.Z.; CKLESS, K.; SIMAS, M.E.; FARIAS, M.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Butanolic fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq McBriede relaxes rat thoracic aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent mechanisms. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 35, n. 2, p. 234-239, 2000.

SCHULDT, E.Z.; FARIAS, M.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; CKLESS, K. Comparative study of radical scavenger activities of crude extract and fractions from *Cuphea carthagenensis* leaves. **Phytomedicine**, v. 11, n. 6, p. 523-529, 2004.

SCHWINGER, R.H.G.; PIETSCH, M.; FRANK, K.; BRIXIUS, K. *Crataegus* special extract WS 1442 increases force of contraction in human myocardium cAMP-independently. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 35, p. 700–707, 2000.

SHALI, N.A.; CURTIS, C.G.; POWELL, G.M.; ROY, A.B. Sulphation of the flavonoids quercetin and

catechin by rat liver. **Xenobiotica**, v. 21, n. 7, p. 881-893, 1991.

SLIMESTAD, R.; FOSSEN, T.; VERHEUL, M.J. The flavonoids of tomatoes. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, p. 2436-2441, 2008.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 5ª ed. Porto Alegre: UFRGS editora, 1998.

SINGLETON, V.L. Analytical fractionation of the phenolic substances of grapes and wine and some practical uses of such analyses. In: WEBB, A.D. (ed.) *Chemistry of winemaking*. Washington DC: American Chemical Society, 1974. APUD HEINONEN, M., LEHTONEN, P.J.; HOPIA, A. Antioxidative activity of berry and fruit wines and liquor. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, p. 25-31, 1998.

SMARTWOOD: Practical conservation through certified forestry. 2003. **Resumo público de certificação de Klabin S/A** (Klabin Florestal Parana). Certificado n. SW-FM/COC-NTFP038. Disponível em: <http://www.imaflora.org/arquivos/KLABINPR.pdf> Acesso em: 07/07/2008.

SMITH, W.E. Formylation of aromatic compounds with hexamethylenetetramine and trifluoroacetic acid. **Journal of organic chemistry**, v. 37, n. 24, p. 3972-3973, 1972.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: Wiley-Interscience Publication, 1997. 765p.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. p. 221-58.

SOUZA BRITO, A. R. M. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. **Journal of ethnopharmacology**, v. 54, p. 131-138, 1996.

SÜLSEN, V.; GÜIDA, C.; COUSSIO, C.; PAVETO, C.; MUSCHIETTI, L.; MARTINO, V. *In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. **Parasitology research**, v. 98, n. 4, 2006.

TOURSARKISSIAN, M. *Plantas Medicinales de la Argentina*. Buenos Aires: Ed. Hemisferio Sur, p. 81-82, 1980. APUD SÜLSEN, V.; GÜIDA, C.; COUSSIO, C.; PAVETO, C.; MUSCHIETTI, L.; MARTINO, V. *In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. **Parasitology research**, v. 98, n. 4, 2006.

TAMURA, Y.; NAKAJIMA, K.-I.; NAGAYASU, K.-I.; TAKABAYASHI, C. Flavonoid 5-glucosides from the cocoon shell of the silkworm, *Bombyx mori*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 275-278, 2002.

UNITED States Pharmacopeia. **The National Formulary** (NF18). Rock-ville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. p.1806-1812.

VALLADARES, G.R.; ZAPATA, A.; ZYGADLO, J.; BANCHIO, E. Phytochemical induction by herbivores could affect quality of essential oils from aromatic plants. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 4059-4061, 2002.

VARGA, E.; SZENDREI, K.; REISCH, J. Flavonol 5-glycosides from *Rhaponticum carthamoides*. **Fitoterapia**, v. 53, n. 1-2, p. 9-12, 1982.

VENDRUSCOLO, G.S. **Estudo etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul**. 2004. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

VENDRUSCOLO, G.S.; MENTZ, L.A. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta botanica brasílica**, v. 20, n. 2, p. 367-382, 2006.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, p. 53-56, 2005.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K. A systems view on the future of medicine: inspiration from Chinese medicine? **Journal of ethnopharmacology**, v. 121, p. 479-481, 2009.

VERPOORTE, R., HOUGHTON, P.J., HEINRICH, M., MUKHERJEE, P.K., HIRSCHMANN, G.S., VAN STADEN, J., YESILADA, E. **Journal of ethnopharmacology**, v. 103, p. 309-310, 2006. Editorial.

VIEL, T. A. **Reversão do bloqueio colinérgico por frações isoladas de Cuphea carthagenensis (Jacq.) J.F.Macbr.**: estudo comparativo em sinapses centrais e periféricas. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2003. Resumo. Disponível em: http://www.capes.gov.br/capes/portal/conteudo/10/Teses_Dissertacoes.htm Acesso em: 01/03/2006.

