

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

ANDRÉ MÁRCIO DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE EXTRATOS DE
***Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville**

Belo Horizonte

2008

ANDRÉ MÁRCIO DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE EXTRATOS DE
***Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares

Co-orientadora: Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho

Belo Horizonte

2008

N244a Nascimento, André Márcio do
Avaliação da qualidade de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville / André Márcio do Nascimento. – 2008.
159 f. : il.

Orientador: Prof^a Dr^a Cristina Duarte Vianna Soares
Co-Orientadora: Prf^a Dr^a Rachel Oliveira Castilho
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Stryphnodendron adstringens* - Teses. 2. Barbatimão - Teses.
3. Taninos - Teses. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência -
Teses. 5. Extrato etanólico – Teses.6. UV-VIS – Teses. I. Soares,
Cristina Duarte Vianna. II. Castilho, Rachel Oliveira. III. Universidade
Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD 615.321

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^a. Cristina Duarte Vianna Soares pela orientação neste trabalho, pela confiança depositada na realização dos trabalhos e por ter me ensinado a doçura e a leveza que a ciência pode ter.

À Prof^a. Rachel Oliveira Castilho também pela orientação neste trabalho, pelo apoio e incentivo incansáveis, pelas preces e por sempre acreditar na minha capacidade como aluno e ser humano.

À Prof^a. Maria das Graças Lins Brandão pela sugestão do tema, pela co-orientação no início dos trabalhos e por ter me apresentado a medicina tradicional brasileira e sua riquíssima flora.

À Prof^a. Aparecida Célia Paula dos Santos, do Departamento de Ciências Naturais da UFSJ, pelo auxílio na coleta do material botânico.

Ao Prof. Luiz Bernardes pelos ensinamentos e pelo auxílio na elucidação das reações químicas dos métodos analíticos estudados.

Aos queridos amigos que me auxiliaram na árdua tarefa das experimentações: Mariana, Luan, Maria Augusta, Bruno, Felipe, Fábio e Vera. Obrigado por estarem do meu lado, em vários momentos no mestrado, sempre com bom ânimo e disposição.

Aos amigos do laboratório de farmacognosia: Uiatã, Fernanda, Aline, Naiara, Wélber e Kátia, pelo convívio agradável, pela troca de experiências e pelos momentos de descontração.

Aos amigos do laboratório de controle de qualidade: Fernando, Isabela, Zé Antônio, André Lima, Ana Gabriela, Taízia, Bruna, Daniela, Michele, Diego, Gustavo “Jonhy”, Tiago, Giovani, Paula, pela agradável companhia, pela troca de experiências e por tornarem o trabalho, às vezes árduo, num divertimento, até mesmo nos finais de semana e feriados.

Aos amigos do Cefar e funcionários do laboratório de controle de qualidade pelo convívio agradável e pelo auxílio. Em especial ao Leo, Luciano, Écio Giovani e Edna, pela disposição em ajudar sempre, pelo carinho e pelos ótimos momentos do “cafezinho”.

Ao Cedafar pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À querida amiga Vanessa, por dividir comigo as dificuldades e as alegrias de se fazer uma pós-graduação trabalhando e por estar sempre ao meu lado.

Ao Sr. Geraldo de Oliveira Mata e ao Sr. Rogério de Oliveira Mata, do Laboratório Usmed Ltda., por permitirem a minha ausência na empresa, por acreditarem na minha competência e também pelo apoio financeiro na condução deste trabalho.

Aos amigos e funcionários do Laboratório Usmed Ltda. pela boa convivência e pelo auxílio sem o qual seria impossível realizar este mestrado trabalhando ao mesmo tempo.

Aos grandes amigos, dos dois planos da vida, da Fecove, pelas preces, pela presença incansável, pelo amor e carinho dedicados em todos estes anos. Em especial ao Tio Sílvio pelo carinho e pelas boas conversas nos momentos que mais precisei.

Aos grandes amigos Edmar, por cuidar e manter os pés de barbatimão em sua casa, e Cristiano, pela ajuda no preparo do material botânico. Além disto, pela amizade, companheirismo e apoio incansáveis, em todos estes anos de convivência.

Aos meus pais Paulo André e Maria José, pelo amor incondicional, por me tornarem o homem que sou hoje e por terem investido sempre na minha formação acadêmica. Ao meu irmão Jefferson pelo amor, companheirismo e pela ajuda nos trabalhos. Aos irmãos que já se foram Ângelo e Marcus Vinícius, saudades. À Pretinha, pela companhia fiel.

Às minhas famílias agregadas Souza, Barbosa e Miguel, por terem me acolhido e por estarem do meu lado nos momentos felizes e nos momentos difíceis da minha vida. Em especial à afilhada Júlia, por alegrar a minha vida.

A todos os amigos e familiares que, de uma forma ou de outra, participaram desta caminhada, sofreram e vibraram comigo em cada momento.

À Deus, Pai Celestial, pelo dom da vida e ao Mestre Jesus, pelo amor e exemplo a ser seguido.

Tocando em frente

(Almir Sater e Renato Teixeira)

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Ou nada sei

Todo mundo ama um dia todo mundo chora,
Um dia a gente chega, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz

Conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs,
É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir

Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir

Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada
Eu vou tocando dias pela longa estrada eu vou
Estrada eu sou

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história,
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz

Conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs,
É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir

Conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs,
É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir

RESUMO

O barbatimão, *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, é uma planta medicinal bem conhecida na medicina tradicional brasileira. Tem sido usado como antiinflamatório, adstringente e cicatrizante desde o século XIX. A alta concentração de taninos condensados nas cascas é a responsável pelos seus efeitos terapêuticos. No presente trabalho, extrato glicólico (EG) e extrato etanólico seco (EES) das cascas foram preparados, por percolação. Foram desenvolvidos métodos extrativo-analíticos para determinação de taninos em insumos de barbatimão, bem como se avaliou a qualidade físico-química da droga vegetal e dos extratos. A droga vegetal, o EG e o EES foram caracterizados por CCD. Os EES foram purificados por partição líquido-líquido apresentando maior concentração de marcadores na fração orgânica do que na fração aquosa. O teor de taninos totais dos extratos foi quantificado por espectrofotometria no ultravioleta (UV, λ 272 nm) e por métodos farmacopeicos espectrofotométricos no visível (Folin Denis, FD, λ 715 nm e Folin-Ciocalteu, FC, λ 760 nm). Os métodos farmacopeicos foram verificados quanto à seletividade, linearidade e precisão e comparados com o método UV, por análise de variância. Um método por CLAE usando modo gradiente linear, em fase reversa (C_{18}), detecção UV em λ 210 nm, foi desenvolvido e validado para quantificação de galocatequina (GC) e de galato de epigalocatequina (GEGC) nos extratos. O método por UV apresentou linearidade na faixa de concentração de 5 a 30 $\mu\text{g/mL}$ com coeficiente de correlação, r 0,9999 (GEGC). Precisão intra-ensaio (DPR 2,06%) e inter-ensaio (DPR 4,68%) foram satisfatórias; exatidão apresentou 99,72% de recuperação (DPR 2,69%); obteve-se limite de detecção, LD, de 0,23 $\mu\text{g/mL}$ e limite de quantificação, LQ, de 0,71 $\mu\text{g/mL}$. O método apresentou-se seletivo e não robusto. O método por CLAE apresentou-se seletivo. A linearidade foi alcançada na faixa de 30 a 330 ng com r 0,9998 (GC), r 0,9986 (GEGC); precisão intra-ensaio, DPR 1,86% (GC) e 1,10% (GEGC), e precisão inter-ensaio, DPR 5,22% (GC) e 2,77% (GEGC) foram satisfatórias; exatidão apresentou 76,50% (DPR 4,53%, GC) e 104,98% (DPR 3,21%, GEGC) de recuperação; obteve-se LD 2,95 ng e LQ 8,94 ng para GC; para GEGC obteve-se, LD 8,81 ng e LQ 26,69 ng. O método apresentou-se robusto para GC e parcialmente robusto para GEGC. A fração orgânica do EES de *S. adstringens* apresentou teor de 1,35% (GC) e 1,32% (GEGC), e do EES de *S. obovatum* 1,22% (GC) e 1,42% (GEGC), por CLAE. Pela determinação de derivados 3-flavonóis nas frações dos extratos secos é possível padronizar os produtos intermediários e obter um melhor controle de qualidade para os produtos acabados.

Palavras-chave: *Stryphnodendron adstringens*; barbatimão; determinação de taninos; extrato etanólico; padronização de extratos; CLAE; UV-VIS.

ABSTRACT

Barbatimão, *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, is a well-known medicinal plant in the Brazilian traditional medicine. It has been used as anti-inflammatory, astringent and wound healing since the 19th century. The high concentration of condensed tannins in the bark is responsible for its therapeutic effects. In the present work, barbatimão bark glicolic (GE) and dry ethanolic extracts (EE) were prepared, by percolation. An extractive-analytical method for determining tannins in barbatimão was developed and physical-chemical quality of barks and extracts were assayed. The bark, GE and EE were characterized by the TLC. EE were purified by liquid-liquid partition presented greater concentration of markers in the organic fraction than in aqueous fraction. Totals tannins in the extracts was quantified by ultraviolet spectrophotometry (UV, λ 272 nm) and by spectrophotometric pharmacopeial visible methods (Folin Denis, FD, λ 715 nm e Folin-Ciocalteu, FC, λ 760 nm). The pharmacopeial methods were checked regarding selectivity, linearity, and accuracy and compared to the UV method, by analysis of variance. A HPLC method using linear gradient mode in reverse phase (C_{18}), UV detection at λ 210 nm, was developed and validated for quantification of gallocatechin (GC) and epigallocatechin gallate (EGCG) in extracts. The UV method presented linearity in the concentration range 5 to 30 $\mu\text{g/mL}$ with correlation coefficient r 0.9999 (EGCG). Intra-assay precision (RSD 2.06%) and inter-assay precision (RSD 4.68%) were satisfactory, meanwhile, the recovery percentage was 99.72% (RSD 2.69%); yielded limit of detection, LOD, of 0.23 $\mu\text{g/mL}$ and limit of quantification, LOQ, of 0.71 $\mu\text{g/mL}$. The method showed to be selective and not robust. The HPLC method showed to be selective. Linearity was achieved in the range from 30 to 330 ng with r 0.9998 (GC), r 0.9986 (EGCG); intra-assay precision, RSD 1.86% (GC) and 1.10% (EGCG), and inter-assay precision, RSD 5.22% (GC) and 2.77% (EGCG) were satisfactory; accuracy presented 76.50% (RSD 4.53% for GC) and 104.98% (RSD 3.21% for EGCG) of recovery; LOD was 2.95 ng and LOQ was 8.94 ng for GC; for EGCG, LOD was 8.81 ng and LOQ was 26.69 ng. The method showed to be robust for GC and partially robust for GEGC. The organic fraction of *S. adstringens* EE showed an amount of 1.35% (GC) and 1.32% (EGCG), and *S. obovatum* EE presented an amount of 1.22% (GC) and 1.42% (EGCG), by HPLC. By determining 3-flavonol derivative markers in the fractions of the dry extracts it is possible to standardize the intermediate products and to perform a better quality control for the finished products.

Keywords: *Stryphnodendron adstringens*; barbatimão; tannins determination; ethanolic extract; extract standardization; HPLC; UV-VIS.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Estruturas do ácido gálico e de flavan-3-óis isolados de <i>Stryphnodendron adstringens</i> | 29 |
| Figura 2 Estruturas de prorobinetinidinas isoladas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> . A letra “a” próxima aos números indica o derivado peracetato..... | 30 |
| Figura 3 Estruturas de flavan-3-óis e prodelfinidinas diméricas isoladas a partir do extrato acetato de etila das cascas secas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> . A letra “a” próxima aos números indica o derivado peracetato..... | 32 |
| Figura 4 Estruturas de prodelfinidinas diméricas isoladas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> . A letra “a” próxima aos números indica o derivado peracetato..... | 33 |
| Figura 5 Estrutura da prodelfinidina dimérica 4'-O-metilgalocatequina-(4 α - \rightarrow 8)-4'-O-metilgalocatequina isolada de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (MELLO <i>et al</i> , 1999)..... | 34 |
| Figura 6 Coleta do material botânico..... | 39 |
| Figura 7 Distribuição granulométrica da droga vegetal (cascas de barbatimão) micronizada em moinho de facas..... | 77 |
| Figura 8 Representação da reação característica de identificação de taninos com gelatina (estrutura típica –Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro-)..... | 78 |
| Figura 9 Reação característica de identificação de taninos com cloreto férrico..... | 79 |
| Figura 10 Reação característica de identificação de taninos com vanilina em meio ácido (a seta pontilhada indica um segundo sítio reacional em potencial). | 79 |
| Figura 11 Perfis em CCD para catequina SQR (C), extrato cetônico (EC) e extrato glicólico purificado (EGP) em cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F ₂₅₄ . Eluente: acetato de etila:tolueno:ácido fórmico:água (80:10:5:5). Reveladores: (a) FeCl ₃ ; (b) vanilina; (c) AlCl ₃ , UV λ 365 nm e (d) NP-PEG, UV λ 365 nm..... | 82 |
| Figura 12 Perfis em CCD para catequina SQR (C), extrato cetônico (EC) e extrato glicólico purificado (EGP) em cromatofolha de alumínio de sílica gel 60 F ₂₅₄ . Eluentes: tolueno:acetona:ácido fórmico (3:3:1) e tolueno:acetona:ácido acético (3:3:1). Reveladores: (a) FeCl ₃ e (b) vanilina. | 84 |
| Figura 13 Perfis em CCD para catequina (C), extrato cetônico (EC) e extrato glicólico purificado (EGP) em cromatofolha de alumínio de sílica gel 60 F ₂₅₄ . Eluentes: CHCl ₃ ; CHCl ₃ :acetato de etila (60:40) e CHCl ₃ acetona: ácido fórmico (75:16,5:8,5). Reveladores: (a) FeCl ₃ e (b) vanilina. | 85 |
| Figura 14 Perfis em CCD para catequina (C), extrato cetônico (EC) e extrato glicólico purificado (EGP) em cromatofolha de alumínio de sílica gel 60 F ₂₅₄ . Eluentes: acetona; acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água (100:11:11:26); metanol e tolueno:acetona:ácido fórmico (3:1:1). Reveladores: (a) FeCl ₃ e (b) vanilina. | 86 |
| Figura 15 Perfis em CCD para ácido gálico (AG), galocatequina (G), epigalocatequina (EGC), catequina (C), proantocianidina B2 (P), galato de epigalocatequina (GEGC), quercetina (Q), extrato etanólico seco (EES) e ponto misto (M) em cromatofolha de | |

| | |
|--|-----|
| alumínio de sílica gel 60 F ₂₅₄ . Eluente: acetato de etila:tolueno:ácido fórmico:água (80:10:5:5). Revelador: FeCl ₃ 1% (p/V)..... | 94 |
| Figura 16 Perfis em CCD para ácido gálico (AG), galocatequina (GC), epigalocatequina (EGC), catequina (C), proantocianidina B2 (P), galato de epigalocatequina (GEGC), quercetina (Q), extrato etanólico seco (EES) e ponto misto (M) em cromatofolha de alumínio de sílica gel 60 F ₂₅₄ . Eluente: butanol, ácido acético e água (50:10:40). Revelador: FeCl ₃ 1% (p/V)..... | 95 |
| Figura 17 Proposta de reação química de oxidação da catequina com a redução do molibdênio do reagente fosfomolibdotúngstico gerando espécies azuis, tais como (PMoW ₁₁ O ₄₀) ⁴⁻ | 96 |
| Figura 18 Sobreposição de espectros: (a) pirogalol antes (2,5 µg/mL, vermelho) e após reação com reagente Folin-Denis (3,5 µg/mL, preto); (b) extrato etanólico seco 8 µg/mL (preto), extrato etanólico seco após agitação com pó-de-pele (40 µg/mL, vermelho) e pirogalol 2,5 µg/mL (azul), todos após reação com reagente Folin-Denis..... | 98 |
| Figura 19 Curva analítica obtida pelo método de Folin-Denis para o pirogalol a λ 715 nm. | 99 |
| Figura 20 Distribuição dos resíduos da curva analítica para a determinação de pirogalol por Folin-Denis. | 100 |
| Figura 21 Sobreposição de espectros: (a) pirogalol antes (2,5 µg/mL, vermelho) e após reação com reagente Folin-Ciocalteu (3,0 µg/mL, preto); (b) extrato etanólico seco 6,4 µg/mL (vermelho), extrato etanólico seco após agitação com pó-de-pele (32 µg/mL, azul) e pirogalol 2,0 µg/mL (preto), todos após reação com reagente Folin-Ciocalteu..... | 104 |
| Figura 22 Curva de analítica obtida pelo método de Folin-Ciocalteu para a catequina λ 760 nm..... | 105 |
| Figura 23 Distribuição dos resíduos da curva analítica para a determinação de pirogalol por Folin-Ciocalteu. | 106 |
| Figura 24 Espectros de padrões na região ultravioleta faixa λ 200 a 800 nm obtidos por meio de detector UV/DAD acoplado ao cromatógrafo; a: ombro..... | 110 |
| Figura 25 Espectros de extrato etanólico seco (50 µg/mL) em solução hidroalcolica antes (preto e vermelho) e após (azul) a precipitação com pó-de-pele na região ultravioleta faixa λ 200 a 400 nm. | 111 |
| Figura 26 Sobreposição dos espectros de extrato etanólico seco 50 µg/mL antes de reagir com pó-de-pele (preto), extrato etanólicos seco 250 µg/mL após reação com pó-de-pele (vermelho) e galato de epigalocatequina 15 µg/mL (azul). | 113 |
| Figura 27 Curva analítica obtida pelo método de espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm para galato de epigalocatequina | 114 |
| Figura 28 Distribuição dos resíduos da curva analítica obtida pelo método de espectrofotometria na região ultravioleta para a determinação de galato de epigalocatequina, λ 272 nm. | 115 |

| | |
|--|-----|
| Figura 29 Cromatograma inicial obtido por eluição em gradiente exploratório amplo: 5% a 95% acetonitrila (ACN), 60 min, para extrato etanólico seco de <i>S. adstringens</i> a 10 mg/mL em metanol 10% V/V; volume de injeção 10 µL; fase móvel ACN:água (5:95) acidificados com ácido fosfórico 0,1% (V/V); fluxo 1 mL/min; 40 °C; detecção λ 210 nm..... | 124 |
| Figura 30 Cromatograma inicial obtido por eluição em gradiente linear: 5% a 40% acetonitrila (ACN), 60 min, para extrato etanólico seco de <i>S. adstringens</i> a 10 mg/mL em metanol 10% V/V; volume de injeção 10 µL; fase móvel ACN:água (5:95) acidificados com ácido fosfórico 0,1% (V/V); fluxo 1 mL/min; 40 °C; detecção λ 210 nm. ... | 125 |
| Figura 31 Cromatograma obtido por eluição em gradiente linear: 5% a 40% acetonitrila (ACN), 60 min, para a fração orgânica de <i>S. adstringens</i> a 1 mg/mL em metanol 10% V/V; volume de injeção 2,5 µL; fase móvel ACN:água (5:95) acidificados com ácido fosfórico 0,1% (V/V); fluxo 1 mL/min; 40 °C; detecção λ 210 nm. Amostra de partida 250 mg de extrato etanólico seco de <i>S. adstringens</i> | 126 |
| Figura 32 Cromatograma obtido por eluição em gradiente linear: 5% a 40% acetonitrila (ACN), 60 min, para a fração aquosa de <i>S. adstringens</i> a 1 mg/mL em metanol 10% V/V; volume de injeção 2,5 µL; fase móvel ACN:água (5:95) acidificados com ácido fosfórico 0,1% (V/V); fluxo 1 mL/min; 40 °C; detecção λ 210 nm. Amostra de partida 250 mg de extrato etanólico seco de <i>S. adstringens</i> | 127 |
| Figura 33 Sobreposição dos espectros de absorção no infravermelho da fração orgânica I (preta), fração orgânica II (azul) e fração aquosa (vermelho). | 128 |
| Figura 34 Cromatograma obtido por eluição em gradiente linear: 5% a 40% acetonitrila (ACN), 60 min, para o extrato etanólico seco de <i>S. adstringens</i> a 1 mg/mL em metanol 10% V/V; volume de injeção 5 µL; fase móvel ACN:água (5:95) acidificados com ácido fosfórico 0,1% (V/V); fluxo 1 mL/min; 40 °C; detecção λ 210 nm. Amostra de partida 250 mg de extrato etanólico seco de <i>S. adstringens</i> | 131 |
| Figura 35 Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico seco de <i>S. adstringens</i> a 1 mg/mL em metanol 10% V/V; volume de injeção 5 µL; sem adição de padrões (linha cheia) e após adição dos padrões (linha tracejada): (1) ácido gálico, (2) galocatequina, (3) epigalocatequina, (4) catequina, (5) proantocianidina B2, (6) galato de epigalocatequina e (7) quercetina..... | 132 |
| Figura 36 Cromatograma dos padrões reunidos em solução (0,1 mg/mL cada em metanol, volume de injeção 2 µL) e espectros ultravioleta de proantocianidina B2 e quercetina..... | 134 |
| Figura 37 Curvas analíticas obtidas em dois dias diferentes por CLAE para galocatequina. | 135 |
| Figura 38 Distribuição dos resíduos das curvas analíticas (dia 1 e dia 2) para a determinação de galocatequina por CLAE..... | 136 |
| Figura 39 Curvas analíticas obtidas em dois dias diferentes por CLAE para galato de epigalocatequina..... | 137 |
| Figura 40 Distribuição dos resíduos das curvas analíticas (dia 1 e dia 2) para a determinação de galato de epigalocatequina por CLAE..... | 138 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 Ácido gálico e flavan-3-óis isolados a partir do extrato acetato de etila das cascas secas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (MELLO <i>et al.</i> , 1993, 1997) | 29 |
| Tabela 2 Prorobinetinidinas diméricas isoladas a partir do extrato acetato de etila das cascas secas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (MELLO <i>et al.</i> , 1996b, 1997) | 31 |
| Tabela 3 Flavan-3-óis e prodelfinidinas diméricas isoladas a partir do extrato acetato de etila das cascas secas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (MELLO <i>et al.</i> , 1996a, 1997) | 32 |
| Tabela 4 Prodelfinidinas diméricas isoladas a partir do extrato acetato de etila das cascas secas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (MELLO <i>et al.</i> , 1996a, 1997) | 33 |
| Tabela 5 Material botânico | 39 |
| Tabela 6 Relação de substâncias químicas de referência (SQR) utilizadas | 40 |
| Tabela 7 Classificação de tamises utilizados na análise granulométrica dos pós da casca de barbatimão..... | 44 |
| Tabela 8 Sistemas eluentes alternativos para análise de extratos de cascas de barbatimão por CCD em sílica gel | 46 |
| Tabela 9 Quantidades de amostra e de solventes utilizados para avaliação da solubilidade..... | 50 |
| Tabela 10 Termos descritivos para expressar a solubilidade..... | 50 |
| Tabela 11 Construção da curva analítica de pirogalol, por espectrofotometria na região visível, λ 715 nm após reação com RFD para doseamento de taninos totais (triplicata, abrigo da luz) (FARMACOPÉIA, 2002) | 54 |
| Tabela 12 Construção da curva analítica de pirogalol, por espectrofotometria na região visível, λ 760 nm após reação com RFC para doseamento de taninos totais (triplicata, abrigo da luz) (EUROPEAN, 2007) | 57 |
| Tabela 13 Construção da curva analítica para galato de epigalocatequina por espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm..... | 61 |
| Tabela 14 Preparo das soluções fortificadas de galato de epigalocatequina para avaliação da exatidão por espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm..... | 63 |
| Tabela 15 Condições cromatográficas para a corrida exploratória em gradiente para determinação de taninos em insumos ou produtos vegetais (barbatimão <i>S. adstringens</i> (Martius) Coville)..... | 66 |
| Tabela 16 Composição do sistema de solvente utilizado para pré-purificação do extrato etanólico seco de barbatimão por partição líquido-líquido..... | 67 |
| Tabela 17 Construção da curva analítica para galocatequina e galato de epigalocatequina por CLAE-UV/DAD a partir de solução padrão única de GC e de GEGC contendo 10 μ g/mL em metanol 10% V/V para cada marcador químico..... | 69 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 18 Preparo das amostras de extrato etanólico seco fortificadas com GC e GEGC, adicionados antes da pré-purificação, para avaliação da exatidão por CLAE | 71 |
| Tabela 19 Preparo das soluções de fração orgânica fortificadas com GC e GEGC, adicionados após a pré-purificação, para avaliação da exatidão por CLAE | 72 |
| Tabela 20 Condições cromatográficas usuais para análise de extratos de barbatimão | 74 |
| Tabela 21 Resultados da análise granulométrica da droga vegetal micronizada por meio de tamisação..... | 77 |
| Tabela 22 Valores de R_f para catequina SQR e amostras de extratos de barbatimão em cromatofolhas de sílica gel 60 F ₂₅₄ (FARMACOPÉIA, 2002)..... | 83 |
| Tabela 23 Valores de R_f para catequina SQR e amostras de extratos de barbatimão obtidos com diferentes reveladores e sistemas eluentes, sílica gel 60 F ₂₅₄ em cromatofolhas de alumínio..... | 84 |
| Tabela 24 Valores de perda por dessecação da droga vegetal (105 °C, 5 h) | 87 |
| Tabela 25 Valores de cinzas totais obtidos para a droga vegetal | 88 |
| Tabela 26 Solubilidade do extrato glicólico e do extrato etanólico seco de barbatimão em diferentes solventes de acordo com termos descritivos da Farmacopéia Brasileira 4 ^a edição..... | 89 |
| Tabela 27 Determinação de pH (triplicata) da dispersão a 10% em água e em solução hidroalcolólica dos extratos de barbatimão | 90 |
| Tabela 28 Teor de resíduo seco (105 °C, 3 h) para os extratos de barbatimão | 91 |
| Tabela 29 Valores de densidade relativa para amostras de extrato glicólico de barbatimão..... | 92 |
| Tabela 30 Valores de R_f para padrões e amostra de extrato etanólico seco de barbatimão obtidos em cromatofolhas de sílica gel 60 F ₂₅₄ . Revelador: FeCl ₃ 1% (p/V) em metanol..... | 95 |
| Tabela 31 Resultados obtidos para a construção da curva de calibração para pirogaloil após reação com reagente de Folin-Denis..... | 99 |
| Tabela 32 Concentrações de amostras de extrato etanólico seco utilizadas para avaliação da precisão intra-corrída do método Folin-Denis..... | 101 |
| Tabela 33 Concentrações de polifenóis totais (PT) e de polifenóis não adsorvidos (PNA) obtidos da curva analítica de Folin-Denis, respectivos teores e teor de taninos totais (TT) para precisão intra-corrída..... | 101 |
| Tabela 34 Concentrações de amostras de extrato etanólico seco utilizadas para avaliação da precisão inter-corrída do método Folin-Denis..... | 102 |
| Tabela 35 Concentrações de polifenóis totais (PT) e de polifenóis não adsorvidos (PNA) obtidos da curva analítica de Folin-Denis, respectivos teores e teor de taninos totais (TT) para precisão inter-corrída..... | 103 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 36 Resultados obtidos para a construção da curva de calibração para pirogalol após reação com reagente de Folin-Ciocalteu | 105 |
| Tabela 37 Concentrações de amostras de extrato etanólico seco utilizadas para avaliação da precisão intra-corrída do método de Folin-Ciocalteu | 107 |
| Tabela 38 Concentrações de polifenóis totais (PT) e de polifenóis não adsorvidos (PNA) obtidos da curva analítica de Folin-Ciocalteu, respectivos teores e teor de taninos totais (TT) para precisão intra-corrída..... | 107 |
| Tabela 39 Concentrações de amostras de extrato etanólico seco utilizadas para avaliação da precisão inter-corrída do método de Folin-Ciocalteu | 108 |
| Tabela 40 Concentrações de polifenóis totais (PT) e de polifenóis não adsorvidos (PNA) obtidos da curva analítica de Folin-Ciocalteu, respectivos teores e teor de taninos totais (TT) para precisão inter-corrída..... | 108 |
| Tabela 41 Resultados obtidos para a construção da primeira curva analítica para o galato de epigalocatequina por espectrofotometria na região ultravioleta λ 272 nm | 114 |
| Tabela 42 Concentrações de amostras de extrato etanólico seco de <i>S. adstringens</i> utilizadas para avaliação da precisão intra-corrída por espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm..... | 116 |
| Tabela 43 Teores de polifenóis totais (PT) e de polifenóis não adsorvidos (PNA) obtidos por espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm, e teor de taninos totais (TT) para precisão intra-corrída | 116 |
| Tabela 44 Concentrações de amostras de extrato etanólico seco de <i>S. adstringens</i> utilizadas para avaliação da precisão inter-corrída por espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm..... | 117 |
| Tabela 45 Concentrações de polifenóis totais (PT) e de polifenóis não adsorvidos (PNA) obtidos da curva analítica do método alternativo UV, respectivos teores e teor de taninos totais (TT) para precisão inter-corrída de <i>S. adstringens</i> | 118 |
| Tabela 46 Resultados de exatidão obtidos por espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm, para galato de epigalocatequina em amostras de extrato etanólico seco de <i>S. adstringens</i> | 119 |
| Tabela 47 Resultados da robustez obtidos por espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm para determinação de taninos totais em extrato etanólico seco | 120 |
| Tabela 48 Comparação das determinações de taninos totais de extrato etanólico seco por avaliação espectrofotométrica | 121 |
| Tabela 49 Resultados de doseamento ($n = 3$) obtido por espectrofotometria na região ultravioleta para diferentes espécies e amostras de extratos de barbatimão | 122 |
| Tabela 50 Condições cromatográficas pré-otimizadas em gradiente para determinação de taninos em insumos ou produtos vegetais (barbatimão <i>S. adstringens</i> (Martius) Coville) | 124 |
| Tabela 51 Atribuições das principais bandas de absorção das frações purificadas do extrato etanólico seco de <i>S. adstringens</i> na região do infravermelho (4000 a 650 cm^{-1}).... | 128 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 52 Parâmetros cromatográficos obtidos para catequina SQR 1 mg/mL em metanol, volume de injeção 1 µL, em diferentes composições de fase móvel..... | 129 |
| Tabela 53 Condições cromatográficas em gradiente otimizadas para análise de extratos de barbatimão | 130 |
| Tabela 54 Resultados dos parâmetros cromatográficos obtidos para os padrões reunidos em solução por CLAE | 133 |
| Tabela 55 Resultados obtidos para a construção das curvas analíticas para determinação de galocatequina por CLAE..... | 135 |
| Tabela 56 Resultados obtidos para a construção da curva analítica para galato de epigalocatequina por CLAE | 137 |
| Tabela 57 Teores de galocatequina (GC) e de galato de epigalocatequina (GEGC) obtidos para precisão intra-corrída..... | 139 |
| Tabela 58 Teores de galocatequina (GC) e de galato de epigalocatequina (GEGC) obtidos para precisão inter-corrída com mesmo analista. | 140 |
| Tabela 59 Teores de galocatequina (GC) e de galato de epigalocatequina (GEGC) obtidos para precisão inter-corrída com analistas diferentes..... | 141 |
| Tabela 60 Resultados de exatidão para quantificação de GC e de GEGC, adicionados antes do processo de pré-purificação, em amostras de extrato etanólico seco de <i>S. adstringens</i> por CLAE..... | 142 |
| Tabela 61 Resultados de exatidão para quantificação de GC e de GEGC, adicionados após o processo de pré-purificação, em amostras de fração orgânica de extrato etanólico seco de <i>S. adstringens</i> por CLAE | 143 |
| Tabela 62 Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os marcadores químicos analisados estimados pelas curvas analíticas. | 144 |
| Tabela 63 Resultados das determinações de marcadores químicos na fração orgânica de extrato etanólico seco de <i>S. adstringens</i> para avaliação da robustez do método por CLAE | 145 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|----------------|---|
| ACN | Acetonitrila |
| AG | Ácido gálico |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| C | Catequina |
| CCD | Cromatografia em camada delgada |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CV | Coefficiente de variação |
| DAD | Detector de arranjo de diodos |
| d.p. | Desvio padrão |
| DPR | Desvio padrão relativo |
| EC | Extrato cetônico |
| EGC | Epigalocatequina |
| EGP | Extrato glicólico purificado |
| FAFAR/UFMG | Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais |
| GC | Galocatequina |
| GEGC | Galato de epigalocatequina |
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> |
| ICH | <i>International Conference on Harmonization</i> |
| k | Fator de retenção |
| NP-PEG | Ácido difenilboriloxietilamínico 1% (p/V) em metanol (NP) e polietilenoglicol 4000 5% (p/V) em etanol (PEG) |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| p/p | Peso por peso |
| p/V | Peso por volume |
| P | Proantocianidina B2 |
| PA | Para análise |
| PEG | Polietilenoglicol |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| pKa | Logaritmo negativo da constante de dissociação de ácido |
| PLL | Partição líquido-líquido |
| Q | Quercetina |
| R | Resolução |
| r | Coefficiente de correlação |
| r ² | Coefficiente de determinação |
| R _f | Fator de retenção |

| | |
|-------|----------------------------------|
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| RE | Resolução Específica |
| RFC | Reagente Folin-Ciocalteu |
| RFD | Reagente Folin-Denis |
| SQR | Substância química de referência |
| SR | Solução reagente |
| T | Fator de cauda |
| TLC | <i>Thin layer chromatography</i> |
| t_0 | Tempo morto |
| UV | Ultravioleta |
| V/V | Volume por volume |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 23 |
| 2 OBJETIVOS | 26 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 26 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 26 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 27 |
| 3.1 DESCRIÇÃO VEGETAL | 27 |
| 3.2 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA | 28 |
| 3.3 AÇÕES FARMACOLÓGICAS | 35 |
| 3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE TANINOS CONDENSADOS | 36 |
| 3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) | 38 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| 4.1 MATERIAL | 39 |
| 4.1.1 Amostras botânicas | 39 |
| 4.1.2 Substâncias químicas de referência | 40 |
| 4.1.3 Reagentes e outros materiais | 40 |
| 4.1.4 Reveladores para cromatografia em camada delgada (CCD) | 41 |
| 4.1.4.1 Cloreto férrico 1% (p/V) em metanol | 41 |
| 4.1.4.2 Ácido difenilboriloxietilamínico 1% (p/V) em metanol (NP) e polietilenoglicol 4000 5% (p/V) em etanol (PEG) (NP-PEG) | 41 |
| 4.1.4.3 Cloreto de alumínio 5% (p/V) em metanol | 42 |
| 4.1.4.4 Vanilina 1% (p/V) em etanol e ácido sulfúrico 5% (V/V) em etanol | 42 |
| 4.1.5 Equipamentos | 42 |
| 4.2 MÉTODOS | 43 |
| 4.2.1 Controle de qualidade da droga vegetal | 43 |
| 4.2.1.1 Secagem, divisão e aspecto da droga vegetal | 43 |
| 4.2.1.2 Avaliação dos caracteres organolépticos | 43 |
| 4.2.1.3 Determinação da granulometria do pó da droga vegetal | 43 |
| 4.2.1.4 Testes de identificação | 44 |
| 4.2.1.5 Cromatografia em camada delgada | 45 |
| 4.2.1.5.1 <i>Sistema eluente conforme Farmacopéia Brasileira 4ª edição</i> | 45 |
| 4.2.1.5.2 <i>Sistemas eluentes alternativos</i> | 46 |
| 4.2.1.6 Material estranho | 46 |
| 4.2.1.7 Determinação de água | 47 |
| 4.2.1.8 Cinzas totais (V.4.2.4) | 47 |
| 4.2.2 Preparação de extratos glicólicos (EG) de barbatimão | 47 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 4.2.2.1 | Preparação do solvente extrator | 47 |
| 4.2.2.2 | Pó da droga vegetal para o preparo dos extratos glicólicos | 47 |
| 4.2.2.3 | Preparação dos extratos glicólicos | 48 |
| 4.2.3 | Preparação do extrato etanólico seco (EES) de barbatimão..... | 48 |
| 4.2.3.1 | Preparação da droga vegetal..... | 48 |
| 4.2.3.2 | Preparação dos extratos etanólicos..... | 48 |
| 4.2.4 | Controle de qualidade dos extratos da droga vegetal..... | 49 |
| 4.2.4.1 | Avaliação dos caracteres organolépticos..... | 49 |
| 4.2.4.2 | Avaliação da solubilidade | 49 |
| 4.2.4.3 | Avaliação do pH | 50 |
| 4.2.4.4 | Resíduo seco | 51 |
| 4.2.4.5 | Determinação da densidade relativa..... | 51 |
| 4.2.4.6 | Reações de identificação..... | 51 |
| 4.2.4.7 | Cromatografia em camada delgada..... | 52 |
| 4.2.4.7.1 | <i>Extrato glicólico.....</i> | <i>52</i> |
| 4.2.4.7.2 | <i>Extrato etanólico seco.....</i> | <i>53</i> |
| 4.2.5 | Aplicação de métodos analíticos farmacopeicos para quantificação de taninos totais..... | 53 |
| 4.2.5.1 | Método espectrofotométrico na região visível (λ 715 nm) utilizando reagente Folin-Denis (RFD) para quantificação de taninos totais em extratos de barbatimão, de acordo com Farmacopéia Brasileira 4ª edição | 53 |
| 4.2.5.1.1 | <i>Seletividade</i> | <i>53</i> |
| 4.2.5.1.2 | <i>Linearidade.....</i> | <i>53</i> |
| 4.2.5.1.3 | <i>Precisão Intra-corrída e Inter-corrída.....</i> | <i>54</i> |
| 4.2.5.2 | Método espectrofotométrico na região visível (λ 760 nm) utilizando reagente Folin-Ciocalteau (RFC) para quantificação de taninos totais em extratos de barbatimão, de acordo com Farmacopéia Européia 6ª edição. | 56 |
| 4.2.5.2.1 | <i>Seletividade</i> | <i>56</i> |
| 4.2.5.2.2 | <i>Linearidade.....</i> | <i>56</i> |
| 4.2.5.2.3 | <i>Precisão Intra-corrída e Inter-corrída.....</i> | <i>57</i> |
| 4.2.6 | Desenvolvimento e validação de método analítico alternativo por espectrofotometria na região ultravioleta para quantificação de taninos totais em extratos de barbatimão | 59 |
| 4.2.6.1 | Seleção e otimização das condições analíticas | 59 |
| 4.2.6.2 | Validação do método analítico por espectrofotometria na região ultravioleta..... | 60 |
| 4.2.6.2.1 | <i>Seletividade</i> | <i>60</i> |
| 4.2.6.2.2 | <i>Linearidade.....</i> | <i>61</i> |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 4.2.6.2.3 | <i>Precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio</i> | 61 |
| 4.2.6.2.4 | <i>Exatidão</i> | 63 |
| 4.2.6.2.5 | <i>Limite de detecção e limite de quantificação</i> | 64 |
| 4.2.6.2.6 | <i>Robustez</i> | 64 |
| 4.2.7 | Desenvolvimento, validação e aplicação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de galocatequina e galato de epigalocatequina em extratos de barbatimão | 65 |
| 4.2.7.1 | Desenvolvimento do método e otimização das condições cromatográficas..... | 65 |
| 4.2.7.2 | Pré-purificação das amostras de extrato etanólico seco de barbatimão..... | 67 |
| 4.2.7.2.1 | <i>Caracterização das frações orgânicas por espectrofotometria de absorção no infravermelho</i> | 68 |
| 4.2.7.3 | Validação do método analítico por CLAE..... | 68 |
| 4.2.7.3.1 | <i>Seletividade</i> | 68 |
| 4.2.7.3.2 | <i>Linearidade</i> | 69 |
| 4.2.7.3.3 | <i>Precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio</i> | 70 |
| 4.2.7.3.4 | <i>Exatidão</i> | 70 |
| 4.2.7.3.5 | <i>Limite de detecção e limite de quantificação</i> | 73 |
| 4.2.7.3.6 | <i>Robustez</i> | 73 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 75 |
| 5.1 | CONTROLE DE QUALIDADE DA DROGA VEGETAL..... | 75 |
| 5.1.1 | Operações de secagem e de divisão da droga vegetal | 75 |
| 5.1.2 | Avaliação dos caracteres organolépticos | 75 |
| 5.1.3 | Determinação da granulometria dos pós da droga vegetal | 76 |
| 5.1.4 | Reações de identificação | 78 |
| 5.1.5 | Cromatografia em camada delgada | 80 |
| 5.1.5.1 | Sistema eluente conforme Farmacopéia Brasileira 4ª edição..... | 80 |
| 5.1.5.2 | Método com sistemas eluentes alternativos..... | 83 |
| 5.1.6 | Material estranho | 86 |
| 5.1.7 | Determinação de Água | 87 |
| 5.1.8 | Cinzas totais | 87 |
| 5.2 | CONTROLE DE QUALIDADE DOS EXTRATOS DA DROGA VEGETAL..... | 88 |
| 5.2.1 | Avaliação dos caracteres organolépticos | 88 |
| 5.2.2 | Avaliação da solubilidade | 89 |
| 5.2.3 | Avaliação do pH | 90 |
| 5.2.4 | Resíduo seco | 91 |
| 5.2.5 | Determinação da densidade relativa | 92 |
| 5.2.6 | Reações de identificação | 92 |

| | |
|--|------------|
| 5.2.7 Cromatografia em camada delgada | 93 |
| 5.2.7.1 Extrato glicólico | 93 |
| 5.2.7.2 Extrato etanólico seco | 93 |
| 5.3 APLICAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS FARMACOPEICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS TOTAIS | 96 |
| 5.3.1 Método espectrofotométrico na região visível (λ 715 nm) utilizando reagente Folin-Denis para quantificação de taninos totais em extratos de barbatimão, de acordo com Farmacopéia Brasileira 4ª edição | 97 |
| 5.3.1.1 Seletividade..... | 97 |
| 5.3.1.2 Linearidade..... | 98 |
| 5.3.1.3 Precisão Intra-corrída e Inter-corrída | 101 |
| 5.3.2 Método espectrofotométrico na região visível (λ 760 nm) utilizando reagente Folin-Ciocalteau para quantificação de taninos totais em extratos de barbatimão, de acordo com Farmacopéia Européia 6ª edição | 103 |
| 5.3.2.1 Seletividade..... | 103 |
| 5.3.2.2 Linearidade..... | 104 |
| 5.3.2.3 Precisão Intra-corrída e Inter-corrída | 106 |
| 5.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO ALTERNATIVO POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO ULTRAVIOLETA PARA QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS TOTAIS EM EXTRATOS DE BARBATIMÃO | 109 |
| 5.4.1 Seleção e otimização das condições analíticas..... | 109 |
| 5.4.2 Validação do método analítico por espectrofotometria na região ultravioleta..... | 112 |
| 5.4.2.1 Seletividade..... | 112 |
| 5.4.2.2 Linearidade..... | 113 |
| 5.4.2.3 Precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio | 115 |
| 5.4.2.4 Exatidão | 118 |
| 5.4.2.5 Limite de detecção e limite de quantificação..... | 119 |
| 5.4.2.6 Robustez | 120 |
| 5.4.3 Comparação entre os métodos oficiais e o método espectrofotométrico na região ultravioleta para determinação de taninos totais..... | 120 |
| 5.4.4 Doseamento dos extratos de barbatimão por espectrofotometria na região ultravioleta, método alternativo..... | 122 |
| 5.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DE GALOCATEQUINA E DE GALATO DE EPIGALOCATEQUINA EM EXTRATOS DE BARBATIMÃO | 123 |

| | |
|---|------------|
| 5.5.1 Desenvolvimento do método cromatográfico | 123 |
| 5.5.2 Pré-purificação das amostras de extrato etanólico seco de <i>S. adstringens</i> por partição líquido-líquido | 125 |
| 5.5.2.1 Caracterização das frações por espectrofotometria de absorção no infravermelho..... | 127 |
| 5.5.3 Otimização das condições cromatográficas | 129 |
| 5.5.4 Validação do método analítico por CLAE | 132 |
| 5.5.4.1 Seletividade..... | 133 |
| 5.5.4.2 Linearidade..... | 134 |
| 5.5.4.3 Precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio | 139 |
| 5.5.4.4 Exatidão | 141 |
| 5.5.4.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)..... | 144 |
| 5.5.4.6 Robustez | 145 |
| 5.5.5 Doseamento do extrato de <i>S. obovatum</i> por CLAE | 146 |
| 6 CONCLUSÕES | 147 |
| REFERÊNCIAS | 149 |

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais e da fitoterapia vem se expandindo em todo o mundo sendo uma conseqüência, dentre outros fatores, do alto custo dos medicamentos industrializados e da falta de uma assistência médica e farmacêutica eficazes. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 65 a 80% da população mundial, presente nos países em desenvolvimento (Ásia, África e América Latina) depende da medicina caseira, especialmente a partir do uso de plantas, para seus cuidados primários de saúde. Mesmo assim, poucas espécies de vegetais foram avaliadas visando sua transformação em medicamento fitoterápico (WORLD, 1999).

O desenvolvimento de fitoterápicos é um processo difícil e oneroso que envolve diferentes áreas como: botânica, química e farmacologia, incluindo a toxicologia. Outras áreas do conhecimento também podem estar envolvidas ao longo do processo, tais como antropologia, agronomia, biotecnologia e química orgânica, além da tecnologia farmacêutica e do controle de qualidade (RATES, 2001). A área de controle de qualidade tem um papel fundamental no desenvolvimento de métodos analíticos validados para análise das matérias-primas (drogas vegetais), dos produtos intermediários e dos produtos acabados produzidos a partir destas plantas medicinais. Estes métodos analíticos validados podem ainda constituir monografias farmacopeicas e serem inseridas em compêndios oficiais. As monografias farmacopeicas, portanto, têm como objetivo prover informação científica sobre o controle de qualidade das matérias-primas e dos produtos acabados (WORLD, 1999). No Brasil, existem critérios para a redação dos textos das monografias farmacopeicas, preconizados no Guia para a Redação das Monografias da Farmacopéia Brasileira – Quinta Edição, buscando-se harmonizar e tornar mais objetiva a linguagem adotada nos procedimentos (AGÊNCIA, 2005).

Portanto, a definição de normas para garantir a segurança, qualidade e eficácia das plantas medicinais e dos fitoterápicos tornou-se um objetivo importante, principalmente nos países em desenvolvimento.

A produção de fitoterápicos com plantas nativas é importante e constitui a principal estratégia para proteção e valorização da flora brasileira (BRANDÃO *et al.*, 2006). Para tanto, a eficácia deve ser comprovada e a toxicidade avaliada, bem como devem ser desenvolvidos e validados métodos analíticos para o controle de qualidade das drogas vegetais, dos produtos intermediários e dos produtos acabados.

No Brasil, alguns instrumentos de normatização buscam este objetivo, tais como:

- a Política Nacional de Medicamentos a qual apóia as pesquisas que visem o aproveitamento do potencial da flora e fauna nacionais, enfatizando a certificação de suas propriedades medicamentosas (BRASIL, 1998);

- a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS a qual objetiva ampliar as opções terapêuticas aos usuários do SUS, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade (BRASIL, 2006b); e
- o Decreto Presidencial nº 5.813, de 22 de junho de 2006 o qual elabora a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e garante à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006a).

As preparações fitoterápicas são muito usadas também em dermatologia e no tratamento de feridas. A eficiência de alguns agentes fitoterápicos, usados na medicina tradicional, vem sendo avaliada e confirmada por meio de pesquisas desenvolvidas em todo o mundo. Produtos contendo extratos de arnica (*Arnica montana*) (LYSS *et al.*, 1997), calêndula (*Calendula officinalis*) (KLOUCHEK-POPOVA, *et al.*, 1982; WAGNER *et al.*, 1985; CARVALHO *et al.*, 1991; LOGGIA *et al.*, 1994), hamamelis (*Hamamelis virginiana*) (HUGHES-FORMELLA *et al.*, 1998), babosa (*Aloe vera*) (HEGGERS *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1996; CHITHRA *et al.*, 1998a, 1998b; CHOI *et al.*, 2001; KRISHNAN, 2006) e *Datura alba* (PRIYA *et al.*, 2002) por exemplo, apresentam atividades farmacológicas devidamente estabelecidas. As folhas de tanchagem (*Plantago sp.*) são utilizadas como agente antimicrobiano, cicatrizante e antiinflamatório. Estudos recentes vêm demonstrando a eficácia da planta no tratamento de feridas devido à presença de mucopolissacarídeos com atividade cicatrizante e preventiva da formação de escaras. Estudos *in vitro* demonstraram que a aderência das bactérias aos polissacarídeos, associada à absorção de fluido e estimulação dos macrófagos, pode estar relacionada à atividade (SAMUELSEN, 2000; SCHMIDGALL, 2000; WESTERHOF *et al.*, 2000). Outros estudos demonstraram que as folhas de *Plantago ovata* e *Plantago major* apresentam polissacarídeos com atividade imunoestimulante, que também deve contribuir no mecanismo de ação antiinflamatório e antimicrobiano (GOMEZ-FLORES, 2000; HETLAND, 2000). Obaseiki-Ebor (1985) e Nassis *et al.* (1992) relatam que as folhas das espécies do gênero *Bryophyllum*, conhecidas popularmente como bálsamo, também possuem atividades anti-histamínica e antimicrobiana que podem estar relacionadas à ação cicatrizante.

Dentre as plantas mais utilizadas na medicina popular brasileira para o tratamento das feridas estão as cascas da espécie *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, comumente conhecida como barbatimão. O histórico de uso desta planta na medicina tradicional, no Brasil, é vasto sendo descrito desde o século XIX por naturalistas que percorreram a região da Estrada Real em Minas Gerais (BRANDÃO; MONTE-MÓR, 2007; BRANDÃO *et al.*, 2008).

O uso atual da planta pode ser observado em um levantamento realizado junto aos pacientes da clínica de cirurgia plástica do Hospital Público Regional de Betim (MG) o qual revelou que o barbatimão é uma das plantas medicinais mais utilizadas pela população de baixa renda para o tratamento de feridas (CHAMPS *et al.*, 2003). Esta pesquisa foi realizada em parceria entre o Laboratório de Farmacognosia/Departamento de Produtos Farmacêuticos e o Departamento de Farmácia Social, todos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAFAR/UFMG) e o Departamento de Morfologia/Instituto de Ciências Biológicas também da UFMG.

No mercado brasileiro não existem especialidades farmacêuticas produzidas com barbatimão registradas na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a despeito da existência de estudos científicos comprovando a sua ação no tratamento de feridas crônicas.

A ANVISA regulamenta por meio da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48, de 16 de março de 2004, o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Esta resolução exige no ato do protocolo de pedido de registro, a apresentação de relatório contendo, dentre outras informações técnicas (BRASIL, 2006b):

- Relatório de controle de qualidade, incluindo análise qualitativa e quantitativa dos princípios ativos e/ou marcadores, quando conhecidos, ou classe de compostos químicos característicos da espécie;
- Controle de qualidade do produto acabado, apresentando resultado da prospecção (*screening*) fitoquímica, ou perfil cromatográfico (*fingerprint*) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A espécie *S. adstringens* conta com monografia farmacopeica para sua droga vegetal na Farmacopéia Brasileira 4ª edição (FARMACOPÉIA, 2002), entretanto, não existem monografias para produtos intermediários (extratos) e para produtos acabados obtidos com o barbatimão. Além disto, os métodos analíticos preconizados não permitem a padronização dos extratos em termos de marcadores químicos individuais e sim por doseamento de taninos totais, exigem um tempo de análise longo e geram grande quantidade de resíduos tóxicos para o analista e o meio ambiente.

Portanto, torna-se interessante o desenvolvimento de métodos analíticos validados, principalmente métodos por CLAE, para avaliação da qualidade e padronização da droga vegetal e de extratos de barbatimão em análises de rotina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade de extratos preparados com cascas do tronco de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar métodos analíticos aplicáveis ao controle de qualidade de extratos de *S. adstringens*;
- comparar os métodos espectrofotométricos oficiais, com leituras na região do visível, com método desenvolvido para leitura na região do ultravioleta (UV);
- avaliar o perfil cromatográfico de extratos de barbatimão por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- avaliar a qualidade de extratos preparados com cascas de outra espécie de barbatimão (*S. obovatum*) e comparar os resultados obtidos com *S. adstringens*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

As plantas medicinais são usadas desde tempos remotos como medicamentos para o tratamento de variedade de doenças, tendo uma função primordial na saúde mundial. Apesar das grandes vantagens observadas na medicina convencional, as plantas ainda têm uma importante contribuição nos tratamentos de saúde.