VRHOVSEK, U.; PALCHETTI, A.; RENIERO, F.; GUILLOU, C.; MASUERO, D.; MATTIVI, F. Concentration and mean degree of polymerization of *Rubus* ellagitannins evaluated by optimized acid methanolysis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, p. 4469-4475, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer-Verlag, 1984.

WANG, C.-C.; CHEN, L.-G.; YANG, L.-L. Antitumor activity of four macrocyclic ellagitannins from *Cuphea hyssopifolia*. **Cancer letters**, v. 140, n. 1-2, p. 195-200, 1999.

WANG, C.-C.; CHEN, L.-G.; YANG, L.L. Cuphiin D1, the macrocyclic hydrolysable tannin induced apoptosis in HL-60 cell line. **Cancer letters**, v. 149, p. 77-83, 2000.

WANG, C.-C.; CHEN, L.-G.; YANG, L.L. Cytotoxic effects of cuphiin D1 on the growth of human cervical carcinoma and normal cells. **Anticancer research**, v. 22, n. 5, p. 2677-2684, 2002a. Resumo.

WANG, C.-C.; CHEN, L.-G.; YANG, L.L. *In vitro* immunomodulatory effects of Cuphiin D1 on human mononuclear cells. **Anticancer research**, v. 22, p. 4233-4236, 2002b. Resumo.

WANG, G.J.; TSAI, T.H.; LIN, L.C. Prenylflavonol, acylated flavonol glycosides and related compounds from *Epimedium sagittatum*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 19, p. 2455-64, 2007.

WANG, L.; LEE, I.-M.; ZHANG, S.M.; BLUMBERG, J.B.; BURING, J.E.; SESSO, H.D. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older

women. **The American journal of clinical nutrition**, v. 89, p. 905-912, 2009.

WANG, S.Y.; LIN, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, p. 140–146, 2000.

WANG, Y.; JIN, Y.; ZHOU, C.; QU, H.; CHENG, Y. Discovery active compounds from mixture of natural products by data mining approach. **Medical & biological engineering & computing**, v. 46, p. 605-611, 2008.

WHITESALL, S.E.; HOFF, J.B.; VOLLMER, A.P.; D'ALECY, L.G. Tail-cuff methods systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and comparison of simultaneous measurement of mouse. **The american journal of physiology – heart and circulatory physiology**, v. 286, p. H2408–H2415, 2004.

WISEMAN, S.; MULDER, T.; RIETVELD, A. Tea flavonoids: bioavailability *in vivo* and effects on cell signaling pathways *in vitro*. **Antioxidants & redox signaling**, v. 3. n. 6, 2001.

XU, M; QI, C.; DENG, B.; DENG, P.X.; MO, C.W. Phytotherapy versus hormonal therapy for postmenopausal bone loss: a meta-analysis. **Osteoporosis international**, v. 20, n. 4, p. 519-526, 2009.

YAMAUCHI, Y.; MAKAMURA, A.; KOHNO, I.; HATANAKA, K.; KITAI, M.; TANIMOTO, T. Quasi-flow injection analysis for rapid determination of caffeine in tea using the sample pre-treatment method with a cartridge column filled with polyvilylpyrrolidone. **Journal of chromatography A**, v. 1177, n. 1, p. 190-194, 2008.

YAO, L. H.; JIANG, Y.M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S.S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant foods for human nutrition**, v. 59, p. 113–122, 2004.

YOSEF, G.G.; SEIGLER, D.S.; GRUSAK, M.A.; ROGERS, R.B.; KNIGHT, C.T.G.; KRAFT, T.F.B.; ERDMAN, J.W.; LILA, M.A. Biosynthesis and characterization of ¹⁴C-enriched flavonoid fractions from plant cell suspension cultures. **Journal of agriculture and food chemistry**, v. 52, p. 1138-1145, 2004.

ZHANG, L.; ZUO, Z.; LIN, G. Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids. **Molecular pharmaceutics.**, v. 4, n. 6, p. 833 – 845, 2007.

ZUANAZZI, J.A.Z.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. p. 576-614.

APÊNDICE A - Fórmula para cálculo da porcentagem de flavonoides totais por espectrofotometria

Desenvolvimento da fórmula para cálculo da porcentagem de flavonoides totais por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível, calculados como quercetina anidra, partindo da equação da reta da curva analítica. Todos os cálculos foram efetuados através de regras de três.

$$[Q] = A / 0,0859 \text{ (Equação obtida a partir da curva analítica para quercetina anidra)}$$

Onde: [Q] = concentração de quercetina em $\mu\text{g/ml}$

A = absorvância

Desenvolvimento da fórmula para cálculo da quantidade de quercetina na solução de análise (solução contida no balão volumétrico de 25 ml cuja absorvância foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 425 nm):

$$\begin{array}{r} A / 0,0859 \mu\text{g} \quad \text{-----} \quad 1 \text{ ml} \\ x \quad \quad \quad \text{-----} \quad 25 \text{ ml} \\ \\ x = \frac{25 \times A}{0,0859} \mu\text{g} \end{array}$$

Desenvolvimento de fórmula para cálculo da quantidade de quercetina no balão volumétrico (25 ml) que contém solução em acetato de etila (solução mãe):

$$\begin{array}{r} 25 \times A / 0,0859 \mu\text{g} \quad \text{-----} \quad 10 \text{ ml} \\ y \quad \quad \quad \text{-----} \quad 25 \text{ ml} \\ \\ y = \frac{62,5 \times A}{0,0859} \mu\text{g} \end{array}$$

Desenvolvimento de fórmula para cálculo da quantidade de quercetina no balão volumétrico (50 ml) que contém extrato em acetona:

$$\begin{array}{r} 62,5 \times A / 0,0859 \mu\text{g} \quad \text{-----} \quad 10 \text{ ml} \\ z \quad \quad \quad \text{-----} \quad 50 \text{ ml} \\ \\ z = \frac{312,5 \times A}{0,0859} \mu\text{g} \end{array}$$

0,0859

Transformação de unidade de μg para g:

$$\frac{312,5 \times A}{0,0859} \mu\text{g} \times \frac{1}{1.000.000} = \frac{312,5 \times A}{85.900}$$

Cálculo da porcentagem de flavonoides calculados em quercetina:

$$\frac{312,5 \times A}{85.900} \text{ m (g)}$$

$$w \text{ ----- } 100 \text{ g}$$

$$w = \frac{0,365 \times A}{\text{m (g)}}$$

Cálculo da porcentagem:

$$\frac{31.250 \times A \mu\text{g}}{0,625} \text{ ----- } m \text{ (g)}$$

$$w \text{ ----- } 100 \text{ g}$$

$$w = \frac{3.125.000 \times A}{0,625 \times m \text{ (g)}}$$

Transformação de unidade de μg para g:

$$\frac{3.125.000 \times A}{0,652 \times m \text{ (g)}} \div 1.000.000 = \frac{3,125 \times A}{0,625 \times m \text{ (g)}} = \frac{5 \times A}{m \text{ (g)}}$$

APÊNDICE C – Fórmula para cálculo da porcentagem de flavonoides totais por CLAE

Desenvolvimento da fórmula para cálculo da porcentagem de flavonoides totais por cromatografia líquida de alta eficiência, calculados como quercetina anidra, partindo da equação da reta da curva analítica. Todos os cálculos foram efetuados através de regras de três.

Cálculo da massa de flavonoides injetados, em μg :

$$m = \frac{AP}{2,89}$$

Onde: AP = área do pico

Cálculo da quantidade de flavonoides, em μg , na solução de volume igual a 1,0 ml preparada para a análise:

$$\begin{array}{r} AP/2,89 \mu\text{g} \quad \text{-----} \quad 10 \mu\text{l} \\ X \quad \quad \quad \text{-----} \quad 1000 \mu\text{l} \\ X = \frac{AP \times 100}{2,89} \mu\text{g} \end{array}$$

Transformação de unidade de μg para g:

$$\frac{AP \times 100}{2,89} \mu\text{g} \div 1000 = \frac{AP}{28,9} \text{mg}$$

Cálculo da porcentagem de flavonoides, calculados como quercetina diidratada:

$$\begin{array}{r} \frac{AP}{28,9} \text{mg} \quad \text{-----} \quad \text{massa de amostra (mg)} \\ y \quad \quad \quad \text{-----} \quad 100 \text{mg} \\ y = \frac{AP \times 100}{m \text{ (mg)} \times 28,9} \end{array}$$

Cálculo da porcentagem de flavonoides, calculados como quercetina anidra:

$$\frac{AP \times 100}{m \text{ (mg)} \times 28,9} \text{ ----- } 338,27 \text{ g/mol (quercetina diidratada)}$$

$$y \text{ ----- } 302,24 \text{ g/mol (quercetina anidra)}$$

$$y = \frac{AP \times 100 \times 0,893}{m \text{ (mg)} \times 28,9} = \frac{AP \times 3,09}{m \text{ (mg)}}$$

ANEXO A - Certificado do comitê de ética em experimentação animal



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 17/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Estudo de composição de metabólitos secundários e atividade anti-hipertensiva das partes aéreas de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) MacBride (Lythraceae)**", que tem como responsável **Fernão Castro Braga**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **23/ 04/2008**.

Este certificado expira-se em **23/ 04/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 17/2008**, related to the project entitled "**Study of the secondary metabolites composition and antihypertensive activity of the aerial parts of *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) MacBride (Lythraceae)**", under the supervisors of **Fernão Castro Braga**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 23, 2008**.

This certificate expires in **April 23, 2013**.

Belo Horizonte, 24 de Abril de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br