Estima-se que cerca de 25-30% de todos os medicamentos disponíveis são produtos naturais (plantas, microorganismos e animais) ou são derivados de produtos naturais. Entretanto, poucas plantas têm sido cientificamente estudadas para avaliação de sua qualidade, segurança e eficácia (CALIXTO, 2005).

A Divisão de Medicina Tradicional da OMS reconhece a importância das espécies de plantas usadas pelos Ameríndios como medicamento e recomenda que a eficácia deva ser avaliada por doseamentos farmacológicos e toxicológicos (WORLD, 2002).

Segundo Brandão *et al.* (2008), a segunda espécie mais freqüentemente mencionada descrita pelos naturalistas do século XIX e descrita na Farmacopéia 1ª edição é o *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão), tradicionalmente usada como adstringente de acordo com seis naturalistas, devido ao alto teor de taninos (aproximadamente 30%) de suas cascas.

No presente trabalho foram desenvolvidos métodos extrativo-analíticos para determinação de taninos em insumos e produtos vegetais de barbatimão, bem como se avaliou a qualidade físico-química da droga vegetal e dos extratos.

Foram preparados extratos etanólico seco e glicólico a partir da droga vegetal moída. A preparação e a caracterização de extratos glicólicos, ricos em taninos a partir das cascas de barbatimão, já foram desenvolvidas e descritas (ARDISSON *et al.*, 2002). O propilenoglicol foi o solvente escolhido, devido a sua baixa toxicidade e baixa irritação quando comparado ao álcool, sendo o solvente ideal para desenvolver produtos de uso tópico, tais como géis, cremes e loções. Além disto, trabalhos anteriores já demonstraram que o propilenoglicol é bastante efetivo na extração de substâncias polifenólicas (DIEMUNSCH, 1980; MULLER, 1992; JONES *et al.*, 1998).

3.1 DESCRIÇÃO VEGETAL

Dentre as plantas mais utilizadas na medicina popular para o tratamento das feridas estão as cascas da espécie *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Fabaceae (FORERO, 1972; MISSOURI, 2007), sinonímia também encontrada *Stryphnodendron barbadetiman*, comumente conhecida como barbatimão. Esta planta medicinal é

característica da região do cerrado brasileiro, ocorrendo desde o sul do Pará até São Paulo e Mato Grosso do Sul.

A palavra *Stryphnodendron* é originada do grego e significa Strypnós (duro), déndron (árvore), portanto dá-se idéia de lenho duro. Por sua vez, a palavra barbadetiman é um termo específico de origem indígena, ibá-timo, que significa “árvore que aperta”, isto é adstringente (PANIZZA *et al.*, 1988). Espécies de *Stryphnodendron* recebem também os nomes populares de barba-de-timão, ibatimó, uabatimõ, choranzinho-roxo, casca da virgindade ou da mocidade.

O *S. adstringens* é uma planta arbórea, de porte pequeno e crescimento muito lento, tortuosa, inerme, com pouca folhagem e casca rugosa. As folhas são alternas, grandes e bipinadas compostas. Os folíolos são geralmente alternos, glabros, subcoriáceos, orbiculares, medindo cerca de 2 cm de diâmetro, com ápice retuso e base assimétrica. As flores são pequenas, esbranquiçadas, numerosas, dispostas em espigas densas, axilares, medindo cerca de 10 cm de comprimento. Os frutos são do tipo legumes sésseis, contendo várias sementes de coloração castanho-clara e ligeiramente achatadas. As folhas são caducas, permanecendo a árvore despida nos meses de junho e julho, voltando a brotar em agosto. A floração inicia-se em setembro e a frutificação em novembro (CORRÊA, 1984).

A droga vegetal é constituída pelas cascas da árvore, sendo aquelas provenientes de *S. adstringens* inscritas na Farmacopéia Brasileira 4ª edição (2002). Segundo a Farmacopéia, as cascas devem apresentar-se em pedaços de forma e tamanho variáveis, recurvadas no sentido transversal e medindo em geral 12 cm de espessura. A superfície externa da casca deve ser de cor parda esverdeada e com placas esbranquiçadas, quando recoberta por líquens. Podem ser muito rugosas e profundamente escavadas em todos os sentidos. Sua superfície interna deve ser parda avermelhada viva, muitas vezes enrugada transversalmente e estriada longitudinalmente, devido à presença de grandes feixes de fibras. São inodoras e causam sensação adstringente.

3.2 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA

As cascas de barbatimão possuem entre 25 a 30% em taninos totais (PANIZZA *et al.*, 1988; ARDISSON *et al.*, 2002). Segundo Mello e colaboradores (1993, 1997), da fração solúvel em acetato de etila do extrato acetona:água (7:3) obtido das cascas secas foi possível separar por cromatografia em coluna (CC) em Sephadex LH-20, cromatografia em contra-corrente multi-camada (CCMC) e cromatografia líquida de alta eficiência em Hyperosil ODS, os compostos apresentados na Figura 1 e na Tabela 1, sendo que o 4'-O-metilgalocatequina ocorreu em baixas concentrações. As estruturas químicas apresentadas na Figura 1, com exceção do ácido gálico, são monômeros básicos de taninos condensados

do tipo 1 face à presença de hidroxila na posição C-5 do anel A e são denominadas prodelfinidinas.

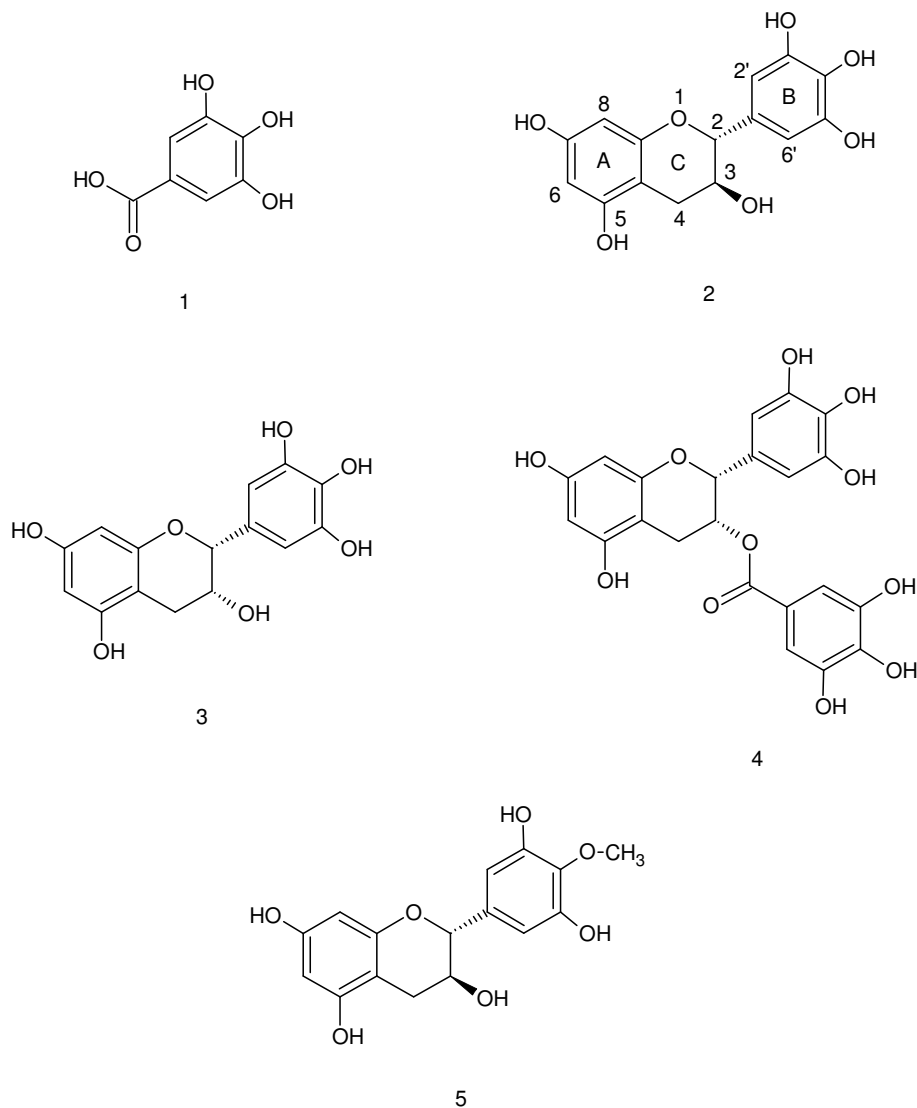


Figura 1 Estruturas do ácido gálico e de flavan-3-óis isolados de *Stryphnodendron adstringens*.

Tabela 1 Ácido gálico e flavan-3-óis isolados a partir do extrato acetato de etila das cascas secas de *Stryphnodendron adstringens* (MELLO *et al.*, 1993, 1997)

| Substância | Estrutura |
|----------------------------------|-----------|
| Ácido gálico | 1 |
| (+)-galocatequina | 2 |
| (-)-epigallocatequina | 3 |
| (-)-epigallocatequina-3-O-galato | 4 |
| 4'-O-metilgalocatequina | 5 |

A ocorrência natural de várias prorobinetinidinas novas nas cascas de barbatimão foi demonstrada. A fração solúvel em acetato de etila do extrato acetona:água obtido das cascas secas foi cromatografada em Sephadex LH-20 e as frações contendo oligoflavonóides foram posteriormente ultrapurificadas por cromatografia em contra-corrente multi-camada espiralada (CCMCE) e CLAE de fase reversa C18, obtendo-se os compostos 1-8 apresentados na Figura 2 e na Tabela 2 (MELLO *et al.*, 1996b, 1997). As prorobinetinidinas são proantocianidinas do tipo 2 devido à ausência de hidroxila na posição C-5 do anel A.

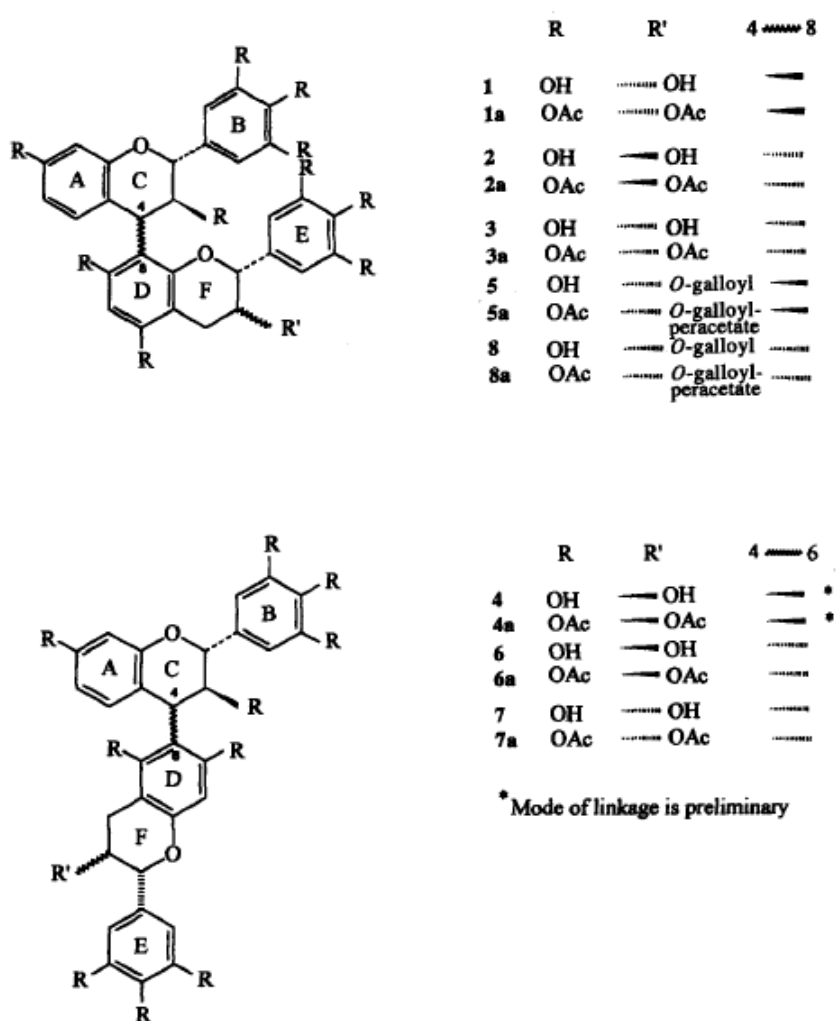


Figura 2 Estruturas de prorobinetinidinas isoladas de *Stryphnodendron adstringens*. A letra “a” próxima aos números indica o derivado peracetato.

Tabela 2 Prorobinetinidinas diméricas isoladas a partir do extrato acetato de etila das cascas secas de *Stryphnodendron adstringens* (MELLO *et al.*, 1996b, 1997)

| Substância | Estrutura |
|--|-----------|
| robinetinidol-(4 β →8)-epigalocatequina | 1 |
| robinetinidol-(4 α →8)-galocatequina | 2 |
| robinetinidol-(4 α →8)-epigalocatequina | 3 |
| robinetinidol-[4 β →6(8)]-galocatequina | 4 |
| robinetinidol-(4 β →8)-epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato | 5 |
| robinetinidol-(4 α →6)-galocatequina | 6 |
| robinetinidol-(4 α →6)-epigalocatequina | 7 |
| robinetinidol-(4 α →8)-epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato | 8 |

Outros seis flavan-3-óis e oito proantocianidinas do Tipo 1, classificadas como prodelfinidinas, também foram isolados das cascas de barbatimão por Mello e colaboradores (1996a, 1997). Dois novos flavan-3-óis foram isolados:

- epigalocatequina 3-*O*-(3,5-dimetil)-galato e
- epigalocatequina 3-*O*-(3-metóxi-4-hidróxi)benzoato.

Das proantocianidinas isoladas, quatro novas tiveram suas estruturas elucidadas:

- epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina 3-*O*-(4-hidróxi)benzoato;
- epigalocatequina (4 β →6)-epigalocatequina;
- galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina-3-*O*-galato e
- galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina-3-*O*-(4-hidróxi)benzoato.

As estruturas dos compostos isolados são apresentadas nas Figuras 3 e 4 e nas Tabelas 3 e 4.

Uma nova proantocianidina, 4'-*O*-metilgalocatequina-(4 α →8)-4'-*O*-metilgalocatequina de um raro derivado 4'-metóxi de prodelfinidina foi isolada das cascas de barbatimão (MELLO *et al.*, 1999). A extração e o isolamento foram obtidos da casca utilizando-se acetona:água (7:3), seguido de evaporação e extração com acetato de etila. A fase orgânica foi submetida à CC em Sephadex LH-20, seguida de CCMCE. A estrutura do composto obtido é apresentada na Figura 5.

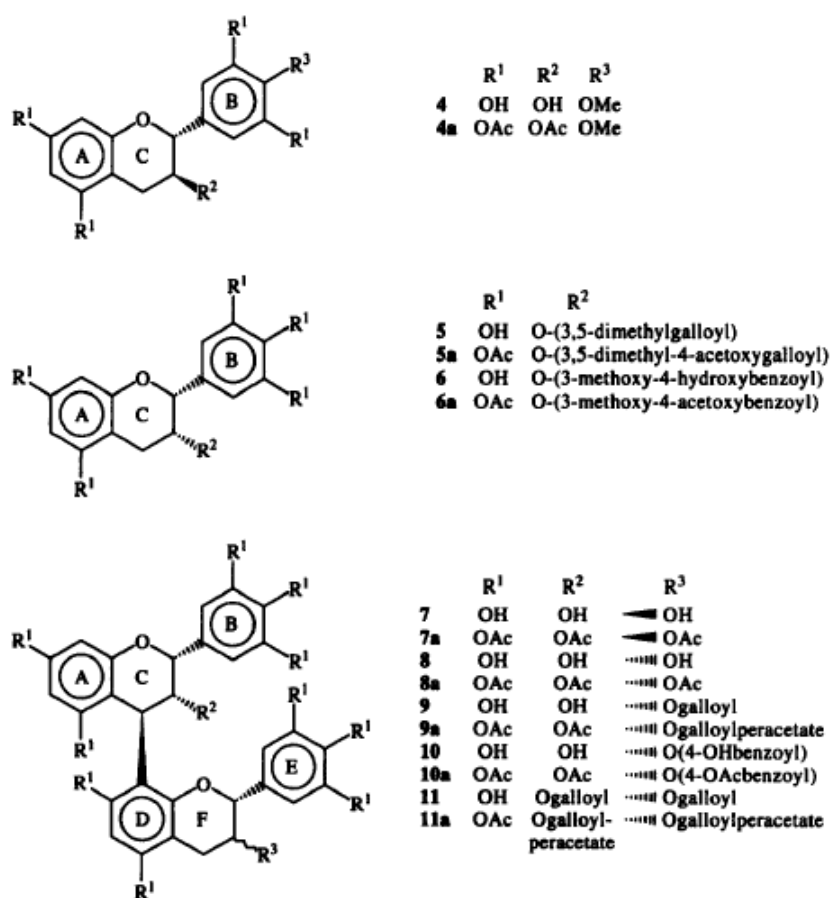


Figura 3 Estruturas de flavan-3-óis e prodelfinidinas diméricas isoladas a partir do extrato acetato de etila das cascas secas de *Stryphnodendron adstringens*. A letra “a” próxima aos números indica o derivado peracetato.

Tabela 3 Flavan-3-óis e prodelfinidinas diméricas isoladas a partir do extrato acetato de etila das cascas secas de *Stryphnodendron adstringens* (MELLO *et al.*, 1996a, 1997)

| Substância | Estrutura |
|--|-----------|
| 4'-O-metilgalocatequina | 4 |
| epigalocatequina 3-O-(3,5-dimetil)-galato | 5 |
| epigalocatequina 3-O-(3-metóxi-4-hidroxibenzoato) | 6 |
| epigalocatequina-(4β→8)-galocatequina | 7 |
| epigalocatequina-(4β→8)-epigalocatequina | 8 |
| epigalocatequina-(4β→8)-epigalocatequina-3-O-galato | 9 |
| epigalocatequina-(4β→8)-epigalocatequina-3-O-(p-hidróxi)benzoato | 10 |
| epigalocatequina-3-O-galato-(4β→8)- epigalocatequina-3-O-galato | 11 |

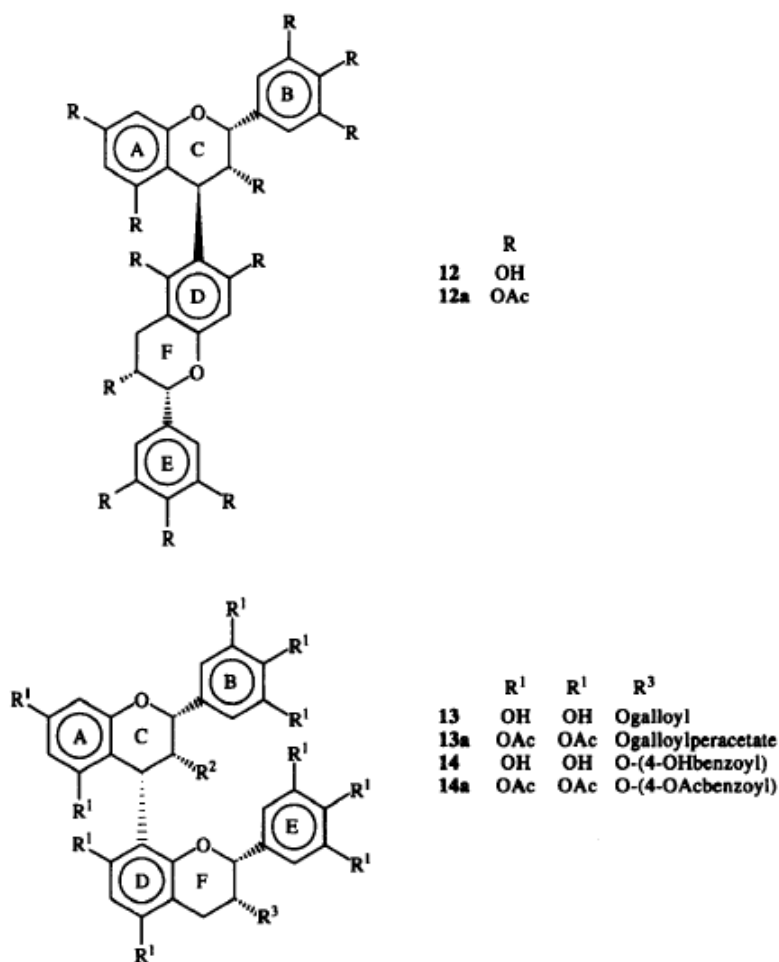


Figura 4 Estruturas de prodelfinidinas diméricas isoladas de *Stryphnodendron adstringens*. A letra “a” próxima aos números indica o derivado peracetato.

Tabela 4 Prodelfinidinas diméricas isoladas a partir do extrato acetato de etila das cascas secas de *Stryphnodendron adstringens* (MELLO *et al*, 1996a, 1997)

| Substância | Estrutura |
|--|-----------|
| epigalocatequina-(4 β →6)-epigalocatequina | 12 |
| galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina-3-O-galato | 13 |
| galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina-3-O-(p-hidróxi)benzoato | 14 |

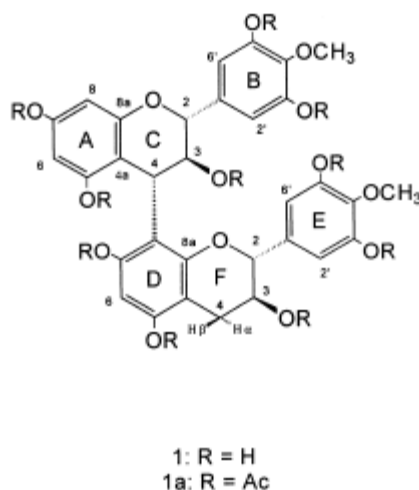


Figura 5 Estrutura da prodelfinidina dimérica 4'-O-metilgalocatequina-(4 α →8)-4'-O-metilgalocatequina isolada de *Stryphnodendron adstringens* (MELLO *et al.*, 1999).

Portanto, as cascas de *S. adstringens* são uma fonte rica de proantocianidinas com unidades pirogalol com atividade biológica (MELLO *et al.*, 1996a).

É importante esclarecer que os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Essa classe de taninos também é conhecida como proantocianidina devido ao fato de os taninos condensados produzirem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, tais como cianidina e delfinidina, após degradação com ácido mineral diluído a quente.

Santos e colaboradores (2002) avaliaram comparativamente a composição de taninos de três espécies diferentes conhecidas por barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, *Stryphnodendron polyphyllum* (Mart.) e *Dimorphandra mollis* (Benth). Os resultados mostraram diferenças marcantes entre os gêneros *Stryphnodendron* e *Dimorphandra*, e também diferenças químicas entre as espécies do mesmo gênero, as quais podem ser detectadas pelos métodos utilizados. Neste estudo, confirmou-se que os taninos condensados do gênero *Stryphnodendron* são formados por unidades de prodelfinidinas. As prodelfinidinas são formadas por galocatequinas e/ou epigalocatequinas as quais contém grupos orto-trihidroxil no anel B. A atividade contra radicais livres é aumentada pela presença dos três grupos hidroxila no anel B na estrutura dos taninos condensados, provavelmente devido à estabilidade dos radicais fenóxi formados. Adicionalmente, a cromatografia em papel indicou a liberação de ácido gálico, após hidrólise, dos extratos do gênero *Stryphnodendron*.

3.3 AÇÕES FARMACOLÓGICAS

As plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996; DE BRUYNE *et al.*, 1999; DUFRESNE, 2001).

Alguns estudos preliminares mostram significativas atividades biológicas para espécies do gênero *Stryphnodendron*: atividade anti-tirosinase (BAURIN *et al.*, 2002); moluscicida (BEZERRA *et al.*, 2002); interferência no metabolismo energético em fígado de ratos (REBECCA *et al.*, 2003); cicatrizante e antiinflamatória (LOPES *et al.*, 2005).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos dois grupos de taninos, condensados e hidrolisáveis (HASLAM, 1996, 1998; SIMÕES *et al.*, 2004):

1. Complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros);
2. Atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres e
3. Habilidade de complexar com outras moléculas incluindo macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos.

Os taninos ajudam no processo de cicatrização de feridas, queimaduras e inflamações através da formação de uma camada protetora (complexos tanino-proteína e/ou tanino-polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada, ocorrendo, abaixo desta, o processo natural de cura (reestruturação do epitélio e formação de vasos). Processo similar ocorre provavelmente em casos de úlcera gástrica, em que uma camada de tanino-proteína complexados protege a mucosa do estômago (HASLAM, 1998; AUDI *et al.*, 1999).

As espécies do gênero *Stryphnodendron* são amplamente utilizadas na medicina popular do Brasil como cicatrizante e a eficácia de preparações com a planta já foi confirmada por vários estudos. Jorge-Neto e colaboradores (1996), por exemplo, descreveram uma melhor eficácia da associação de tinturas de barbatimão e calêndula em relação à tintura de calêndula isolada, no tratamento de úlcera varicosa. Castro (1996) comprovou a ação de preparações aquosas das cascas da planta, na cicatrização cutânea de feridas. Favoreto e colaboradores (1985) demonstraram a efetividade dessas preparações no tratamento de úlceras de contenção em ratos, dado confirmado por Audi e colaboradores (1999) e Martins e colaboradores (2002) com extratos orgânicos em outros modelos experimentais de úlceras em ratos. O alto teor de taninos nas cascas (MELLO *et al.*, 1999) é, provavelmente, o que explica a atividade cicatrizante. No processo de

cicatrização, os taninos precipitam as proteínas dos tecidos lesados, formando um revestimento protetor que favorece a sua regeneração (HEIJMEN *et al.*, 1997; PANIZZA *et al.* 1988, NETO *et al.*, 1996). Seria interessante, portanto, o desenvolvimento de produtos com a planta, os quais possam ser utilizados para o tratamento de feridas (ARDISSON *et al.*, 2002).

Na medicina popular, decoctos ou infusos das cascas *in natura* desta espécie são também utilizados nas leucorréias, diarréias e como um agente antiinflamatório devido à presença de proantocianidinas detectadas na fração solúvel acetônica da droga vegetal (SIQUEIRA, 1982; SANTOS *et al.*, 1987; LIMA *et al.*, 1998).

Rebecca e colaboradores (2002) estudaram a toxicidade do extrato aquoso total de barbatimão, após administração oral em camundongos, sendo que os resultados indicaram que uma administração num período prolongado produz efeitos tóxicos nos animais experimentais. Por outro lado, o extrato fitoterapêutico das cascas de *S. adstringens* não se mostrou genotóxico em células germinativas e somáticas de *D. melanogaster* (SOUSA *et al.*, 2003).

Ishida e colaboradores (2006) demonstraram a ação antifúngica, contra *Candida albicans*, de subfrações do extrato bruto de *S. adstringens* devido a presença de taninos condensados.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE TANINOS CONDENSADOS

Para a determinação de taninos condensados podem ser usados diversos métodos analíticos, apesar da quantificação ser um processo delicado tendo em vista que a extração é difícil de ser alcançada e nem todos os métodos baseados nas características fenólicas destes compostos são específicos, além da complexidade devido a diversidade de estruturas encontradas neste grupo de substâncias (BRUNETON, 1999). Muitos métodos analíticos têm sido usados para quantificar os taninos em drogas vegetais (SCHOFIELD, 2001):

- a) Métodos que incluem despolimerização oxidativa, como o doseamento com butanol-ácido o qual promove uma reação colorimétrica onde o tanino condensado se fragmenta formando antocianidina de cor vermelha que pode ser dosada por espectrofotometria na região do visível.
- b) Métodos com reações do anel A com um aldeído aromático, como o doseamento com vanilina a qual forma um complexo colorido com os taninos condensados os quais também podem ser quantificados por espectrofotometria na região do visível.

- Um método por injeção de fluxo, utilizando-se vanilina como reagente, foi proposto para determinação de taninos condensados (FERREIRA & NOGUEIRA, 2000);
- c) Métodos colorimétricos para fenólicos totais, tais como os doseamentos com azul da Prússia, com reagente de Folin-Denis ou com reagente de Folin-Ciocalteu. Estes métodos são baseados em reações de oxi-redução com formação de complexo colorido com máximo de absorção na região do espectro visível. Infante e colaboradores (2008) propuseram um sistema de injeção de fluxo para determinação de taninos totais baseado na reação com o reagente de Folin-Denis;
 - d) Métodos que envolvem reações de clivagem ácida, incluindo tiólise e degradação por floroglucinol. Nestas reações, a unidade final da cadeia polimérica dos taninos condensados é liberada com um substituinte permitindo-se determinar a composição e o tamanho do polímero de tanino condensado.
 - e) Métodos gravimétricos utilizando-se sal de itérbio (Yb^{+3}) ou polivinilpirrolidona (PVP) como reagentes.
 - f) Métodos baseados na inibição da atividade enzimática de diversas enzimas.
 - g) Métodos que envolvem reações de precipitação: ou com proteínas, tais como a albumina bovina sérica, ou com polietilenoglicol 4000 (PEG 4000), substâncias que formam complexos insolúveis com os taninos condensados.
 - h) Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tanto de fase normal quanto de fase reversa.
 - i) Métodos por inibição do crescimento microbiano, onde se avalia o impacto da presença dos taninos no crescimento microbiano ou a formação de ligação entre os taninos com as bactérias de forma similar aos doseamentos de precipitação por proteína citados previamente.

A Farmacopéia Brasileira 2ª edição (FARMACOPÉIA, 1959) apresenta monografia para o barbatimão especificando um teor de no mínimo 20% de taninos totais, valor este modificado pela publicação mais recente de monografia para a mesma droga vegetal na Farmacopéia Brasileira 4ª edição (FARMACOPÉIA, 2002) preconizando um teor bem menor de taninos totais, de no mínimo 8%, que deve ser determinado pelo método colorimétrico de Folin-Denis. Nesta pesquisa, buscou-se trabalhar com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu preconizado pela Farmacopéia Européia 5ª edição no método 2.8.14 Determinação de taninos em drogas vegetais presente nos Métodos em Farmacognosia (EUROPEAN, 2004). O método de Folin-Ciocalteu é uma versão melhorada do método de Folin-Denis onde a possibilidade de formação de precipitado neste último interfere nas medidas espectrofotométricas (SCHOFIELD, 2001).

Além do teor de taninos, a Farmacopéia Brasileira 4ª edição (FARMACOPÉIA, 2002) preconiza um teor de no mínimo 0,3% de flavonóides totais, expressos em quercetina, para

a droga vegetal, entretanto, ainda não há trabalhos publicados indicando a presença, o teor e a identificação estrutural desta classe de substâncias na droga vegetal da espécie *S. adstringens*.

3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os taninos condensados podem ser quantificados usando-se CLAE. Ambas as colunas de fase normal e fase reversa tem sido aplicadas (CHEYNIER *et al.*, 1999; LAZARUS *et al.*, 1999; WATERHOUSE *et al.*, 1999). CLAE de fase reversa foi usada para separação de taninos condensados de baixo peso molecular, mas a ordem de eluição não está relacionada ao grau de polimerização (CHEYNIER, *et al.*, 1999). A separação de grandes polímeros (\geq tetrâmeros) com este método não é possível. A presença de muitos isômeros com polaridade similar resulta em sobreposição de tempos de retenção (LAZARUS *et al.*, 1999; WATERHOUSE *et al.*, 1999). CLAE de fase normal foi usada para separar oligômeros de taninos condensados e polímeros (LAZARUS *et al.*, 1999) de vários produtos vegetais alimentícios. A ordem de eluição aumenta com o aumento no grau de polimerização.

Vários métodos de detecção têm sido aplicados conjuntamente com CLAE para determinação de taninos condensados. A detecção por ultravioleta é a mais comumente utilizada (WATERMAN & MOLE, 1994). Entretanto, este método não é específico para os taninos condensados na presença de outros polifenóis (LAZARUS *et al.*, 1999). Métodos alternativos incluem detecção eletroquímica e fluorescência (WATERMAN & MOLE, 1994; LAZARUS *et al.*, 1999). As informações estruturais para a identificação de oligômeros de taninos condensados podem ser obtidas usando-se espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear e hidrólise química (HAMMERSTONE *et al.*, 1999).

O uso de CLAE acoplada a vários métodos de detecção continuará indubitavelmente a aumentar e será o mais importante método de elucidação da complexidade de taninos condensados e também de taninos hidrolisáveis (SCHOFIELD *et al.*, 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Amostras botânicas

As amostras de barbatimão foram coletadas em Minas Gerais, nos municípios relacionados na Tabela 5, no dia 13/08/07, através de corte superficial nos troncos retirando-se as cascas e entrecascas das árvores (Figura 6). Tais amostras foram identificadas como sendo da espécie *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Fabaceae) pelo professor Dr. João Renato Stehmann do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. As exsicatas da planta foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG sob o número BHC111231.

Tabela 5 Material botânico

| Município | Latitude (Sul) | Longitude (Oeste) | Altitude (m) |
|--|----------------|-------------------|--------------|
| Santa Cruz de Minas (Serra de São José) | 21°06'42,6" | 44°13'19,6" | 981 |
| | 21°06'42,1" | 44°13'19,8" | 968 |
| | 21°06'39,8" | 44°13'13,8" | 950 |
| Ritápolis | 21°00'44,5" | 44°18'48,1" | 1007 |
| | 21°00'44,5" | 44°18'43,7" | 1007 |
| | 21°00'45,2" | 44°18'42,1" | 1005 |



Figura 6 Coleta do material botânico.

4.1.2 Substâncias químicas de referência

As substâncias químicas de referência (SQR) utilizadas como marcadores químicos são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 Relação de substâncias químicas de referência (SQR) utilizadas

| SQR | Fabricantes | Lotes | Prazos de validade | % Pureza |
|----------------------------|----------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| Ácido gálico | Acrós Organics | A0235751 | 07/10/16 | mín. 98,0 |
| (+)-catequina hidratada | Sigma | 124K1484 | 30/08/11 | mín. 98,0 |
| (-)-Epigalocatequina | Fluka | 08108 | 30/05/11 | ≥ 90% |
| Galato de epigalocatequina | Sigma | 125K1457 e 117K1479 | 30/01/11 e 31/08/11 | mín. 95,0 |
| Galocatequina | Sigma | 087K1386 e 027k1005 | 30/06/11 e 30/01/11 | mín. 98,0 |
| Pirogalol | Sigma | 14228BE | 30/01/12 | mín. 99,0 |
| Proantocianidina B2 | Extrasynthèse | 07071339 | NI ^a | NI ^a |
| Quercetina | Aldrich | S28751-485 | 20/03/01 | mín. 95,0 |

a: NI, não informado.

4.1.3 Reagentes e outros materiais

- Solventes e reagentes de grau analítico: acetato de etila, acetona, ácido acético, ácido clorídrico, ácido fórmico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, butanol, carbonato de sódio, cloreto de alumínio, cloreto férrico, clorofórmio, diclorometano, etanol 96%, etanol absoluto, gelatina, metanol, metenamina, nitrato de amônio, 2-propanol, propilenoglicol, tolueno e vanilina (Synth, Vetec e Quimex);
- Solventes de grau cromatográfico: metanol e acetonitrila (Tedia e J.T. Baker);
- Pó de pele (*hide powder non chromated*): Sigma, lote 065K1498, validade 30/08/11 e lote 066K1402, validade 30/04/12;
- Solução reagente Folin-Denis: Fluka, lote 1297898, validade 30/12/12. Composição: tungstato de sódio 10% (p/V), ácido fosfomolibdico 2% (p/V), ácido fosfórico 5% (V/V) em água;
- Solução reagente Folin-Ciocalteu (reagente fosfomolibdotúngstico): Sigma, lote 106K0127, validade 30/10/12. Composição: tungstato de sódio 10% (p/V), molibdato de sódio 25% (p/V), ácido clorídrico 10% (V/V), ácido fosfórico 5% (V/V), sulfato de lítio 15% (p/V), bromo 0,02% (V/V) em água;
- Cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄, em alumínio (espessura 0,25 mm, HPCDD, Merck);
- Sílica gel 60, 63–200 µm, 70-230 mesh para coluna cromatográfica: Vetec, lote 0503300, fabricação 06/05, validade 06/10;
- Micropipetas automáticas calibradas (Transferpette Brand; Oxford);

- Membrana de celulose regenerada (diâmetro 47 mm, poros 0,45 µm, Sartorius);
- Dispositivos filtrantes de celulose regenerada (Minisart 15 mmx0,45 µm; Sartorius);
- Pré-coluna cromatográfica C18, 4x4 mm, 5 µm (XDB, Zorbax[®], Agilent, lote 7995118-504);
- Coluna cromatográfica C18, 250x4 mm, 5 µm (LiChrospher[®]100, LiChroCART[®] Merck, lote 849117);
- Coluna cromatográfica Zorbax[®] Eclipse XDB-C18, 250x4,6 mm, 5 µm (Agilent, lote B05108);
- Água ultrapura, utilizada no preparo de todas as soluções aquosas;
- Vidraria: comum de laboratório.

4.1.4 Reveladores para cromatografia em camada delgada (CCD)

Os reveladores utilizados foram preparados conforme descrito em Wagner e colaboradores (1984) e na monografia de barbatimão da Farmacopéia Brasileira 4ª edição (FARMACOPÉIA, 2002). A preparação e a forma de detecção após borrifação de cada revelador estão apresentadas a seguir.

4.1.4.1 Cloreto férrico 1% (p/V) em metanol

Solubilizou-se 1,0 g de FeCl₃ em 100 mL de metanol. A solução foi armazenada em geladeira até o momento do uso. As placas foram reveladas borrifando-as com a solução.

O aparecimento de manchas de coloração azul arroxeadas, observadas após secagem ao ar e sob luz visível, indica a presença de taninos e polifenóis.

4.1.4.2 Ácido difenilboriloxietilamínico 1% (p/V) em metanol (NP) e polietilenoglicol 4000 5% (p/V) em etanol (PEG) (NP-PEG)

Solubilizou-se 1,0 g de ácido difenilboriloxietilamínico (NP) em 100 mL de metanol e 5,0 g de polietilenoglicol 4000 (PEG) em 100 mL de etanol. As duas soluções foram armazenadas em geladeira até o momento do uso. As placas foram reveladas borrifando-as com solução de NP e, em seguida, com solução de PEG.

O aparecimento de intensa fluorescência, após secagem ao ar, observada sob luz UV λ 365 nm, indica a presença de flavonóides ou aloína.

4.1.4.3 Cloreto de alumínio 5% (p/V) em metanol

Solubilizaram-se 5,0 g de cloreto de alumínio em 100 mL de metanol. A solução foi armazenada em geladeira até o momento do uso. As placas foram reveladas borrifando-as com a solução.

O aumento da fluorescência, observada após secagem ao ar e sob luz UV λ 365 nm, indica a presença de flavonóides e polifenóis.

4.1.4.4 Vanilina 1% (p/V) em etanol e ácido sulfúrico 5% (V/V) em etanol

Solubilizaram-se 1,0 g de vanilina em 100 mL de etanol (solução I) e 5,0 mL de ácido sulfúrico em 100 mL de etanol (solução II). As duas soluções foram armazenadas em geladeira até o momento do uso. As placas foram reveladas borrifando-as com solução I e, em seguida, com solução II. As placas foram secas ao ar e aquecidas 10 minutos a 100 °C.

O aparecimento de manchas de coloração vermelha, após aquecimento, observadas sob luz visível, indica a presença de taninos condensados.

4.1.5 Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento (258, Fanem);
- Aparelho de ultra-som (1400, Unique);
- Balança analítica com precisão de 0,01 mg (BP210D, Sartorius);
- Balança semi-analítica com precisão de 0,01 g (TP2KS, Ohaus);
- Bomba de vácuo (WP6111560, Millipore);
- Banho maria (120/2, Fanem);
- Câmara para revelação de placas equipada com lâmpadas UV λ 254 nm e λ 365 nm (CM-10, Spectroline);
- Cromatógrafos a líquido de alta eficiência equipados com desgaseificador, bomba quaternária, forno de colunas, injetor automático, detector ultravioleta-visível com arranjo de diodos (UV-VIS/DAD) (HP1100 e HP1200, Agilent);
- Espectrofotômetro de absorção no ultravioleta-visível equipado com detector de arranjo de diodos (UV-VIS/DAD) (HP8453, Agilent);
- Espectrofotômetro de absorção no infravermelho (Spectrum one, Perkin-Elmer);
- Estufa a seco (306/1, Fanem);
- Forno mufla (400, Lavoisier Engro);
- Potenciômetro (827 pH lab, Metrohm);
- Evaporador rotatório (802, Fisatom);
- Misturador rotatório (Adams);
- Purificador de água (Milli-Q-Plus, Millipore, Bedford, MA, USA);

- Tamisador (AS200 Digit, Retsch);
- Moinho de facas (MA 680, Marconi).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Controle de qualidade da droga vegetal

4.2.1.1 Secagem, divisão e aspecto da droga vegetal

As cascas do caule de *S. adstringens* foram desidratadas em estufa de secagem, a 40 °C, até peso constante de forma a obter um teor de água final de no máximo 15%. Logo após, o material foi moído em moinho de facas. O pó obtido foi identificado e armazenado em recipientes de vidro âmbar hermeticamente fechados.

4.2.1.2 Avaliação dos caracteres organolépticos

As características organolépticas, cor, odor e sabor, da amostra de droga vegetal foram avaliadas.

4.2.1.3 Determinação da granulometria do pó da droga vegetal

Procedeu-se a análise granulométrica do pó da droga vegetal, conforme o método geral, determinação da granulometria dos pós (V.2.11), presente na Farmacopéia Brasileira 4^a edição (FARMACOPÉIA, 1988). Utilizou-se uma série de tamises de aço inox, previamente tarados, com aberturas nominais de malha (μm) apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 Classificação de tamises utilizados na análise granulométrica dos pós da casca de barbatimão

| % Máxima retida por tamis | | | Abertura nominal da malha (μm) | Diâmetro recomendado do fio (μm) | Tolerância aproximada da abertura média (μm) | % Área de peneiramento | Nº do tamis (aproximado) ^d |
|---------------------------|-----------------|----------------|---|---|---|------------------------|---------------------------------------|
| MG ^a | SF ^b | F ^c | | | | | |
| 100 | - | - | 710 | 450 | 25 | 37 | 22 |
| - | - | - | 500 | 315 | 18 | 38 | 30 |
| - | 100 | - | 425 | 280 | 15 | 36 | 36 |
| 40 | - | - | 250 | 160 | 13 | 37 | 60 |
| - | 40 | 100 | 180 | 125 | 11 | 35 | 85 |
| - | - | - | 150 | 100 | 9,4 | 36 | 100 |
| - | - | - | 75 | 50 | 6,1 | 36 | 200 |
| - | - | - | bandeja | - | - | - | - |

a: MG, moderadamente grosso; b: SF, semi-fino; c: F, fino; d: número do tamis correspondente à classificação ABNT (1972) (FARMACOPÉIA, 1988).

Esta série de tamises e a bandeja de recolhimento foram montadas de acordo com a seqüência apresentada, todos previamente tarados, e colocados no tamisador. As condições utilizadas foram: amplitude da freqüência, 50 ciclos por minuto, tempo de análise, 20 minutos; opção de intervalo, desligada. Cerca de 100 g do pó da droga vegetal foram pesados e colocados sobre o tamis superior da série. Este tamis do peneirador foi tampado e toda a série fixada para o início do teste. Ao final, empregou-se um pincel para retirar o pó fino aderido às paredes de cada tamis. Pesou-se, cuidadosamente, o material remanescente em cada tamis e os resultados expressos como porcentagem da quantidade total pesada. A análise foi feita em triplicata.

4.2.1.4 Testes de identificação

Foram realizados os testes de identificação A, por CCD (descrito no item 6.3.1.5), B, C e D, por precipitação ou por formação de cor, descritos na monografia para barbatimão (FARMACOPÉIA, 2002).

Teste B – Reação com gelatina - Aqueceu-se sob refluxo cerca de 3 g da droga vegetal pulverizada com 60 mL de água, durante 15 minutos. Esfriou-se e filtrou-se. A 2 mL do extrato adicionaram-se 2 gotas de ácido clorídrico diluído e gotejou-se gelatina SR. O aparecimento de precipitado nítido indica resultado positivo para taninos totais.

Solução de gelatina SR: solubilizaram-se 2,5 g de gelatina e 10,0 g de cloreto de sódio em aproximadamente 80 mL de água ultrapura quente. Após o resfriamento em temperatura ambiente, completou-se o volume para 100,0 mL com água ultrapura. Utilizou-se a solução somente após o resfriamento em temperatura ambiente.

Teste C – Reação com cloreto férrico - A 2 mL do extrato obtido no teste B adicionaram-se 10 mL de água e 4 gotas de cloreto férrico 1% (p/V) em metanol. O desenvolvimento de cor cinza escura indica resultado positivo para taninos hidrolisáveis de identificação e condensados.

Solução de cloreto férrico 1% (p/V) em metanol: Descrita no item 5.1.4.1.

Teste D – Reação com vanilina - A 2 mL do extrato obtido no teste B, adicionaram-se 0,5 mL de vanilina 1% (p/V) em etanol e 1 mL de ácido clorídrico. O desenvolvimento de cor vermelha indica a presença de taninos condensados.

Solução de vanilina 1% (p/V) em etanol: Descrita no item 5.1.4.4.

4.2.1.5 Cromatografia em camada delgada

Realizou-se o teste de identificação por CCD (método geral V.2.17.1), descrito na monografia para a droga vegetal barbatimão, com adaptações (FARMACOPÉIA, 2002). As cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ sobre alumínio foram desenvolvidas em cuba de vidro saturada com a respectiva fase móvel, removidas, secas ao ar e examinadas sob luz ultravioleta ou visível. As cromatofolhas obtidas com a(s) solução(ões) do(s) extrato(s) cetônico(s) (1) devem apresentar manchas de fluorescência atenuada na mesma altura (mesmo R_f) que as obtidas com a solução padrão (2), descritas a seguir.

4.2.1.5.1 Sistema eluente conforme Farmacopéia Brasileira 4ª edição

Realizou-se o teste de identificação A com adaptações, descrito na monografia para a droga vegetal barbatimão (FARMACOPÉIA, 2002).

A mistura eluente (fase móvel) foi composta por acetato de etila, tolueno, ácido fórmico e água (80:10:5:5). Aplicaram-se, separadamente, 10 µL (sob a forma de banda) de cada uma das soluções recentemente preparadas, descritas a seguir:

Solução do extrato cetônico (1): turbilizaram-se 10 g da droga vegetal pulverizada em 90 mL de acetona e água (7:3) em erlenmeyer tampado, com agitação magnética por 15 minutos, cuidando para a temperatura não ultrapassar 40 °C. Filtrou-se e eliminou-se a acetona sob pressão reduzida. Foram recuperados 23 mL de extrato aquoso, diluídos com água ultrapura até 30 mL. Extraíu-se a fase aquosa resultante com três porções de 60 mL de acetato de etila, em funil de separação. Evaporaram-se as frações orgânicas reunidas, sob pressão reduzida, até resíduo e ressuspendeu-se em 5 mL de metanol.

Solução padrão (2): solubilizaram-se 10 mg de catequina SRQ em 2 mL de metanol.

As cromatofolhas foram reveladas sob luz UV λ 254 nm e λ 365 nm. Em seguida, as cromatofolhas foram nebulizadas, separadamente, com todos os reveladores descritos no item 6.3.1.

4.2.1.5.2 Sistemas eluentes alternativos

Outros sistemas eluentes, apresentados na Tabela 8, também foram avaliados utilizando-se apenas os reveladores luz UV λ 254 nm, cloreto férrico 1% (p/V) em metanol e vanilina 1% (p/V) em etanol seguida de ácido sulfúrico a 5% (V/V) em etanol, descritos no item 6.3.1. (WAGNER & BLADT, 1996; PÉREZ, 1996; SUN, *et al.* 1998; ARDISSON *et al.*, 2001; SANTOS *et al.* 2002),

Desenvolveu-se a cromatofolha para cada sistema eluente alternativo.

Tabela 8 Sistemas eluentes alternativos para análise de extratos de cascas de barbatimão por CCD em sílica gel

| Sistema eluente alternativo | Composição |
|---|----------------|
| Acetona | (100) |
| Acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água | (100:11:11:26) |
| Clorofórmio | (100) |
| Clorofórmio:acetato de etila | (60:40) |
| Clorofórmio:acetona:ácido fórmico | (75:16,5:8,5) |
| Metanol | (100) |
| Tolueno:acetona:ácido acético | (3:3:1) |
| Tolueno:acetona:ácido fórmico | (3:3:1) |
| Tolueno:acetona:ácido fórmico | (3:1:1) |

4.2.1.6 Material estranho

Avaliou-se a presença e a quantidade de material estranho no pó da droga vegetal de acordo com o método geral, determinação de matéria estranha (V.4.2.2), da Farmacopéia Brasileira 4^a edição, na qual se indica deve ser no máximo 2%. Colheram-se 25 g do pó das cascas de barbatimão pelo esquema de quarteamento. Cada parte foi espalhada em fina camada sobre uma superfície plana, limpa. Separou-se manualmente o material estranho à droga, inicialmente a olho nu e, em seguida, com auxílio de lupa (5 a 10 vezes). A quantidade porcentual material estranho foi determinada em relação à quantidade total de amostra (FARMACOPÉIA, 1988).

4.2.1.7 Determinação de água

Determinou-se o teor de água pelo método gravimétrico de acordo com o método geral para determinação de água em drogas vegetais (V.4.2.3) (FARMACOPÉIA, 1988). Transferiram-se cerca de 2,0 g da droga vegetal pulverizada, exatamente pesados, para pesa-filtros, previamente dessecados. Dessecou-se a amostra a 105 °C por 5 h. Esfriou-se à temperatura ambiente em dessecador e pesou-se. Repetiram-se a secagem e a pesagem em intervalos de 1 h, até quando duas pesagens sucessivas não diferiram entre si por mais de 0,005 g. A porcentagem de perda foi calculada em relação ao peso inicial da amostra. A análise foi feita no mínimo em quadruplicata. O teor de água deve ser no máximo 15%, de acordo com a monografia para barbatimão (FARMACOPÉIA, 2002).

4.2.1.8 Cinzas totais (V.4.2.4)

Foram pesados cerca de 3,0 g da droga vegetal pulverizada, conforme a monografia para barbatimão, e transferidos para um cadinho, previamente calcinado, resfriado e tarado. A amostra foi distribuída uniformemente no cadinho e incinerada a 450 °C, até eliminar todas as partículas pretas (carvão). O resíduo foi esfriado em dessecador e umedecido com solução de água oxigenada 20 volumes. Evaporou-se até secura, em banho de vapor e, a seguir, sobre chapa quente, incinerou-se até peso constante, não excedendo 450 °C. A porcentagem de cinzas foi calculada em relação à quantidade de droga vegetal seca ao ar (FARMACOPÉIA, 1988). A análise foi feita no mínimo em quintuplicata.

4.2.2 Preparação de extratos glicólicos (EG) de barbatimão

4.2.2.1 Preparação do solvente extrator

Prepararam-se 2 L de solvente extrator composto por propilenoglicol e água ultrapura (80:20) em proveta calibrada. Segundo Ardisson e colaboradores (2002), a concentração 80% (V/V) de propilenoglicol em água é mais seletiva para a extração de taninos a partir da droga vegetal.

4.2.2.2 Pó da droga vegetal para o preparo dos extratos glicólicos

Prepararam-se exatamente cerca de 100 g de droga vegetal pulverizada (triplicata), com a seguinte granulometria: 30 g (< 250 µm) e 70 g (710 > pó > 250 µm), obtendo-se classificação pó moderadamente grosso.

Os pós foram misturados com massa adicional de 10% de sílica gel 60, 63-200 μm , 70-230 mesh para coluna cromatográfica, em relação à massa inicial. Posteriormente, umectou-se esta mistura com pequena quantidade de solvente extrator (malaxagem) em béquero com auxílio de um bastão de vidro.

4.2.2.3 Preparação dos extratos glicólicos

Os extratos glicólicos foram preparados por meio de percolação em funis de separação de 500 mL e 1000 mL, adaptados como percoladores, conforme Ardisson e colaboradores (2002).

Transferiu-se a mistura de droga vegetal (100 g de droga vegetal e 10 g sílica gel), em triplicata, pré-umedecida, para funil de separação e completou-se com quantidade de solvente extrator suficiente para cobrir a mistura. Utilizou-se a proporção de 1:1 de quantidade de droga em relação ao solvente extrator (extrato fluido). Os solventes permaneceram em contato durante 48 h para completa umidificação. Em seguida, iniciou-se o processo de percolação, sendo cada extrato obtido recolhido de forma fracionada com volumes de 100 mL. Depois da retirada de cada fração de 100 mL, o mesmo volume de solvente extrator era repostado no percolador e deixado em contato por mais 24 h. Cinco frações de 100 mL foram recolhidas de cada percolador, armazenadas em frasco de vidro âmbar, identificadas e conservadas em geladeira (2 °C a 8 °C).

4.2.3 Preparação do extrato etanólico seco (EES) de barbatimão

4.2.3.1 Preparação da droga vegetal

Pesaram-se cerca de 170 g da mistura da droga vegetal pulverizada (triplicata) com granulometria não padronizada e acrescentou-se massa adicional de 10% de sílica gel 60, 63-200 μm , 70-230 mesh para coluna cromatográfica, antes da introdução nos percoladores. Posteriormente, umectou-se esta mistura com pequena quantidade de etanol 96% (malaxagem) em béquero com auxílio de bastão de vidro.

4.2.3.2 Preparação dos extratos etanólicos

Os extratos etanólicos também foram preparados por meio de percolação em funis de separação de 500 mL e 1000 mL, adaptados como percoladores.

Transferiu-se mistura de droga vegetal (170 g de droga vegetal e 17 g de sílica gel), em triplicata, pré-umedecida para funil de separação e completou-se com quantidade suficiente de solvente extrator para cobrir a mistura.

Os componentes permaneceram em contato durante 24 h para completa umidificação. Em seguida, iniciou-se o processo de percolação, sendo cada extrato obtido recolhido a cada 24 h e concentrados em evaporador rotatório. Após a evaporação do solvente, o extrato seco obtido foi reunido, pesado, transferido para recipiente de vidro âmbar, identificado e armazenado em baixa temperatura e em atmosfera desidratante (2 °C a 8 °C). O rendimento da extração foi calculado em relação à massa de droga vegetal utilizada.

4.2.4 Controle de qualidade dos extratos da droga vegetal

4.2.4.1 Avaliação dos caracteres organolépticos

Foram avaliadas as características organolépticas dos extratos etanólico seco e glicólico, tais como cor, sabor e odor.

4.2.4.2 Avaliação da solubilidade

A solubilidade do extrato glicólico e do extrato etanólico seco foi avaliada em solventes comumente utilizados em análises farmacopeicas, por exemplo, água, metanol, etanol absoluto, acetonitrila, solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L e solução de hidróxido de sódio a 0,1 mol/L.

Transferiu-se determinada quantidade (Tabela 9) dos extratos para tubo de ensaio ou erlenmeyer e adicionaram-se alíquotas sucessivas de solvente, exatamente medidas, conforme Tabela 9, até completa solubilização do extrato. Utilizou-se agitador mecânico (*vórtex*) e banho de ultra-som para homogeneização e solubilização das amostras. Em seguida, centrifugou-se uma alíquota de 5,0 mL (5 minutos, 100 rpm) para confirmação da ausência de material suspenso no solvente analisado. A solubilidade em cada solvente foi expressa conforme os termos descritivos da Farmacopéia Brasileira 4^a edição, como apresentados na Tabela 10.

Tabela 9 Quantidades de amostra e de solventes utilizados para avaliação da solubilidade

| Amostra (g) | Adição cumulativa de solvente (mL) | Volume de solvente (mL) | Partes de solvente para 1 g de amostra |
|-------------|------------------------------------|-------------------------|--|
| 1,0 | - | 1 | 1 |
| | 9 | 10 | 10 |
| | 20 | 30 | 30 |
| 0,01 | - | 1 | 100 |
| | 9 | 10 | 1.000 |
| | 90 | 100 | 10.000 |

O termo descritivo apresentado na Tabela 10 refere-se à dissolução de uma parte (1 g) da amostra no número de partes (volumes em mL) do solvente indicado.

Tabela 10 Termos descritivos para expressar a solubilidade

| Termo descritivo | Quantidade de solvente |
|-------------------------------------|--------------------------|
| Muito solúvel | Menos de 1 parte |
| Facilmente solúvel | De 1 a 10 partes |
| Solúvel | De 10 a 30 partes |
| Ligeiramente solúvel | De 30 a 100 partes |
| Pouco solúvel | De 100 a 1.000 partes |
| Muito pouco solúvel | De 1.000 a 10.000 partes |
| Praticamente insolúvel ou insolúvel | Mais de 10.000 partes |

4.2.4.3 Avaliação do pH

A determinação do pH foi avaliada em misturas de solventes, de modo a obter uma dispersão aquosa diluída de ambos os extratos etanólico seco e glicólico, em potenciômetro previamente calibrado.

Pesaram-se, separadamente, cerca de 2,0 g de cada extrato e transferiram-se para erlenmeyer. Adicionaram-se 20,0 mL de água ultrapura, agitou-se por 10 minutos, e mediu-se o pH (triplicata) da dispersão aquosa obtida.

O pH também foi avaliado na solução hidrometanólica de extrato etanólico seco. Pesaram-se cerca de 2,0 g da amostra, transferiram-se para erlenmeyer, adicionaram-se 2,0 mL de metanol e adicionaram-se 18 mL de água ultrapura. Homogeneizou-se e mediu-se o pH (triplicata) da dispersão hidrometanólica obtida.

4.2.4.4 Resíduo seco

Para os extratos etanólico seco e glicólico determinou-se o teor de resíduo seco, presente na amostra, de acordo com o método descrito nas monografias gerais para extratos secos (monografia 150) e extratos fluídos (monografia 148), respectivamente, da Farmacopéia Brasileira 4ª edição. (FARMACOPÉIA, 2001).

Pesaram-se exatamente, em triplicata, cerca de 0,50 g de extrato etanólico seco e de 2,0 g de extrato glicólico separadamente em pesa filtros, previamente dessecados. Evaporou-se o extrato glicólico até secura em banho maria. Dessecou-se em estufa a seco (105 °C, 3 h), esfriou-se a temperatura ambiente em dessecador sob vácuo, sobre sílica gel. Pesaram-se as amostras e calculou-se o resultado de resíduo seco como porcentagem de massa.

4.2.4.5 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa do extrato glicólico foi determinada de acordo com o método geral V.3.31 preconizado pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição.

Utilizou-se o picnômetro previamente calibrado com água ultrapura. Colocou-se a amostra no picnômetro e ajustou-se a temperatura para 20°C. Obteve-se o peso da amostra através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. O quociente entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20 °C, é a densidade relativa (d_{20}^{20}).

Calculou-se a densidade de massa (ρ_{20}), expressa em g/mL, a partir da expressão:

$$\rho_{20} = (0,99703 \times d_{20}^{20}) + 0,0012$$

4.2.4.6 Reações de identificação

De forma análoga à droga vegetal, foram realizados os testes de identificação B, C e D, por precipitação ou por formação de cor, descritos para barbatimão, porém, modificados para os extratos etanólico e glicólico de barbatimão (FARMACOPÉIA, 2002). Para todos estes testes de identificação utilizaram-se as mesmas soluções reagentes descritas no item 6.1.3 e as primeiras frações de extrato glicólico.

Teste B – Reação com gelatina - A 10 mg do extrato etanólico seco, adicionaram-se 4 gotas de metanol e agitou-se. Em seguida, adicionaram-se 2 mL de água ultrapura, 2

gotas de ácido clorídrico diluído (1:100) e gotejou-se gelatina SR. A 1 mL do extrato glicólico, adicionaram-se 2 gotas de ácido clorídrico diluído (1:100) e gotejou-se gelatina SR.

O aparecimento de precipitado nítido indica resultado positivo para taninos totais.

Teste C – Reação com cloreto férrico - A 10 mg do extrato etanólico seco, adicionaram-se 4 gotas de cloreto férrico a 1% (p/V) em metanol, agitou-se e, em seguida, 10 mL de água. A 1 mL do extrato glicólico, adicionaram-se 10 mL de água e 4 gotas de cloreto férrico a 1% (p/V) em metanol.

O desenvolvimento de cor cinza escura indica resultado positivo para taninos hidrolisáveis de identificação e condensados.

Teste D – Reação com vanilina - A 10 mg do extrato etanólico seco, adicionaram-se 0,5 mL de vanilina a 1% (p/V) em etanol, agitou-se. Em seguida, adicionaram-se 2 mL de água ultrapura, e 1 mL de ácido clorídrico. A 1 mL do extrato glicólico, adicionaram-se 0,5 mL de vanilina a 1% (p/V) em metanol e 1 mL de ácido clorídrico.

O desenvolvimento de cor vermelha indica a presença de taninos condensados.

4.2.4.7 Cromatografia em camada delgada

O teste de identificação A, descrito na monografia para barbatimão, foi realizado, com modificações, para análise das primeiras frações dos extratos glicólicos, bem como para o extrato etanólico seco (FARMACOPÉIA, 2002). Igualmente para a droga vegetal, utilizaram-se também, os mesmos sistemas eluentes alternativos e reveladores descritos no item 6.3.1.5, apresentados na Tabela 8, para análise das primeiras frações dos extratos glicólicos e para o extrato etanólico seco de barbatimão.

4.2.4.7.1 Extrato glicólico

Aplicaram-se, separadamente, à placa, em forma de banda, 10 µL de cada uma das soluções recentemente preparadas, descritas a seguir:

Solução do extrato glicólico (1): mediu-se 10 mL de extrato glicólico em proveta e diluiu-se para 20 mL com água ultrapura. Extraíu-se com três porções de 40 mL de acetato de etila, em funil de separação. Evaporaram-se as frações orgânicas reunidas, sob pressão reduzida, até líquido viscoso. Transferiu-se este líquido para cápsula de porcelana e secou-se em estufa a 105 °C até resíduo seco, com o auxílio de algumas gotas de metanol.

Solução padrão (2): solubilizaram-se 10 mg de catequina SQR em 2 mL de metanol.

4.2.4.7.2 Extrato etanólico seco

Aplicaram-se, separadamente, à placa, em forma de banda, 10 µL de cada uma das soluções recentemente preparadas, descritas a seguir:

Solução do extrato etanólico (1): solubilizaram-se 2,5 g de extrato etanólico em 10 mL de metanol.

Solução padrão (2): solubilizaram-se 2 mg de ácido gálico SQR em 1 mL de metanol.

Solução padrão (3): solubilizaram-se 2 mg de catequina SQR em 1 mL de metanol.

Solução padrão (4): solubilizaram-se 2 mg de epigalocatequina SQR em 1 mL de metanol.

Solução padrão (5): solubilizaram-se 2 mg de galato de epigalocatequina SQR em 1 mL de metanol.

Solução padrão (6): solubilizaram-se 2 mg de galocatequina SQR em 1 mL de metanol.

4.2.5 Aplicação de métodos analíticos farmacopeicos para quantificação de taninos totais

4.2.5.1 Método espectrofotométrico na região visível (λ 715 nm) utilizando reagente Folin-Denis (RFD) para quantificação de taninos totais em extratos de barbatimão, de acordo com Farmacopéia Brasileira 4ª edição

4.2.5.1.1 Seletividade

Avaliou-se a seletividade do método farmacopeico por meio da comparação dos espectros obtidos com o padrão e as amostras antes e após a adição dos reagentes para formação dos complexos, bem como por meio da comparação dos espectros das soluções de polifenóis totais e de polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele. Os espectros foram traçados na faixa λ 400 a 1000 nm para verificar a formação de banda de absorção em λ 715 nm, indicando formação de complexo entre os polifenóis e os metais tungstênio e molibdênio, presentes no RFD.

4.2.5.1.2 Linearidade

Construiu-se uma curva analítica para o pirogalol, após reação com o RFD, a partir da solução padrão estoque. A curva foi obtida realizando-se diluições da solução padrão estoque, de modo a se obter cinco concentrações diferentes para pirogalol.

Solução padrão de pirogalol: solubilizaram-se, imediatamente antes do uso, 50 mg de pirogalol SQR em água ultrapura e diluíram-se para 100 mL com o mesmo solvente. Diluíram-se 5 mL desta solução para 100 mL com água ultrapura, em balão volumétrico, obtendo-se solução a 25 µg/mL.

Solução RFD: Utilizou-se reagente comercial (item 4.1.3).

Volumes adequados de solução padrão estoque, medidos em bureta calibrada, foram adicionados a balões volumétricos de 25 mL (Tabela 11). Em seguida, adicionaram-se volumes adequados de solução RFD, com auxílio de micropipeta de 1,000 mL e homogeneizou-se por 1 minuto. Após 1 minuto, mas antes de 8 minutos, diluiu-se para 25 mL com solução de carbonato de sódio a 10,6% (p/V), homogeneizou-se. Mediu-se a absorvância exatamente 3 minutos após a adição do último reagente (carbonato de sódio) em λ 715 nm (A_3), usando-se a água ultrapura como branco. Todo o ensaio foi realizado ao abrigo da luz.

Tabela 11 Construção da curva analítica de pirogalol, por espectrofotometria na região visível, λ 715 nm após reação com RFD para doseamento de taninos totais (triplicata, abrigo da luz) (FARMACOPÉIA, 2002)

| Solução | Concentração (µg/mL) | Concentração de trabalho (%) | SEP ^a (mL) | RFD ^b (mL) | Na ₂ CO ₃ 10,6% (p/V) q.s.p. 25 mL |
|---------|----------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| 1 | 1,50 | 60 | 1,50 | 0,60 | 22,90 |
| 2 | 2,00 | 80 | 2,00 | 0,80 | 22,20 |
| 3 | 2,50 | 100 | 2,50 | 1,00 | 21,50 |
| 4 | 3,00 | 120 | 3,00 | 1,20 | 20,80 |
| 5 | 3,50 | 140 | 3,50 | 1,40 | 20,10 |

a: solução estoque padrão; b: solução reagente Folin-Denis

A faixa linear compreendida entre 60% e 140% da concentração de trabalho (2,5 µg/mL) corresponde à faixa de concentração de 1,5 a 3,5 µg/mL de pirogalol.

Após obtenção da curva analítica, a regressão linear foi realizada por meio do método dos mínimos quadrados utilizando o programa Microsoft Excel[®]. O coeficiente de correlação (r) deve ser superior a 0,99 e o desvio padrão relativo (DPR) da curva deve ser $\leq 2,0$ (GREEN, 1996; BRASIL, 2003).

4.2.5.1.3 Precisão Intra-corrída e Inter-corrída

A precisão intra-corrída foi avaliada por meio de determinações de amostra de extrato etanólico seco (n = 6) contendo uma concentração de polifenóis totais a 100% da concentração de trabalho. As soluções amostra foram preparadas conforme descrito abaixo.

As determinações de polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele foram realizadas por meio de diluições adequadas que fornecessem uma concentração dentro da faixa linear estabelecida na linearidade (item 4.2.5.1.2).

Solução de extrato concentrada (SEC): Pesaram-se 100 mg de extrato etanólico seco, solubilizaram-se com 2 mL de metanol, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume com água ultrapura obtendo-se solução a 400 µg/mL.

Polifenóis totais (PT): Diluíram-se 5 mL da SEC para 25 mL com água ultrapura, obtendo-se solução a 80 µg/mL. Misturaram-se 2,5 mL desta solução com 1 mL de solução RFD e homogeneizou-se por 1 minuto. Após 1 minuto, mas antes de 8 minutos, diluíram-se para 25 mL com solução de carbonato de sódio a 10,6% (p/V) e homogeneizou-se. Após exatamente 3 minutos, mediu-se a absorvância em λ 715 nm (A_1), usando-se a água ultrapura como branco.

Polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele (PNAPP): A 20 mL de SEC, em um erlenmeyer de boca esmerilhada, adicionaram-se 0,20 g de pó-de-pele e agitou-se mecanicamente por 60 minutos com os erlenmeyers hermeticamente fechados. Filtrou-se com dispositivos filtrantes de 0,45 µm. Misturaram-se 2,5 mL do filtrado com 1 mL de reagente Folin-Denis e homogeneizou-se por 1 minuto. Após 1 minuto, mas antes de 8 minutos, diluiu-se para 25 mL com solução de carbonato de sódio a 10,6% (p/V) e homogeneizou-se. Mediu-se a absorvância exatamente 3 minutos, após a adição do último reagente (carbonato de sódio), em λ 715 nm (A_2), usando-se a água ultrapura como branco.

Calculou-se o teor de taninos totais expressos como galato de epigallocatequina através das expressões:

$$T_{PT} = \frac{C_{PT}}{C_{EES1}} \times 100 \quad T_{PNA} = \frac{C_{PNA}}{C_{EES2}} \times 100$$

$$TT = TPT - TPNA$$

Em que:

T_{PT} : teor de polifenóis totais, em %;

C_{PT} : concentração de polifenóis totais, calculada pela curva analítica, em µg/mL;

C_{EES1} : concentração de extrato etanólico seco, na diluição utilizada para polifenóis totais, em µg/mL;

T_{PNA} : teor de polifenóis não adsorvidos, em %;

C_{PNA} : concentração de polifenóis não adsorvidos, calculada pela curva analítica, em µg/mL;

C_{EES2} : concentração de extrato etanólico seco, na diluição utilizada para polifenóis não adsorvidos, em µg/mL;

TT: teor de taninos totais.

O desvio padrão relativo (DPR, $n = 6$) ou coeficiente de variação (CV) referente às concentrações encontradas foi calculado. A precisão inter-corrída foi realizada pela repetição do procedimento descrito acima em dois dias diferentes, com o mesmo analista. Os resultados foram analisados em conjunto e calculou-se o DPR das 12 determinações obtidas. Recomenda-se que o valor de DPR seja inferior a 5,0% (BRASIL, 2003). Todo o ensaio foi realizado ao abrigo da luz.

4.2.5.2 Método espectrofotométrico na região visível (λ 760 nm) utilizando reagente Folin-Ciocalteu (RFC) para quantificação de taninos totais em extratos de barbatimão, de acordo com Farmacopéia Européia 6ª edição.

4.2.5.2.1 Seletividade

Avaliou-se a seletividade do método farmacopeico através da comparação dos espectros obtidos com o padrão e as amostras antes e após a adição dos reagentes para formação dos complexos, bem como através da comparação dos espectros das soluções de polifenóis totais e de polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele. Os espectros foram traçados na faixa λ 400 a 1000 nm para verificar a formação de banda de absorção em λ 760 nm, indicando formação de complexo entre os polifenóis e os metais tungstênio e molibdênio, presentes no RFC.

4.2.5.2.2 Linearidade

Construiu-se uma curva analítica para o pirogalol, após reação com o RFC, a partir das respectivas soluções padrão estoque. As curvas foram obtidas realizando-se diluições das soluções padrão estoque, de modo a se obter cinco concentrações diferentes para pirogalol.

Solução padrão estoque de pirogalol: solubilizaram-se, imediatamente antes do uso, 50 mg de pirogalol SQR em água ultrapura e diluíram-se para 100 mL com o mesmo solvente. Diluíram-se 5 mL desta solução para 100 mL com água ultrapura, em balão volumétrico, obtendo-se solução a 25 $\mu\text{g/mL}$.

Solução RFC (fosfomolibdotúngstico): Utilizou-se reagente comercial (item 4.1.3).

Volumes adequados de solução padrão estoque, medidos em micropipeta (1,000 mL) ou em bureta calibrada, foram adicionados a balões volumétricos de 25 mL (Tabela 12). Em seguida, adicionaram-se volumes adequados de RFC, com auxílio de micropipeta de 1,000 mL e homogeneizou-se por 1 minuto. Logo após, volume(s) adequado(s) de água ultrapura foi(ram) adicionado(s), com bureta calibrada, e

homogeneizou-se a mistura. Após 1 minuto, mas antes de 8 minutos, diluiu-se para balão volumétrico de 25 mL com solução de carbonato de sódio 29,0% (p/V), homogeneizou-se. Mediu-se a absorvância 30 minutos, após a adição do último reagente (carbonato de sódio), em λ 760 nm (A_2), usando-se a água ultrapura como branco. Todo o ensaio, em triplicata, foi realizado ao abrigo da luz.

Tabela 12 Construção da curva analítica de pirogalol, por espectrofotometria na região visível, λ 760 nm após reação com RFC para doseamento de taninos totais (triplicata, abrigo da luz) (EUROPEAN, 2007)

| Solução | Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | Concentração de trabalho (%) | SEP ^a (mL) | RFC ^b (mL) | Água (mL) | Na ₂ CO ₃ 29,0% (p/V) q.s.p. 25 mL |
|---------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------|--|
| 1 | 1,00 | 50 | 1,00 | 0,50 | 11,50 | 12,00 |
| 2 | 1,50 | 75 | 1,50 | 0,75 | 10,75 | 12,00 |
| 3 | 2,00 | 100 | 2,00 | 1,00 | 10,00 | 12,00 |
| 4 | 2,50 | 125 | 2,50 | 1,25 | 9,25 | 12,00 |
| 5 | 3,00 | 150 | 3,00 | 1,50 | 8,50 | 12,00 |

a: solução estoque padrão; b: reagente Folin-Ciocalteu

A faixa linear compreendida entre 50% e 150% da concentração de trabalho (2,00 $\mu\text{g/mL}$) corresponde à faixa de concentração de 1,00 a 3,00 $\mu\text{g/mL}$ de pirogalol.

A avaliação estatística da curva analítica foi realizada conforme descrito no item 4.2.5.1.2 Linearidade, para o método Folin-Denis.

4.2.5.2.3 Precisão Intra-corrída e Inter-corrída

A precisão intra-corrída foi avaliada por meio de determinações de amostra de extrato etanólico seco ($n = 6$) contendo uma concentração de polifenóis totais a 100% da concentração de trabalho. As soluções amostra foram preparadas conforme descrito abaixo. As determinações de polifenóis não adsorvidos foram realizadas por meio de diluições adequadas que fornecessem uma concentração dentro da faixa linear estabelecida na linearidade (item 4.2.5.2.2).

Solução de extrato concentrada (SEC): Pesaram-se 100 mg de extrato etanólico seco, solubilizaram-se com 2 mL de metanol, transferiram-se quantitativamente para balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume com água ultrapura obtendo-se solução a 400 $\mu\text{g/mL}$.

Polifenóis totais (PT): Diluíram-se 5 mL da SEC para 25 mL com água ultrapura, obtendo-se solução a 80 $\mu\text{g/mL}$. Misturaram-se 2 mL da solução extrato concentrada com 1 mL da solução RFC e homogeneizou-se por 1 minuto. Logo após, adicionaram-se 10 mL de

água ultrapura e homogeneizou-se. Após 1 minuto, mas antes de 8 minutos, diluiu-se para 25 mL com solução de carbonato de sódio 29,0% (p/V) e homogeneizou-se. Após 30 minutos mediu-se a absorvância em λ 760 nm (A_1), usando-se a água ultrapura como branco. O ensaio foi realizado em sextuplicata e ao abrigo da luz.

Polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele (PNAPP): A 10 mL de SEC, em um erlenmeyer de boca esmerilhada, adicionaram-se 0,10 g de pó-de-pele e agitou-se mecanicamente por 60 minutos com erlenmeyers hermeticamente fechados. Filtrou-se com dispositivos filtrantes de 0,45 μ m. Misturaram-se 2 mL do filtrado com 1 mL de reagente Folin-Ciocalteau e homogeneizou-se por 1 minuto. Logo após, adicionaram-se 10 mL de água ultrapura e homogeneizou-se. Após 1 minuto, mas antes de 8 minutos, diluiu-se para 25 mL com solução de carbonato de sódio 29% (p/V) e homogeneizou-se. Mediu-se a absorvância 30 minutos, após a adição do último reagente (carbonato de sódio), em 760 nm (A_2), usando-se a água ultrapura como branco. Todo o ensaio foi realizado ao abrigo da luz.

Calculou-se o teor de taninos totais expressos como galato de epigallocatequina através das expressões:

$$T_{PT} = \frac{C_{PT}}{C_{EES1}} \times 100 \quad T_{PNA} = \frac{C_{PNA}}{C_{EES2}} \times 100$$

$$TT = TPT - TPNA$$

Em que:

T_{PT} : teor de polifenóis totais, em %;

C_{PT} : concentração de polifenóis totais, calculada pela curva analítica, em μ g/mL;

C_{EES1} : concentração de extrato etanólico seco, na diluição utilizada para polifenóis totais, em μ g/mL;

T_{PNA} : teor de polifenóis não adsorvidos, em %;

C_{PNA} : concentração de polifenóis não adsorvidos, calculada pela curva analítica, em μ g/mL;

C_{EES2} : concentração de extrato etanólico seco, na diluição utilizada para polifenóis não adsorvidos, em μ g/mL;

TT: teor de taninos totais.

O desvio padrão relativo (DPR, $n = 6$) ou coeficiente de variação (CV) referente às concentrações encontradas foi calculado. A precisão inter-corrída foi realizada pela repetição do procedimento descrito abaixo em dois dias diferentes, com o mesmo analista. Os resultados foram analisados em conjunto e calculou-se o DPR das 12 determinações obtidas. Recomenda-se que o valor de DPR seja inferior a 5,0% (BRASIL, 2003).

4.2.6 Desenvolvimento e validação de método analítico alternativo por espectrofotometria na região ultravioleta para quantificação de taninos totais em extratos de barbatimão

Desenvolveu-se e validou-se um método analítico alternativo para doseamento de taninos totais por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, expressando o teor em galato de epigalocatequina.

4.2.6.1 Seleção e otimização das condições analíticas

Inicialmente, avaliaram-se os espectros dos padrões obtidos no cromatógrafo em fase líquida durante o desenvolvimento do método analítico por CLAE para escolha da substância de referência mais adequada na quantificação de taninos totais por espectrofotometria de absorção no UV.

Os espectros foram obtidos por meio de detector UV/DAD, acoplado ao cromatógrafo, após separação, na faixa λ 200 a 800 nm para ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, catequina e galato de epigalocatequina, todos na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ em metanol. O volume de injeção de cada solução padrão foi 2 μL e a fase móvel utilizada foi a mesma desenvolvida para o doseamento (de 95% a 60% de água ultrapura). Após esta análise preliminar, escolheu-se o galato de epigalocatequina como substância de referência.

Em seguida, foram traçados os espectros da solução padrão de galato de epigalocatequina, no espectrofotômetro, na faixa λ 200 a 400 nm, para confirmação do comprimento de onda máximo de absorção a ser utilizado.

Também foram traçados os espectros das soluções de extrato etanólico seco, de extrato glicólico e das frações purificadas (orgânica e aquosa) do extrato etanólico seco após pré-purificação conforme descrito no item 4.2.7.2.

Solução de galato de epigalocatequina (15 $\mu\text{g/mL}$): Pesaram-se com exatidão cerca de 5,0 mg de galato de epigalocatequina SQR. Transferiram-se para balão volumétrico de 100 mL âmbar e solubilizaram-se com aproximadamente 80 mL de água ultrapura. Completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se, obtendo-se uma solução a 50 $\mu\text{g/mL}$. Pipetaram-se 3,0 mL desta solução para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com água ultrapura e homogeneizou-se.

Solução de extrato etanólico seco (50 $\mu\text{g/mL}$): Pesaram-se com exatidão cerca de 25 mg de extrato etanólico seco, solubilizaram-se com 2 mL de metanol, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL âmbar, completou-se o volume com água ultrapura e homogeneizou-se, obtendo-se solução a 250 $\mu\text{g/mL}$. Diluíram-se 5 mL

desta solução para balão volumétrico de 25 mL âmbar, com água ultrapura e homogeneizou-se.

Solução da fração orgânica de extrato etanólico seco (50 µg/mL): Preparo igual ao da solução de extrato etanólico seco.

Solução da fração aquosa de extrato etanólico seco (50 µg/mL): Preparo igual ao da solução de extrato etanólico seco.

Solução de extrato glicólico a 0,025% (V/V): Pipetaram-se 5 mL de extrato glicólico para balão volumétrico de 100 mL âmbar. Diluíram-se com aproximadamente 80 mL de água ultrapura. Completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se, obtendo-se uma solução a 5% (V/V). Diluíram-se 5 mL desta solução para 100 mL com água ultrapura, em balão volumétrico âmbar, obtendo-se uma solução a 0,25% (V/V). Pipetaram-se 10 mL da solução a 0,25% (V/V) para balão volumétrico de 100 mL âmbar. Completou-se o volume com água ultrapura e homogeneizou-se.

Avaliou-se o solvente mais adequado para solubilização dos padrões e das amostras, bem como a interferência destes solventes na reação de precipitação dos taninos com o pó-de-pele. Verificou-se a quantidade ideal de pó-de-pele nas análises. Avaliou-se, ainda, o solvente ou a solução mais adequada a ser utilizada para ajuste do zero no espectrofotômetro. Para isto, traçaram-se espectros de água ultrapura, etanol absoluto, metanol e metanol 10% (V/V).

4.2.6.2 Validação do método analítico por espectrofotometria na região ultravioleta

O método analítico alternativo para doseamento de taninos totais por espectrofotometria no UV foi validado de acordo com os parâmetros e especificações recomendados pela Resolução Específica (RE) nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA e o Guia do *International Conference on Harmonisation* (ICH) de Validação de Procedimentos Analíticos (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL, 2005). Foram avaliadas as seguintes figuras de mérito no método: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

4.2.6.2.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação entre os espectros do marcador químico galato de epigallocatequina, em água ultrapura, e os espectros de extratos de barbatimão, em metanol a 0,4% (V/V). Também se compararam os espectros das soluções amostra antes e depois de reagirem com pó-de-pele. Todos os espectros foram traçados na região ultravioleta (faixa λ 200 a 400 nm).

4.2.6.2.2 Linearidade

Construiu-se uma curva analítica para o galato de epigallocatequina a partir da solução padrão estoque a 50 µg/mL. A curva foi obtida realizando-se diluições da solução padrão estoque, de modo a se obter cinco concentrações diferentes para este marcador químico. Todo o ensaio foi realizado ao abrigo da luz.

Solução padrão de galato de epigallocatequina: solubilizaram-se imediatamente antes do uso 5 mg de galato de epigallocatequina SQR em água ultrapura e diluíram-se para 100 mL com o mesmo solvente, em balão volumétrico, obtendo-se uma solução a 50 µg/mL. Volumes adequados de solução padrão estoque, medidos em bureta calibrada, foram adicionados a balões volumétricos de 10 mL (Tabela 13), completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se. Mediu-se a absorvância em λ 272 nm, usando-se a água ultrapura para ajuste do zero.

Tabela 13 Construção da curva analítica para galato de epigallocatequina por espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm

| Solução | Concentração (µg/mL) | Concentração de trabalho (%) | SEP ^a (mL) | Água ultrapura q.s.p. 10 mL |
|---------|----------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| 1 | 5,0 | 33 | 1,0 | 9,0 |
| 2 | 10,0 | 67 | 2,0 | 8,0 |
| 3 | 15,0 | 100 | 3,0 | 7,0 |
| 4 | 20,0 | 133 | 4,0 | 6,0 |
| 5 | 25,0 | 167 | 5,0 | 5,0 |
| 6 | 30,0 | 200 | 6,0 | 4,0 |

a: solução estoque padrão

A faixa linear compreendida entre 33% e 200% da concentração de trabalho (15,0 µg/mL) corresponde à faixa de concentração 5,0 a 30,0 µg/mL de galato de epigallocatequina.

A equação da reta e os dados estatísticos foram obtidos a partir da regressão linear utilizando-se o programa Microsoft Excel[®]. O coeficiente de correlação (r) deve ser superior a 0,99 e o desvio padrão relativo (DPR) da curva deve ser $\leq 2,0$ (GREEN, 1996; BRASIL, 2003).

4.2.6.2.3 Precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio

Avaliou-se a precisão intra-corrida por meio do cálculo do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) referente a seis determinações de amostra de extrato

etanólico seco (n = 6) contendo um teor de taninos totais a 100% da concentração de trabalho. A precisão inter-corrída foi realizada pela repetição do procedimento descrito abaixo em mais dois dias diferentes, com mesmo analista. Os resultados foram analisados em conjunto e calculou-se o DPR das 18 determinações obtidas. Recomenda-se que o valor de DPR seja inferior a 5,0% (BRASIL, 2003). O ensaio foi realizado em sextuplicata e ao abrigo da luz.

Solução de extrato concentrada (SEC): Pesaram-se com exatidão cerca de 25 mg de extrato etanólico seco, solubilizaram-se com 2 mL de metanol, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água ultrapura obtendo-se solução a 250 µg/mL.

Polifenóis totais (PT): Diluíram-se 5 mL da SEC para 25 mL com água ultrapura e homogeneizou-se, obtendo-se solução a 50 µg/mL. Em seguida, mediu-se a absorvância em 272 nm (A_1), usando-se a água ultrapura para ajuste do zero do espectrofotômetro.

Polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele (PNAPP): A 20 mL de SEC, em um erlenmeyer de boca esmerilhada, adicionaram-se 0,20 g de pó-de-pele e agitou-se mecanicamente por 60 minutos em erlenmeyer hermeticamente fechado. Filtrou-se com dispositivos filtrantes de 0,45 µm. Mediu-se a absorvância em λ 272 nm (A_2), usando-se a água ultrapura como branco.

Calculou-se o teor de taninos totais expressos como galato de epigalocatequina através das expressões:

$$T_{PT} = \frac{C_{PT}}{C_{EES1}} \times 100 \quad T_{PNA} = \frac{C_{PNA}}{C_{EES2}} \times 100$$

$$TT = TPT - TPNA$$

Em que:

T_{PT} : teor de polifenóis totais, em %;

C_{PT} : concentração de polifenóis totais, calculada pela curva analítica, em µg/mL;

C_{EES1} : concentração de extrato etanólico seco, na diluição utilizada para polifenóis totais, em µg/mL;

T_{PNA} : teor de polifenóis não adsorvidos, em %;

C_{PNA} : concentração de polifenóis não adsorvidos, calculada pela curva analítica, em µg/mL;

C_{EES2} : concentração de extrato etanólico seco, na diluição utilizada para polifenóis não adsorvidos, em µg/mL;

TT: teor de taninos totais.

4.2.6.2.4 Exatidão

A determinação da exatidão foi realizada em 4 níveis de concentração através do método de adição de padrão, com a adição de quantidades do marcador químico a uma quantidade conhecida de amostra de extrato etanólico bruto.

Foram preparadas as seguintes soluções padrão e amostra.

Solução padrão (50 µg/mL): pesaram-se com exatidão cerca de 5,0 mg do marcador químico galato de epigalocatequina, solubilizou-se com 1 mL de metanol e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL âmbar. Completou-se o volume com água ultrapura e homogeneizou-se.

Solução amostra (160 µg/mL): pesaram-se com exatidão cerca de 40,0 mg de extrato etanólico seco e solubilizou-se com 5 mL de metanol. Transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL âmbar, completou-se o volume com água ultrapura e homogeneizou-se, obtendo-se concentração de 800 µg/mL. Diluíram-se 10 mL desta solução para balão volumétrico de 50 mL âmbar, completou-se o volume com água e homogeneizou-se.

Soluções fortificadas: As soluções fortificadas foram preparadas pipetando-se 5,0 mL da solução amostra e volumes adequados de solução padrão, conforme Tabela 14 para balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o volume com água ultrapura e homogeneizou-se.

Tabela 14 Preparo das soluções fortificadas de galato de epigalocatequina para avaliação da exatidão por espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm

| Nível de concentração | Amostra (A) | | Padrão (P) | | A + P |
|-----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|-----------------------------|
| | Volume adicionado (mL) | Concentração (µg/mL) | Volume adicionado (mL) | Concentração (µg/mL) | Conc. teórica final (µg/mL) |
| Alto (167%) | 5,0 | 10,0 | 7,5 | 15,0 | 25,0 |
| Médio (133%) | 5,0 | 10,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| Médio (100%) | 5,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 15,0 |
| Baixo (67%) | 2,5 | 5,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 |

As soluções amostra e fortificada foram analisadas e os teores foram calculados a partir dos valores de absorvância do marcador químico e das curvas analíticas obtidas.

As porcentagens de exatidão foram calculadas pela relação entre a concentração padrão média determinada experimentalmente e a concentração padrão teórica correspondente, utilizando-se a equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(\text{Caf} - \text{Cam}) \times 100}{\text{Cpadrão teórica}}$$

Em que:

Caf: concentração do analito determinada na amostra fortificada;

Cam: concentração do analito determinada na amostra não-fortificada;

Cpadrão teórica: concentração teórica do padrão adicionado à amostra fortificada.

4.2.6.2.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ), para galato de epigalocatequina, foram estimados através de equações estabelecidas pelo Guia do ICH de Validação de Procedimentos Analíticos (INTERNATIONAL, 2005), descritas a seguir:

$$\text{LD} = \frac{3,3\sigma}{S} \qquad \text{LQ} = \frac{10\sigma}{S}$$

Em que:

σ : desvio padrão do intercepto da curva analítica;

S: inclinação da mesma curva.

4.2.6.2.6 Robustez

Avaliou-se a robustez do método a partir de modificações intencionais nas condições usuais de análise e verificando-se a sua influência nos resultados apresentados. O parâmetro analítico tempo de agitação com pó-de-pele foi modificado intencionalmente para 50 minutos e 70 minutos e os resultados individuais ($n = 6$) foram avaliados comparativamente em relação às condições usuais para seis soluções de amostra preparadas conforme item 4.2.6.2.3 (Precisão).

Os resultados de teor de galocatequina e de galato de epigalocatequina obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com índice de significância de 5%, e à comparação de médias pelo teste de Tukey, a fim de verificar a influência deste parâmetro na resposta fornecida pelo método analítico.

4.2.7 Desenvolvimento, validação e aplicação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de galocatequina e galato de epigalocatequina em extratos de barbatimão.

4.2.7.1 Desenvolvimento do método e otimização das condições cromatográficas

O método foi desenvolvido no Laboratório de Fitoquímica (FAFAR/UFMG) para análise de extratos de barbatimão da espécie *S. obovatum* pela bolsista de iniciação científica Priscila Tavares Guedes sob orientação da Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho, no projeto intitulado “Avaliação Química e Farmacológica de *Stryphnodendron obovatum* Benth” (CASTILHO, 2007).

A adaptação e a otimização do método para análises de extratos de barbatimão da espécie *S. adstringens* (Martius) Coville foi realizada utilizando soluções de extrato etanólico seco, de extrato glicólico e de substâncias de referência (catequina, ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, proantocianidina B2, galato de epigalocatequina e quercetina).

Solução estoque de extrato etanólico seco (10 mg/mL): Pesaram-se com exatidão cerca de 100 mg de extrato etanólico seco bruto, dissolveu-se em aproximadamente 8 mL de metanol e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se. Filtrou-se em dispositivos filtrantes de celulose regenerada de tamanho de poro de 0,45 µm diretamente em mini-frascos para CLAE.

Solução de extrato etanólico seco diluída (1 mg/mL): Pipetou-se 1 mL da solução estoque, com auxílio de micropipeta, e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com água ultrapura e homogeneizou-se, obtendo-se solução a 1 mg/mL em metanol 10% (V/V). Filtrou-se em dispositivos filtrantes de celulose regenerada de tamanho de poro de 0,45 µm diretamente em mini-frascos para CLAE.

Solução de extrato glicólico (10 µL/mL): Pipetaram-se 100 µL de extrato glicólico, com auxílio de micropipeta, e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com fase móvel acetonitrila e água (ACN:H₂O; 5:95) acidificada (0,1% ácido fosfórico V/V) e homogeneizou-se. Filtrou-se por meio de dispositivos filtrantes diretamente em mini-frascos para CLAE.

Solução padrão de catequina (1 mg/mL): Pesaram-se com exatidão cerca de 5 mg de catequina que foram transferidos para balão volumétrico de 5 mL. Dissolveu-se em aproximadamente 3 mL de metanol, completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se. Filtrou-se por meio de dispositivos filtrantes diretamente em mini-frascos para CLAE.

As soluções de ácido gálico SQR, galocatequina SQR, epigalocatequina SQR, proantocianidina B2 SQR, galato de epigalocatequina SQR e quercetina SQR, todas a 1 mg/mL, também foram preparadas da mesma maneira como descrito para catequina SQR.

Para estabelecer as melhores condições cromatográficas para a eluição das amostras, realizou-se, inicialmente, um gradiente exploratório amplo. Esta corrida cromatográfica em gradiente linear foi realizada como descrito por Snyder e colaboradores (1997) utilizando-se as condições cromatográficas descritas na Tabela 15. Para estabelecer um branco do gradiente, o procedimento também foi realizado com os solventes utilizados para a solubilização das soluções de extrato etanólico seco.

Vários volumes de injeção foram testados para otimização da concentração ideal das amostras. Variaram-se ainda o solvente das amostras e padrões, o pH da fase móvel, a temperatura da coluna e o comprimento de onda para a detecção.

Para avaliar a eficiência da separação da condição cromatográfica estabelecida, foram avaliados os parâmetros de adequação do sistema (resolução, R; fator de retenção, k; fator de cauda, T) e a pureza dos picos para os marcadores químicos. Para determinação do tempo morto (t_0), 5 μ L de solução de nitrato de sódio a 0,1 % (p/V) solubilizado em fase móvel ACN:água (5:95) acidificada (0,1% ácido fosfórico V/V) foram injetados nas mesmas condições de análise.

Tabela 15 Condições cromatográficas para a corrida exploratória em gradiente para determinação de taninos em insumos ou produtos vegetais (barbatimão *S. adstringens* (Martius) Coville)

| Parâmetros | Condições |
|----------------------------------|--|
| Volumes de injeção | 1 μ L a 10 μ L |
| Modo de injeção | Automático |
| Fase móvel e gradiente | Água:ACN (95:5) Etapa 1: Gradiente ACN 5% a 95% por 60 min Etapa 2: Isocrático ACN 95% por 5 min Etapa 3: Gradiente ACN 95% a 5% por 10 min |
| Fluxo da fase móvel | 1 mL/min |
| Coluna | LiChroCART® 250x4 mm, LiChrospher® 100 RP-18, 5 μ m, Merck, lote 849117 |
| Temperatura da coluna | 30 °C |
| Comprimentos de onda de detecção | λ 210 nm, 274 nm, 280 nm, 330 nm e 550 nm; Obtenção de espectros UV-VIS |
| Tempo de corrida | 60 min |

4.2.7.2 Pré-purificação das amostras de extrato etanólico seco de barbatimão

Duas técnicas para purificação das amostras de extrato etanólico seco foram testadas: extração em fase sólida (EFS) e partição líquido-líquido (PLL).

Diversos solventes para solubilização, composição de eluentes e gradientes de eluição foram testados para EFS. De modo análogo, diversas composições para PLL, assim como o número de lavagens, o volume da fase orgânica e da fase aquosa e a relação massa de amostras por volume de solventes foram avaliadas.

A purificação das amostras de extratos etanólicos secos foi realizada por meio de fracionamento por PLL de acordo com a Tabela 16.

Tabela 16 Composição do sistema de solvente utilizado para pré-purificação do extrato etanólico seco de barbatimão por partição líquido-líquido

| Fase | Composição | Volume (mL) | Amostra (mg) ^a |
|--------------|--------------------------|-------------|---------------------------|
| Orgânica | Acetato de etila | 3,5 | 250,0 |
| | Butanol | 0,5 | |
| | 2-propanol (isopropanol) | 1,0 | |
| Aquosa | Água ultrapura | 4,5 | |
| Total | | 9,5 | |

a: para amostras maiores, ajustar as quantidades dos solventes do sistema proporcionalmente.

Para pré-purificação do extrato etanólico seco por PLL procedeu-se da seguinte maneira:

1. Mediu-se, separadamente, em duplicata, cada volume dos solventes do sistema de solvente para PLL, transferindo-os para dois erlenmeyers com boca esmerilhada e tampa. Saturaram-se os sistemas com auxílio de agitador magnético durante 30 minutos,
2. Transferiu-se o volume de cada sistema (suficiente para 1 lavagem) de cada erlenmeyer para funil de separação.
3. Adicionaram-se cerca de 250 mg de extrato seco (pesados com exatidão).
4. Agitou-se, vigorosamente, por 30 segundos, três vezes, alternando após a separação das fases;
5. Recolheu-se a fase aquosa (inferior) em um béquer e a fase orgânica I (superior) em cápsula de porcelana tarada.
6. Retornou-se a fase aquosa para o mesmo funil de separação e adicionou-se nova fase orgânica, previamente saturada, repetindo-se os procedimentos 4 e 5.
7. Recolheu-se a fase orgânica II em cápsula de porcelana tarada, reunindo-a com a primeira fase orgânica coletada.

8. Recolheu-se a fase aquosa em cápsula de porcelana tarada.
9. Secaram-se a fase aquosa e as fases orgânicas reunidas (I e II) até resíduo, sob ar aquecido (não mais que 40 °C.) em capela.
10. Após a secagem das frações aquosa e orgânicas, pesaram-se as cápsulas e calculou-se o rendimento da extração para as frações obtidas.
11. Armazenaram-se as amostras, em frasco âmbar, hermeticamente fechado, identificado, em geladeira.

4.2.7.2.1 Caracterização das frações orgânicas por espectrofotometria de absorção no infravermelho

O espectro de absorção por reflectância atenuada (modo ATR, *attenuated total reflectance*) na região do infravermelho foi traçado na faixa $\bar{\nu}$ 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} para os resíduos das frações orgânicas I e II e aquosa, diretamente a partir dos resíduos obtidos da pré-purificação do extrato etanólico seco. As atribuições das bandas foram realizadas com relação à posição (números de onda, $\bar{\nu}$, cm^{-1}) e intensidades de transmitância (%T).

4.2.7.3 Validação do método analítico por CLAE

O método analítico para quantificação de galocatequina e galato de epigalocatequina nos extratos de barbatimão por CLAE foi validado de acordo com os parâmetros e especificações recomendados pela RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003) e o Guia do ICH de Validação de Procedimentos Analíticos (INTERNATIONAL, 2005). Foram avaliadas as figuras de mérito linearidade, precisão, exatidão, seletividade, robustez, limite de quantificação e limite de detecção.

4.2.7.3.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada pela determinação da pureza espectral dos picos dos marcadores químicos, obtida com auxílio do detector UV/DAD, no intervalo 200 nm a 800 nm. Considerou-se uma pureza mínima, 99,0%, como valor aceitável demonstrando-se que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente e o método é seletivo.

Também se avaliou a adequação do sistema cromatográfico estabelecida pelos parâmetros (resolução, R; fator de retenção, k; fator de cauda, T) para os picos dos marcadores químicos.

4.2.7.3.2 Linearidade

A linearidade foi verificada através da construção de duas curvas analíticas, em dois dias diferentes, utilizando-se os marcadores químicos galocatequina SQR e galato de epigalocatequina SQR. Preparou-se uma solução padrão única contendo 10 µg/mL de cada marcador químico em metanol 10% (V/V). A faixa de concentração dos marcadores foi estabelecida considerando a estimativa dos percentuais encontrados nos extratos preparados. Em seguida as soluções foram filtradas por meio de dispositivos filtrantes e, transferidas para mini-frascos e injetadas no cromatógrafo.

Injetaram-se, em triplicata, os volumes 3, 9, 15, 21, 27 e 33 µL da solução padrão única, totalizando-se 18 injeções, e a curva analítica foi construída em relação à massa da substância injetada (Tabela 17).

Tabela 17 Construção da curva analítica para galocatequina e galato de epigalocatequina por CLAE-UV/DAD a partir de solução padrão única de GC e de GEGC contendo 10 µg/mL em metanol 10% V/V para cada marcador químico

| Nível de concentração | Volume de injeção (µL) | Massa injetada de marcador (ng) | | Concentração de trabalho (%) | Faixa de concentração (µg/mL) |
|-----------------------|------------------------|---------------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | | Galocatequina | Galato de epigalocatequina | | |
| 1 | 3,0 | 30 | 30 | 20 | 3,0 |
| 2 | 9,0 | 90 | 90 | 60 | 9,0 |
| 3 | 15,0 | 150 | 150 | 100 | 15,0 |
| 4 | 21,0 | 210 | 210 | 140 | 21,0 |
| 5 | 27,0 | 270 | 270 | 180 | 27,0 |
| 6 | 33,0 | 330 | 330 | 220 | 33,0 |

A faixa linear avaliada para cada marcador químico foi de 20% a 220% da concentração de trabalho, o que corresponde à faixa de concentração de 3 µg/mL a 33 µg/mL. A curva analítica foi construída com os valores de área dos picos dos marcadores químicos em cada nível de concentração. Para a analítica, a equação da reta e os dados estatísticos foram obtidos a partir da regressão linear utilizando-se o programa Microsoft Excel[®]. O coeficiente de correlação (r) deve ser superior a 0,99 e o desvio padrão relativo (DPR) da curva deve ser ≤ 2,0% (GREEN, 1996; BRASIL, 2003). As curvas obtidas nos dois dias diferentes foram comparadas estatisticamente pelo programa GraphPad Prism[®] versão 4.00, 2003.

4.2.7.3.3 Precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio

A avaliação da precisão intra-ensaio (repetitividade) foi realizada, por meio de cálculo do desvio padrão relativo (DPR), a partir da injeção de soluções amostra de extrato etanólico seco ($n = 6$) contendo os marcadores a 100% da concentração de trabalho. As soluções amostra foram preparadas conforme descrito abaixo.

Solução da fração orgânica de extrato etanólico seco (1 mg/mL): Pesaram-se com exatidão cerca de 100 mg da fração orgânica de extrato etanólico seco, transferiram-se para balão volumétrico de 10 mL. Adicionaram-se cerca de 5 mL de metanol, agitou-se manualmente para dissolução da amostra e completou-se o volume com metanol. Em seguida, pipetou-se 1,000 mL desta solução, em sextuplicata, com auxílio de micropipeta, para balões volumétricos de 10 mL. Completou-se o volume com água ultrapura e homogeneizou-se. As soluções, na concentração de 1 mg/mL, foram filtradas por meio de dispositivos filtrantes, transferidas para mini-frascos e 10 μ L de cada solução foram injetados no cromatógrafo.

Os teores de galocatequina e galato de epigalocatequina nas frações orgânicas foram calculados a partir das áreas dos picos obtidos com as soluções amostra e com os dados das curvas analíticas construídas conforme item 4.2.7.3.2.

A precisão inter-ensaio (precisão intermediária) foi avaliada após a repetição deste procedimento em dois dias diferentes, com o mesmo analista ($n = 12$) e também em dois diferentes, com analistas diferentes ($n = 12$). Os resultados foram agrupados e calculou-se o desvio padrão relativo (DPR) das 12 determinações. Recomenda-se que o valor de DPR seja inferior a 5,0% (BRASIL, 2003).

4.2.7.3.4 Exatidão

A determinação da exatidão foi realizada em três níveis de concentração, em triplicata para cada nível, por meio do método de adição de padrão (marcador químico) a uma quantidade conhecida de amostra de extrato etanólico seco (250 mg) antes do processo de pré-purificação descrito no item 4.2.7.2.

Foi preparada a seguinte solução padrão.

Solução padrão (1 mg/mL): pesaram-se com exatidão cerca de 5 mg dos marcadores químicos galocatequina e galato de epigalocatequina. Transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 5 mL, solubilizou-se em 3 mL de fase orgânica previamente saturada com fase aquosa (item 4.2.7.2). Completou-se o volume com a fase orgânica e homogeneizou-se.

Para pré-purificação do extrato etanólico seco fortificado por PLL procedeu-se da seguinte maneira:

1. Os sistemas de solventes foram preparados, para cada nível de concentração a ser estudado, conforme subitens 1 e 2 descritos no item 4.2.7.2.
2. Foram retirados os volumes da fração orgânica correspondentes aos volumes a serem adicionados de padrão descritos na Tabela 18, antes da fortificação e da adição das amostras.
3. Adicionaram-se os volumes de solução de padrão descritos na Tabela 18.
4. Adicionaram-se cerca de 250 mg de extrato etanólico seco (pesados com exatidão).
5. Procedeu-se conforme descrito nos subitens 4 a 9 descritos no item 4.2.7.2.

Tabela 18 Preparo das amostras de extrato etanólico seco fortificadas com GC e GEGC, adicionados antes da pré-purificação, para avaliação da exatidão por CLAE

| Padrão | Nível | Amostra (A) | Padrão (P) | | A + P |
|--------|-------|-------------|------------------------|----------|------------------------|
| | | Teor (%) | Volume adicionado (mL) | Teor (%) | Teor teórico final (%) |
| GC | Alto | | 2,40 | 2,40 | 3,90 |
| | Médio | 1,50 | 1,50 | 1,50 | 3,00 |
| | Baixo | | 0,60 | 0,60 | 2,10 |
| GEGC | Alto | | 2,40 | 2,40 | 3,90 |
| | Médio | 1,50 | 1,50 | 1,50 | 3,00 |
| | Baixo | | 0,60 | 0,60 | 2,10 |

Foram preparadas as seguintes soluções amostra.

Solução da fração orgânica não fortificada (1 mg/mL): preparada conforme descrito no item 4.2.7.3.3 Precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio.

Solução de fração orgânica fortificada (1 mg/mL): Pesaram-se com exatidão cerca de 10 mg da fração orgânica de extrato etanólico seco, transferiram-se para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 1 mL de metanol, agitou-se manualmente para dissolução da amostra, completou-se o volume com água ultrapura e homogeneizou-se.

Solução de fração aquosa fortificada (1 mg/mL): Pesaram-se com exatidão cerca de 10 mg da fração aquosa de extrato etanólico seco, transferiram-se para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 1 mL de metanol, agitou-se manualmente para dissolução da amostra, completou-se o volume com água ultrapura e homogeneizou-se.

As soluções amostra fortificada e não fortificada foram filtradas por meio de dispositivos filtrantes, transferidas para mini-frascos e 10 µL de cada solução foram injetados no cromatógrafo.

Os cálculos de teor de todas as amostras foram realizados em relação às quantidades de fração orgânica, obtidas experimentalmente, descontados os teores obtidos do analito na fração aquosa correspondente, utilizando-se as áreas dos marcadores químicos e as curvas analíticas obtidas.

As porcentagens de exatidão foram calculadas pela relação entre o teor padrão médio, determinado experimentalmente, e o teor padrão teórico correspondente, utilizando-se a equação descrita a seguir.

A determinação da exatidão também foi realizada em três níveis de concentração, em triplicata para cada nível, por meio do método de adição de padrões (marcadores químicos) a uma quantidade conhecida de amostra de fração orgânica, após o processo de pré-purificação.

Foram preparadas as seguintes soluções padrão e amostra.

Solução padrão (20 µg/mL): pesou-se com exatidão cerca de 1 mg dos marcadores químicos galocatequina e galato de epigalocatequina. Solubilizou-se em 5 mL de metanol e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL âmbar, completou-se o volume com água ultrapura e homogeneizou-se.

Solução amostra (5 mg/mL): pesaram-se com exatidão cerca de 125 mg da fração orgânica do extrato etanólico seco. Transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL âmbar e acrescentaram-se cerca de 10 mL de metanol. Solubilizou-se a amostra, completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se.

Soluções fortificadas: As soluções fortificadas foram preparadas pipetando-se 1 mL da solução amostra e volumes adequados de solução padrão, conforme Tabela 19 para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com água ultrapura e homogeneizou-se.

Tabela 19 Preparo das soluções de fração orgânica fortificadas com GC e GEGC, adicionados após a pré-purificação, para avaliação da exatidão por CLAE

| Nível de concentração | Amostra (A) | | Padrão (P) | | A + P |
|-----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|-----------------------------|
| | Volume adicionado (mL) | Concentração (µg/mL) | Volume adicionado (mL) | Concentração (µg/mL) | Conc. teórica final (µg/mL) |
| Alto | | | 6,75 | 13,5 | 21,0 |
| Médio | 1 | 7,5 | 3,75 | 7,5 | 15,0 |
| Baixo | | | 0,75 | 1,5 | 9,0 |

As soluções amostra fortificada e não fortificada foram filtradas por meio de dispositivos filtrantes, transferidas para mini-frascos e 10 µL de cada solução foram

injetados no cromatógrafo. Os teores foram calculados a partir da área dos marcadores químicos e das curvas analíticas obtidas.

As porcentagens de exatidão foram calculadas pela relação entre a(o) concentração (teor) padrão média(o) determinada(o) experimentalmente e a(o) concentração (teor) padrão teórica(o) correspondente, utilizando-se a equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_{af} - C_{am}) \times 100}{C_{\text{padrão teórica}}}$$

Em que:

C_{af} : concentração (teor) do analito determinada(o) na amostra fortificada

C_{am} : concentração (teor) do analito determinada(o) na amostra não-fortificada

$C_{\text{padrão teórica}}$: concentração (teor) teórica(o) do padrão adicionado à amostra fortificada

4.2.7.3.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ), para cada marcador químico, foram estimados por meio das equações estabelecidas pelo Guia do ICH de Validação de Procedimentos Analíticos (INTERNATIONAL, 2005), descritas a seguir:

$$LD = \frac{3,3\sigma}{S} \qquad LQ = \frac{10\sigma}{S}$$

Em que:

σ : desvio padrão do intercepto da curva analítica

S: inclinação da mesma curva.

4.2.7.3.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada a partir de alterações intencionais nas condições usuais de análise (descritas na Tabela 20) e verificando-se a sua influência nos resultados apresentados. Os seguintes parâmetros analíticos foram modificados:

- A. Fabricante da coluna cromatográfica (coluna testada Zorbax® Eclipse XDB-C18, 250x4,6 mm, 5 μ m, Agilent, Lote B05108);
- B. Inclinação da Etapa 1 do gradiente (4,8% a 41,0% de acetonitrila em 60 minutos e 5,2% a 39,0% de acetonitrila em 60 minutos).

Tabela 20 Condições cromatográficas usuais para análise de extratos de barbatimão

| Parâmetros | Condições |
|----------------------------------|---|
| Volumes de injeção | 10 µL |
| Fase móvel | A:B (95:5) A: H ₃ PO ₄ 0,1% V/V em água B: H ₃ PO ₄ 0,1% V/V em ACN |
| Modo de eluição | Etapa 1: Gradiente B 5% a 40% por 60 min Etapa 2: Isocrático B 40% por 5 min Etapa 3: Gradiente B 40% a 5% por 10 min |
| Fluxo | 1 mL/min |
| Coluna | LiChroCART® 250x4 mm, LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, Merck, lote 849117 |
| Temperatura da coluna | 40 °C |
| Comprimentos de onda de detecção | λ 210 nm com aquisição de espectros UV-VIS/DAD |
| Tempo de corrida | 60 min |

Os parâmetros modificados foram avaliados individualmente em relação às condições usuais de análise para seis soluções da fração orgânica de extrato etanólico seco de *S. adstringens*, preparadas conforme item 4.2.7.3.3 (Precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio).

A partir dos resultados de teor de galocatequina e de galato de epigalocatequina obtidos, foi feita uma análise de variância (ANOVA), com índice de significância de 5%, e comparação de médias pelo teste de Tukey, a fim de se verificar a influência de cada parâmetro na resposta fornecida pelo método analítico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONTROLE DE QUALIDADE DA DROGA VEGETAL

A qualidade de um produto final pode ser assegurada, em grande parte, a partir do estabelecimento dos parâmetros de qualidade para a matéria-prima e de um planejamento adequado de controle em processo durante a fabricação do medicamento. Desse modo, a busca da qualidade do produto fitoterápico inicia-se com a avaliação de parâmetros de qualidade da droga vegetal utilizada, dos extratos obtidos, bem como dos demais excipientes utilizados na formulação do produto acabado. Com a avaliação da qualidade da droga vegetal objetiva-se a verificação da identidade botânica do material, a avaliação da sua pureza e a caracterização dos constituintes químicos da espécie, especialmente daqueles envolvidos na atividade terapêutica (SIMÕES *et al.*, 2004).

5.1.1 Operações de secagem e de divisão da droga vegetal

O processo de secagem tem por finalidade a retirada de água de modo a impedir reações de hidrólise e de crescimento microbiano, e facilitar o armazenamento e o transporte sem riscos de deterioração (SHARAPIN, 2000). A operação se caracteriza pela exposição a temperaturas relativamente baixas, normalmente inferiores a 60 °C e a longo tempo de contato, em geral, em torno de 7 dias (FALKENBERG *et al.*, 2002).

As operações de divisão são sinônimas de redução de tamanho de partículas, a qual é obtida mediante aplicação de forças mecânicas de choque ou impacto, atrito, corte ou combinação delas (LIEBERMANN *et al.*, 1990). Esta operação tem finalidades tecnológicas específicas como facilitar manuseio, transporte, embalagem e armazenagem, assim como a mistura e extração da matéria-prima.

O processo de secagem foi realizado em 10 dias sendo que a perda total média de água foi de 48,70%. Após a secagem, as cascas da planta apresentaram-se adequadamente secas, sem sinais de contaminação por fungos, material estranho, material em decomposição ou ataque por insetos. A sua divisão, por meio de moinho de facas, levou a uma mistura de pós, homogênea e isenta de material estranho a olho nu.

5.1.2 Avaliação dos caracteres organolépticos

Na avaliação organoléptica da amostra, o pó das cascas secas apresentou as características estabelecidas para a espécie, apresentando coloração castanho-

avermelhada, odor característico e de sabor adstringente. A droga vegetal não apresentou sinais sensitivos de contaminação por fungos ou odor de material em decomposição.

Este ensaio é simples e um meio rápido de verificar alguns parâmetros de qualidade, principalmente, identidade e pureza.

5.1.3 Determinação da granulometria dos pós da droga vegetal

O grau de divisão pode ser expresso por meio da referência à abertura nominal da malha do tamis utilizado. Segundo Sharapin (2000), a extração de uma droga em partes inteiras ou dividida em fragmentos grossos seria incompleta devido a pobre penetração de solvente no tecido vegetal. O processo de extração seria ainda igualmente muito lento, uma vez que as membranas celulares atuam como verdadeiras barreiras que dificultam o processo de extração. Entretanto, a divisão excessiva, com formação de pós muito finos, pode causar problemas durante a extração, como por exemplo, compactação do pó nos processos de percolação o que dificulta a passagem do solvente e gera uma extração incompleta da droga. Nos processos de maceração, as partículas muito finas podem passar para o extrato causando turbidez. Segundo o mesmo autor, quando o material vegetal destina-se a produção industrial de extratos e tinturas utiliza-se, em geral, um pó classificado como “moderadamente grosso” ou “semi fino”.

A Farmacopéia Brasileira 4ª edição classifica os pós em:

Pó grosso: aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha 1700 μm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha 355 μm .

Pó moderadamente grosso: aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha 710 μm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha 250 μm .

Pó semi-fino: aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha 355 μm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha 180 μm .

Pó fino: aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha 180 μm .

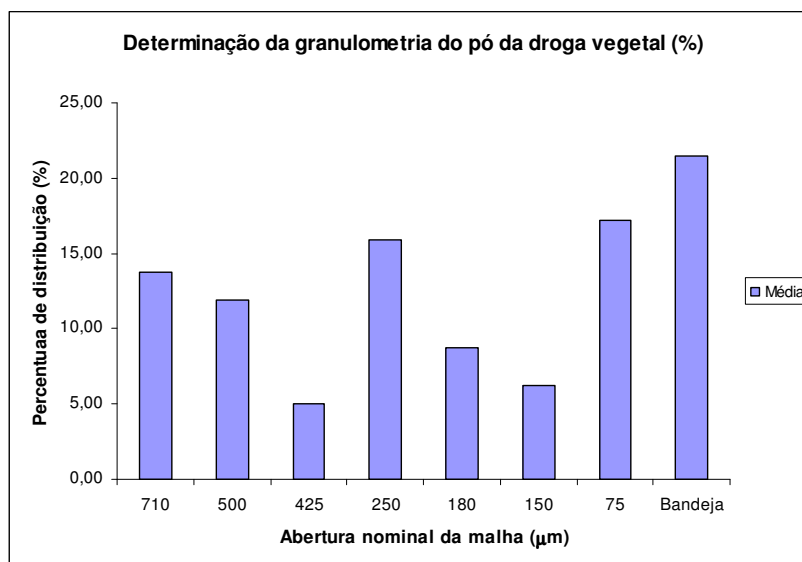
Pó finíssimo: aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha 125 μm .

Os resultados encontrados para a determinação da granulometria dos pós das cascas de barbatimão são apresentados na Tabela 21 e na Figura 7.

Tabela 21 Resultados da análise granulométrica da droga vegetal micronizada por meio de tamisação

| Abertura nominal da malha (μm) | % Retida dos pós ^a | | | | Média acumulada | (%) Tamisada dos pós |
|---|-------------------------------|--------|--------|--------|-----------------|----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | Média | | |
| 710 | 13,46 | 13,64 | 14,11 | 13,74 | 13,74 | 86,44 |
| 500 | 11,66 | 11,57 | 12,48 | 11,90 | 25,64 | 74,54 |
| 425 | 5,40 | 4,71 | 4,92 | 5,01 | 30,65 | 69,53 |
| 250 | 15,63 | 15,76 | 16,22 | 15,87 | 46,52 | 53,66 |
| 180 | 8,74 | 8,73 | 8,68 | 8,71 | 55,23 | 44,95 |
| 150 | 6,42 | 5,79 | 6,57 | 6,26 | 61,49 | 38,69 |
| 75 | 17,35 | 18,72 | 15,63 | 17,23 | 78,72 | 21,46 |
| Bandeja | 21,52 | 21,32 | 21,53 | 21,46 | 100,18 | 0,00 |
| Total | 100,17 | 100,24 | 100,13 | 100,18 | - | - |

a: triplicata

**Figura 7** Distribuição granulométrica da droga vegetal (cascas de barbatimão) micronizada em moinho de facas.

Como pode ser observado pelos resultados, o pó obtido da divisão das cascas de barbatimão apresenta distribuição granulométrica heterogênea, não possuindo uma classificação definida conforme a Farmacopéia Brasileira 4^a edição. A heterogeneidade obtida deve-se, provavelmente, às características da droga em casca e ao tipo de moinho utilizado (moinho de facas).

5.1.4 Reações de identificação

A amostra de droga vegetal apresentou teste positivo para todas as reações características de taninos condensados e de taninos hidrolisáveis presentes na planta.

Teste B – Reação com gelatina - Desenvolveu-se reação positiva com formação de precipitado nítido. Neste teste de identificação ocorre formação de complexos entre a gelatina e os taninos, tanto de forma reversível quanto de forma irreversível. A gelatina é composta por 18 aminoácidos, sendo a glicina e a prolina os aminoácidos mais abundantes.

A Figura 8 exemplifica a formação do complexo entre os resíduos de aminoácidos presentes na gelatina e a estrutura dos taninos condensados.

Os taninos reversíveis são estabelecidos via ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, enquanto que os irreversíveis ocorrem em condições oxidativas via ligações covalentes. As ligações de hidrogênio são provavelmente formadas entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e os grupos amida das proteínas. As interações hidrofóbicas ocorrem entre os núcleos aromáticos dos taninos e as cadeias laterais alifáticas ou aromáticas dos aminoácidos protéicos (HAGERMAN *et al.* 1978, 1998; SIMÕES *et al.*, 2004).

Os complexos irreversíveis entre taninos e a gelatina ocorrem por reações de oxidação quando os complexos reversíveis de tanino-proteína são expostos ao ar ou são mantidos em soluções de pH alto (HASLAM, 1998).

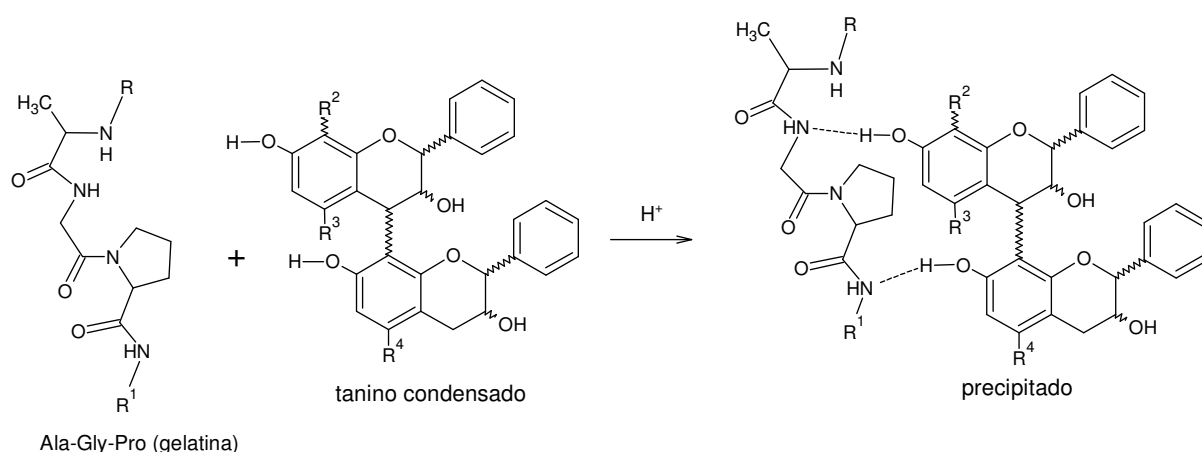


Figura 8 Representação da reação característica de identificação de taninos com gelatina (estrutura típica –Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro-).

Teste C – Reação com cloreto férrico - Desenvolveu-se reação positiva por coloração cinza escura. Nesta reação ocorre complexação do Fe^{3+} com as hidroxilas fenólicas dos taninos condensados e hidrolisáveis, como pode ser demonstrado na Figura 9. Apesar da representação indicar reação apenas com a hidroxila do anel B (aromático superior), a complexação pode ocorrer com qualquer hidroxila.

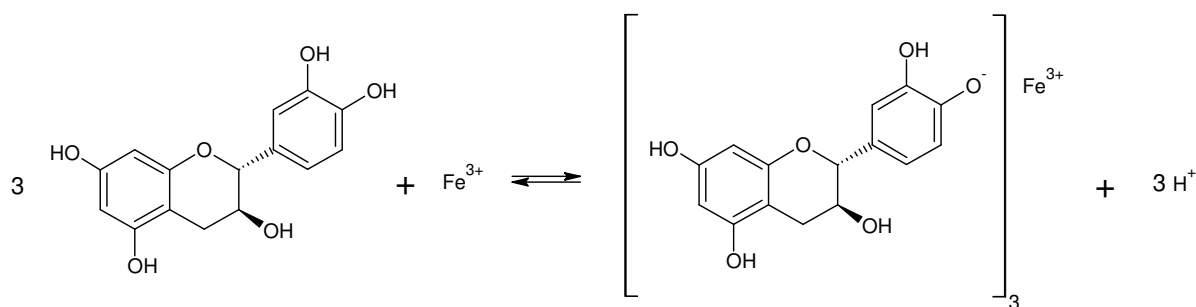


Figura 9 Reação característica de identificação de taninos com cloreto férrico.

Teste D – Reação com vanilina - Desenvolveu-se reação positiva por coloração vermelha. Nesta reação de identificação ocorre formação de complexo colorido entre a vanilina e os taninos condensados, como pode ser visto na Figura 10. O sucesso deste tipo de reação depende do tipo de solvente utilizado, da natureza e da concentração de ácido, do tempo de reação, temperatura e a concentração de vanilina. Uma das vantagens deste método é a especificidade da vanilina por meta-difenóis (SCHOFIELD *et al.*, 2001).

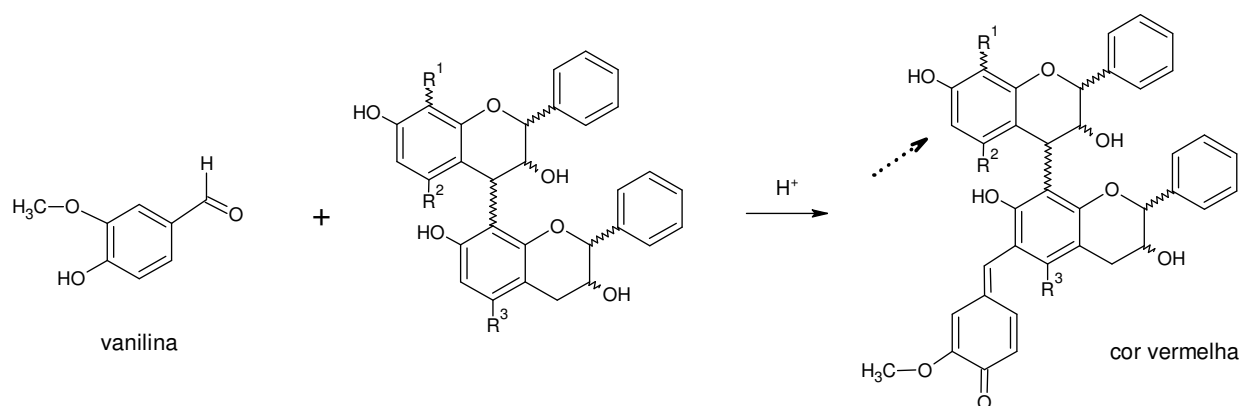


Figura 10 Reação característica de identificação de taninos com vanilina em meio ácido (a seta pontilhada indica um segundo sítio reacional em potencial).

5.1.5 Cromatografia em camada delgada

A CCD de sílica gel é uma das técnicas mais amplamente utilizadas para separação e identificação de substâncias. É um método cromatográfico no qual a fase móvel move-se por capilaridade através de uma camada fina e uniforme de fase estacionária (adsorvente) aderida a uma placa de vidro ou folha de alumínio, portanto, a CCD dentre outras variantes adicionais é referida como cromatografia planar. Quando uma mistura de substâncias é aplicada na placa e esta é separada por meio da fase móvel, os constituintes da mistura se movem pela fase estacionária em velocidades diferentes, dependendo de sua afinidade pela fase móvel ou estacionária, de acordo com a sua polaridade, valores de pKa ou capacidade de formação de ligações de hidrogênio, sendo então, separados. A sua importância e sua ampla utilização são atribuídas as vantagens na identificação de fármacos com a possibilidade de se testar um número muito grande de amostras simultaneamente; modesta demanda de equipamentos e de recursos e a facilidade de treinamento (CLARKE'S, 1986; ADAMOVICS, 1997).

5.1.5.1 Sistema eluente conforme Farmacopéia Brasileira 4ª edição

Primeiramente, obtiveram-se perfis por CCD em sílica gel utilizando-se o sistema eluente acetato de etila:tolueno:ácido fórmico:água (80:10:5:5). As cromatofolhas foram reveladas sob luz UV λ 254 nm e λ 365 nm e, em seguida, foram nebulizadas, separadamente, com todos os reveladores descritos no item 4.1.4.

A catequina foi utilizada como substância de referência por estar relacionada na monografia do barbatimão e por ser um monômero dos taninos condensados presente nos extratos desta planta (FARMACOPÉIA, 2002).

Na Figura 11 estão apresentadas as cromatofolhas. O sistema eluente utilizado, preconizado na monografia para o barbatimão, mostrou-se adequado, pois permitiu boa separação dos constituintes nas amostras. Os extratos testados apresentaram manchas de fluorescência atenuada com o mesmo valor de R_f da catequina padrão, evidenciando a identificação por meio desse teste.

Em geral, os perfis cromatográficos dos extratos glicólicos e cetônicos foram semelhantes, porém, as principais bandas apresentaram-se com coloração ou fluorescência mais atenuada na amostra de extrato glicólico. Tal fato pode ter ocorrido devido a diferenças nas concentrações das soluções aplicadas.

Os reveladores cloreto férrico e vanilina (Figura 11,a,b) mostraram-se adequados à revelação dos constituintes químicos dos extratos bem como da catequina SQR. Entretanto, a vanilina mostrou maior seletividade por revelar compostos com valores de R_f maiores não

revelados pelo cloreto férrico. Provavelmente, isso ocorre devido a especificidade da vanilina por meta-difenóis (SCHOFIELD *et al.*, 2001), o que expande a ressonância dos anéis aromáticos e intensifica a cor dos compostos quando comparados com os complexos formados com o cloreto férrico.

Na Tabela 22 são apresentados os valores de R_f calculados para a catequina SQR e para as principais manchas reveladas nas amostras de extratos.

O cloreto de alumínio e o NP-PEG (Figura 11,c,d) não revelaram de forma apropriada os taninos presentes nos extratos cetônico e glicólico purificado, uma vez que as manchas reveladas foram de difícil visualização. Isto se deve ao fato de tais reveladores serem específicos para flavonóides. O cloreto de alumínio é capaz de quelar grupos funcionais como 5-hidroxi-4-ceto, 3-hidroxi-4-ceto e sistemas o-dihidroxi (HARBORNE *et al.*, 1975), presentes nas estruturas de flavonóides. Como os taninos também podem possuir um sistema o-dihidroxi na estrutura, isto explicaria a presença de manchas, de cor azul escuro, referentes à catequina padrão e à catequina presente nos extratos, todos com R_f de 0,59. A mancha amarela fluorescente tênue com R_f 0,83 pode se tratar de um flavonóide bem apolar em relação aos demais constituintes, presente em baixas concentrações nas amostras.

O NP-PEG revelou duas manchas amarelas, intensamente fluorescentes, no extrato cetônico (R_f 0,66 e 0,72) e no extrato glicólico (R_f 0,68 e 0,72). Tais manchas também podem ser de flavonóides mais apolares do que os taninos presentes nas amostras, os quais também são revelados por cloreto férrico e por vanilina. A vanilina apresentou-se mais sensível que o cloreto férrico, pois as manchas são de intensidade um pouco mais forte. Apesar deste revelador não ser específico para os taninos, é possível visualizar mancha azul escuro fluorescente do padrão (R_f 0,63) e manchas referentes à catequina nas amostras do extrato cetônico (R_f 0,62) e do extrato glicólico (R_f 0,63).

Estes valores ligeiramente maiores dos fatores de retenção obtidos nesta cromatofolha podem ser explicados por pequenas interferências as quais podem ocorrer nas análises em dias diferentes, tais como temperatura, saturação da cuba cromatográfica, pequenas variações na composição da fase móvel e solventes de marcas diferentes. Entretanto, os fatores de retenção, tanto do padrão quanto da mancha referente nas amostras são próximos indicando que a análise foi adequada.

Com o NP-PEG como revelador, também houve aparecimento de mancha amarela levemente fluorescente com R_f 0,89 na amostra de droga vegetal o que pode confirmar a presença de um flavonóide muito apolar também revelado com vanilina e cloreto férrico.

As cromatofolhas de alumínio CCD de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) sob luz UV λ 254 nm apresentaram manchas, de coloração azul escuro, referentes à catequina SQR e manchas na mesma altura de intensidade atenuada tanto no extrato cetônico quanto no extrato glicólico da droga vegetal. Este revelador mostrou-se adequado ao teste de identificação por

CCD, a técnica conta com um custo mais elevado, uma vez que requer cromatofolhas específicas e lâmpada ultravioleta reveladora.

As mesmas cromatofolhas de CCD foram observados sob luz UV λ 365 nm e apresentaram-se de cor escura e não houve revelação adequada de qualquer mancha.

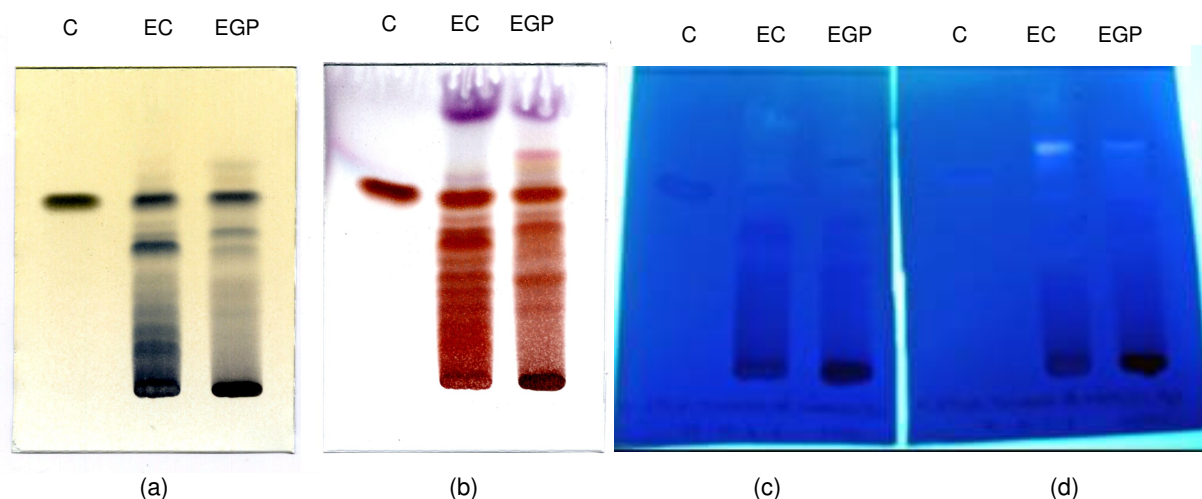


Figura 11 Perfis em CCD para catequina SQR (C), extrato cetônico (EC) e extrato glicólico purificado (EGP) em cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄. Eluente: acetato de etila:tolueno:ácido fórmico:água (80:10:5:5). Reveladores: (a) FeCl₃; (b) vanilina; (c) AlCl₃, UV λ 365 nm e (d) NP-PEG, UV λ 365 nm.

Assim, tanto o cloreto férrico quanto a vanilina mostraram-se ser reveladores sensíveis, práticos e rápidos para a revelação de amostras de barbatimão por meio de CCD. O cloreto férrico, por revelar preferencialmente os taninos, é mais seletivo a este grupo químico, enquanto a vanilina é mais sensível a estes compostos por apresentar manchas mais intensas para as mesmas concentrações de amostra utilizadas com o cloreto férrico. Além disto, a vanilina foi capaz de revelar outros constituintes químicos presentes nas amostras de extratos de barbatimão.

Entretanto, com a vanilina foi possível revelar outros compostos ainda não identificados os quais não apresentaram boa separação nas condições dos testes, mas não se inviabiliza a identificação da catequina SQR nos extratos analisados.

Tabela 22 Valores de R_f para catequina SQR e amostras de extratos de barbatimão em cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ (FARMACOPÉIA, 2002).

| Sistema eluente | Reveladores / Valores de R_f | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------------|-----------------|------------------|----------|------|------|-------------------|------|------|--------|------|------|
| | FeCl ₃ | | | Vanilina | | | AlCl ₃ | | | NP-PEG | | |
| | C ^a | EC ^b | EGP ^c | C | EC | EGP | C | EC | EGP | C | EC | EGP |
| Acetato de etila: tolueno:ácido fórmico:água (80:10:5:5) | | | | | 0,84 | 0,84 | | 0,83 | | | 0,89 | |
| | | | | | | 0,73 | | | | | 0,72 | 0,72 |
| | | | 0,69 | | | 0,69 | | | | | | 0,68 |
| | | 0,65 | 0,66 | | 0,65 | | | | | | 0,66 | |
| | 0,58 | 0,58 | 0,60 | 0,59 | 0,57 | 0,59 | 0,59 | 0,59 | 0,59 | 0,63 | 0,62 | 0,63 |
| | 0,48 | 0,49 | | 0,47 | 0,48 | | | | | | | |
| | 0,45 | 0,44 | | 0,43 | 0,43 | | | | | | | |

C: catequina padrão, EC: extrato cetônico, EGP: extrato glicólico purificado.

5.1.5.2 Método com sistemas eluentes alternativos

Foram obtidos perfis por CCD em sílica gel, empregando-se várias outras condições cromatográficas descritas para isolamento e identificação de taninos, utilizando-se como reveladores luz UV λ 254 nm, cloreto férrico 1% (p/V) em metanol e vanilina 1% (p/V) em etanol seguida de ácido sulfúrico 5% (V/V) em etanol, descritos no item 4.1.4 (WAGNER & BLADT, 1996; PÉREZ, 1996; SUN, *et al.* 1998; ARDISSON *et al.*, 2001; SANTOS *et al.* 2002),

Com os eluentes acetona:tolueno:ácido fórmico (3:3:1) e acetona:tolueno:ácido acético (3:3:1) houve separação e identificação adequadas dos constituintes químicos e de catequina SQR (Figura 12). Apesar da força eluente menor, as bandas foram bem resolvidas e os perfis cromatográficos das amostras são bem semelhantes aos obtidos com o sistema eluente farmacopeico (item 5.1.5.1). Tais sistemas podem, portanto, ser alternativos ao sistema eluente acetato de etila:tolueno:ácido fórmico:água (80:10:5:5). Os valores de R_f calculados para catequina SQR e para as manchas principais reveladas nas amostras estão apresentados na Tabela 23.

Os eluentes clorofórmio, clorofórmio:acetona:ácido fórmico (75:16,5:8,5) e clorofórmio:acetato de etila (60:40) possuem pouca força eluente para as substâncias em análise, fornecendo poucas informações sobre os compostos fenólicos presentes nas amostras (Figura 13). Entretanto, houve boa resolução de algumas bandas de coloração violeta, cujas substâncias mais apolares não foram identificadas, quando as cromatoplasmas foram reveladas com vanilina. Tais bandas são semelhantes às bandas violetas mal resolvidas na condição cromatográfica utilizando acetato de etila:tolueno:ácido fórmico:água (80:10:5:5) apresentada na Figura 11 b.

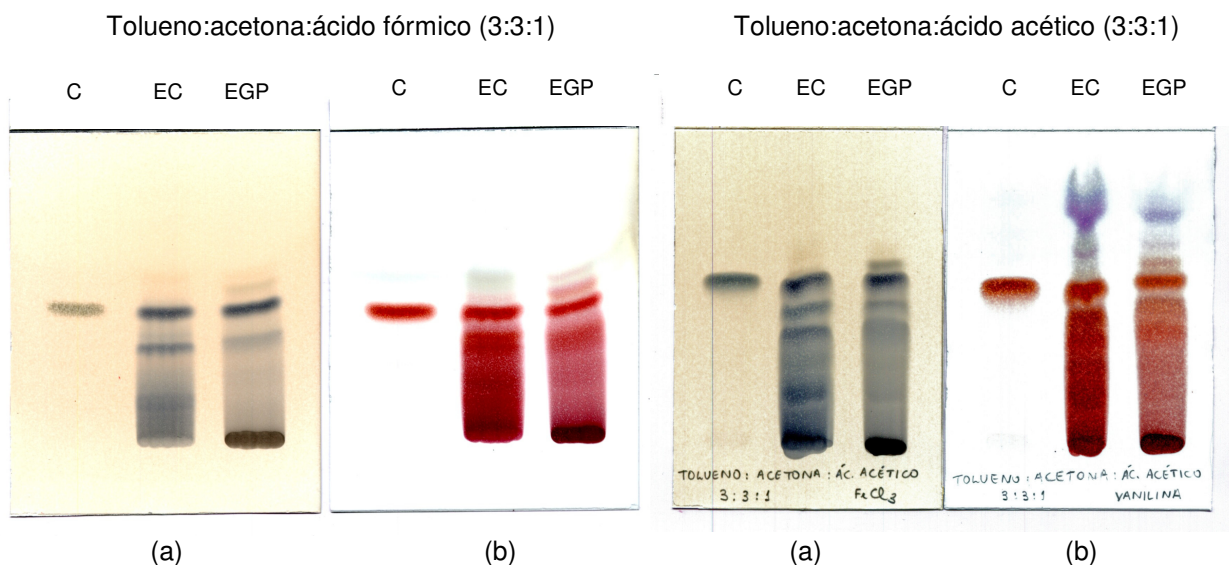


Figura 12 Perfis em CCD para catequina SQR (C), extrato cetônico (EC) e extrato glicólico purificado (EGP) em cromatofolha de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄. Eluentes: tolueno:acetona:ácido fórmico (3:3:1) e tolueno:acetona:ácido acético (3:3:1). Reveladores: (a) FeCl₃ e (b) vanilina.

Tabela 23 Valores de R_f para catequina SQR e amostras de extratos de barbatimão obtidos com diferentes reveladores e sistemas eluentes, sílica gel 60 F₂₅₄ em cromatofolhas de alumínio

| Sistema eluente | Reveladores / Valores de R _f | | | | | |
|---|---|-----------------|------------------|----------|------|------|
| | FeCl ₃ | | | Vanilina | | |
| | C ^a | EC ^b | EGP ^c | C | EC | EGP |
| Tolueno:acetona: ácido fórmico (3:3:1) | | | 0,49 | | | 0,48 |
| | 0,42 | 0,41 | 0,42 | 0,41 | 0,40 | 0,41 |
| | | 0,34 | | | 0,32 | |
| | | 0,30 | 0,31 | | 0,29 | |
| Tolueno:acetona: ácido acético (3:3:1) | | | 0,56 | | 0,74 | 0,74 |
| | 0,52 | 0,51 | 0,52 | 0,51 | 0,49 | 0,58 |
| | | 0,43 | 0,45 | | | 0,52 |
| | | 0,34 | | | | |

C: catequina padrão, EC: extrato cetônico, EGP: extrato glicólico purificado.

O sistema eluente clorofórmio:acetato de etila (60:40) é o ideal para análise dessas substâncias mais apolares, pois houve boa separação das bandas com valores de R_f intermediários na cromatoplaça. Talvez, uma combinação deste sistema eluente com o sistema farmacopeico possibilite uma separação adequada de todos os compostos presentes nas amostras. Ou ainda, a troca do tolueno (polaridade, P' = 2,4) do sistema

farmacopeico pelo clorofórmio (polaridade, $P' = 4,1$) pode aumentar a força do sistema eluente aliada e alterar a seletividade do mesmo.

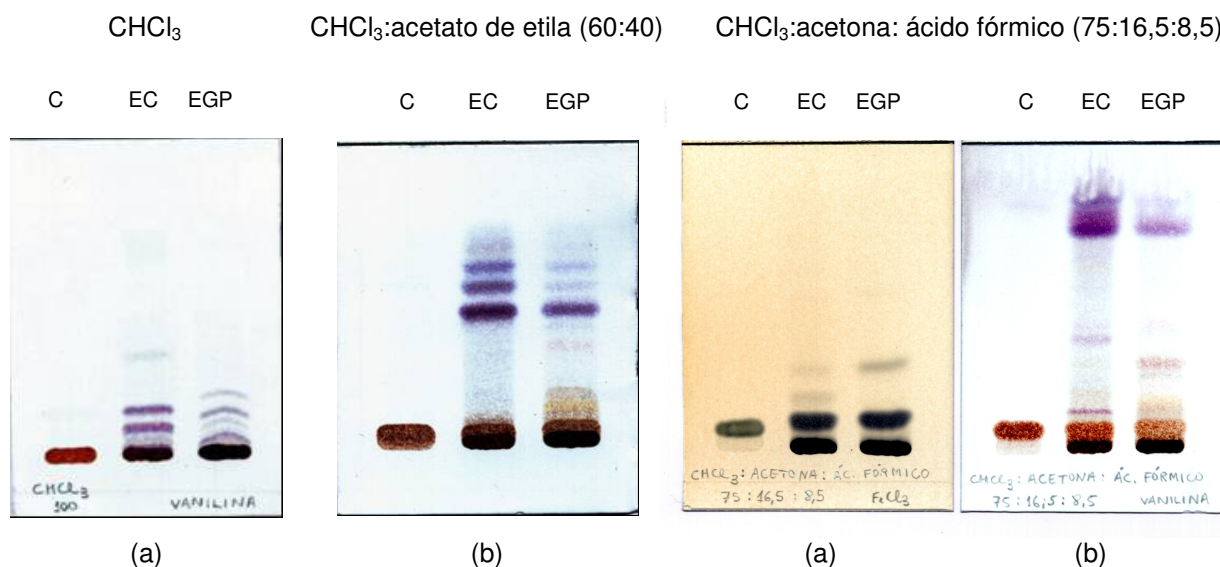


Figura 13 Perfis em CCD para catequina (C), extrato cetônico (EC) e extrato glicólico purificado (EGP) em cromatofolha de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄. Eluentes: CHCl₃; CHCl₃:acetato de etila (60:40) e CHCl₃ acetona: ácido fórmico (75:16,5:8,5). Reveladores: (a) FeCl₃ e (b) vanilina.

A Figura 14 demonstra que com os sistemas eluentes: acetona; acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água (100:11:11:26); metanol e tolueno:acetona:ácido fórmico (3:1:1) não houve separação adequada das amostras aplicadas. Com acetona e metanol puros, a catequina SQR elui com banda bem definida, porém nestes eluentes os extratos não apresentaram separação dos seus constituintes químicos característicos. Já com os eluentes acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água (100:11:11:26) e tolueno:acetona:ácido fórmico (3:1:1), metanol, tolueno:acetona:ácido fórmico (3:1:1) além de não haver separação dos constituintes as bandas formadas apresentaram-se sem definição indicando pouca seletividade dos solventes usados no teste cromatográfico.

Provavelmente as amostras não são solubilizadas nestes eluentes de forma adequada prejudicando-se as interações dos compostos com a fase estacionária de sílica e com a fase móvel.

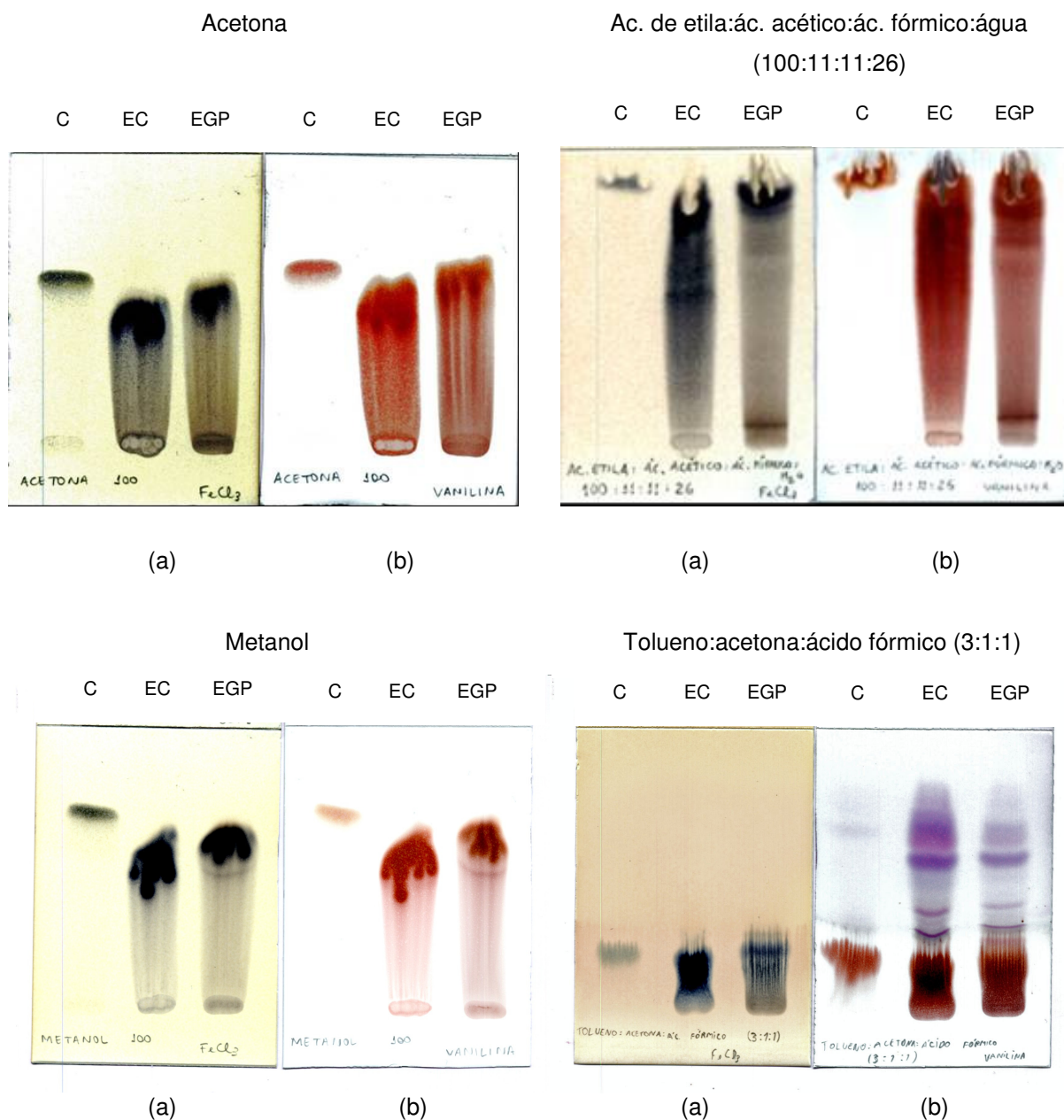


Figura 14 Perfis em CCD para catequina (C), extrato cetônico (EC) e extrato glicólico purificado (EGP) em cromatofolha de alumínio de sílica gel 60 F_{254} . Eluentes: acetona; acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água (100:11:11:26); metanol e tolueno:acetona:ácido fórmico (3:1:1). Reveladores: (a) $FeCl_3$ e (b) vanilina.

5.1.6 Material estranho

Não foi detectado nenhum material estranho no pó da droga vegetal analisado, o que atende a Farmacopéia Brasileira 4^a edição. Este resultado indica que a coleta, o armazenamento, a secagem e a moagem das cascas de barbatimão foram realizadas de

forma adequada, levando-se em conta que a droga vegetal está exposta ao meio ambiente e pode conter sujidades e/ou contaminantes.

5.1.7 Determinação de Água

O excesso de umidade em matérias-primas vegetais pode permitir a ação de enzimas e acarretar a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias. A determinação de água é, portanto, um item imprescindível no controle de qualidade em drogas vegetais.

A Tabela 24 apresenta os resultados de perda por dessecação, obtidos em estufa a seco (105 °C, 5 h) até peso constante.

Tabela 24 Valores de perda por dessecação da droga vegetal (105 °C, 5 h)

| Replicata | Origem | Perda (%) | |
|-----------|--------|-----------|---------------------|
| | | Ritópolis | Santa Cruz de Minas |
| 1 | | 10,51 | 10,34 |
| 2 | | 10,51 | 10,46 |
| 3 | | 10,46 | 10,36 |
| 4 | | 10,45 | 10,37 |
| 5 | | - | 10,43 |
| Média | | 10,48 | 10,39 |
| d.p. | | 0,03 | 0,05 |
| DPR (%) | | 0,30 | 0,52 |

De acordo com os resultados encontrados, conclui-se que a droga vegetal cumpre com o requisito de ensaio de pureza – Água, da monografia 176 do barbatimão, a qual preconiza um valor máximo de água (FARMACOPÉIA, 2002).

5.1.8 Cinzas totais

A determinação do teor de cinzas totais permite a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes como contaminantes.

Os valores determinados no ensaio de cinzas totais para a droga vegetal, obtidos em mufla, até peso constante das amostras estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 Valores de cinzas totais obtidos para a droga vegetal

| Replicata | Origem | Cinzas (%) | |
|-----------|--------|------------|---------------------|
| | | Ritópolis | Santa Cruz de Minas |
| 1 | | 1,12 | 1,13 |
| 2 | | 1,15 | 1,11 |
| 3 | | 1,22 | 1,14 |
| 4 | | 1,14 | 1,19 |
| 5 | | 1,27 | 1,06 |
| 6 | | - | 1,13 |
| Média | | 1,18 | 1,13 |
| d.p. | | 0,06 | 0,04 |
| DPR (%) | | 5,43 | 3,70 |

Todas as replicatas apresentaram resultados finais dentro do limite especificado, pela monografia 176 do barbatimão, que é de no máximo 2% (FARMACOPÉIA, 2002).

5.2 CONTROLE DE QUALIDADE DOS EXTRATOS DA DROGA VEGETAL

5.2.1 Avaliação dos caracteres organolépticos

Na avaliação das características organolépticas verificou-se que ambos os extratos glicólico e etanólico seco obtidos cumprem com os requisitos definidos na Farmacopéia Brasileira 4ª edição, monografia 148 para extrato fluido e monografia 150 para extrato seco, respectivamente. O primeiro é uma preparação líquida na qual uma parte do extrato, em volume, corresponde a uma parte, em massa, da droga seca, utilizada na sua preparação e o segundo é uma preparação sólida obtida por evaporação do solvente utilizado na sua preparação com rendimento de 44,82% (FARMACOPÉIA, 2001).

Tanto o extrato glicólico quanto o extrato etanólico seco apresentaram coloração castanho-avermelhada, odor característico e sabor adstringente, semelhantes aos observados para o pó das cascas da droga vegetal. As primeiras frações de extrato glicólico apresentaram cor, sabor e odor mais intensos que as demais, sendo que estas características foram reduzindo-se gradativamente.

Os extratos não apresentaram odor de material em decomposição. Este é um teste de qualidade simples e rápido para se verificar a pureza e a identidade da droga vegetal de origem.

5.2.2 Avaliação da solubilidade

A avaliação da solubilidade dos extratos é um dado auxiliar para o desenvolvimento de métodos de análise, tanto da matéria-prima quanto dos produtos acabados desenvolvidos com estes extratos. A avaliação da solubilidade foi realizada com os extratos brutos de barbatimão, cuja constituição química é complexa. Contudo, a maioria dos compostos isolados dos extratos de barbatimão são taninos condensados, ou seja, polímeros de flavan-3-ol (MELLO *et al.* 1993, 1996a, 1996b, 1997, 1999; SANTOS e colaboradores, 2002).

De acordo com The Merck Index 14^a edição (2006), a catequina, uma das substâncias presentes nos extratos de barbatimão é solúvel em água quente, álcool, ácido acético glacial e acetona; pouco solúvel em água fria e éter; e praticamente insolúvel em benzeno, clorofórmio e éter de petróleo. Já o ácido gálico, um tanino hidrolisável, também presente nas amostras é facilmente solúvel em água fervente, álcool e acetona; solúvel em glicerol; ligeiramente solúvel em água; pouco solúvel em éter; e praticamente insolúvel em benzeno, clorofórmio e éter de petróleo.

Os resultados encontrados para solubilidade dos extratos, de acordo com os termos descritivos da Farmacopéia Brasileira 4^a edição, estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 Solubilidade do extrato glicólico e do extrato etanólico seco de barbatimão em diferentes solventes de acordo com termos descritivos da Farmacopéia Brasileira 4^a edição

| Solvente | Solubilidade | |
|-----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | Extrato glicólico | Extrato etanólico seco |
| Água | Muito solúvel | Praticamente insolúvel ou insolúvel |
| Metanol | Ligeiramente solúvel | Solúvel |
| Etanol absoluto | Pouco solúvel | Ligeiramente solúvel |
| Acetonitrila | Praticamente insolúvel ou insolúvel | Praticamente insolúvel ou insolúvel |
| HCl 0,1 mol/L | Praticamente insolúvel ou insolúvel | Muito solúvel |
| NaOH 0,1 mol/L | Pouco solúvel | Pouco solúvel |

Os extratos apresentaram certa solubilidade em hidróxido de sódio 0,1 mol/L, provavelmente, devido à desprotonação das hidroxilas fenólicas dos taninos condensados. O mesmo raciocínio pode ser feito para a solubilidade em ácido clorídrico 0,1 mol/L, as hidroxilas fenólicas são protonadas aumentando-se a solubilidade do extrato seco. A maior solubilidade em ácido pode ser explicada pelo pK_a do fenol, de aproximadamente 9. A solução alcalina não possui valor de pH suficiente para desprotonar as hidroxilas fenólicas na mesma extensão do que a solução ácida é capaz. O extrato glicólico pode conter

compostos praticamente insolúveis no meio ácido o que explicaria a baixa solubilidade neste meio.

Os resultados para o extrato etanólico seco são semelhantes à catequina e ao ácido gálico com relação a água e aos alcoóis, levando-se em conta que a catequina é o monômero presente nas estruturas de tanino condensado.

5.2.3 Avaliação do pH

Foram realizadas três medidas de pH das dispersões a 10% em água e em solução hidroalcoólica contendo 10% de metanol, das amostras de extratos. Os resultados encontram-se na Tabela 27.

Tabela 27 Determinação de pH (triplicata) da dispersão a 10% em água e em solução hidroalcoólica dos extratos de barbatimão

| Amostra Replicata | pH da dispersão a 10% | | | |
|----------------------|-----------------------|----------------|------------------------|----------------|
| | Extrato glicólico | | Extrato etanólico seco | |
| | Aquosa | Hidroalcoólica | Aquosa | Hidroalcoólica |
| 1 | 5,86 | 5,05 | 3,96 | 4,11 |
| 2 | 5,83 | 5,01 | 4,01 | 4,05 |
| 3 | 5,86 | 4,97 | 4,01 | 4,04 |
| Média | 5,85 | 5,01 | 3,99 | 4,07 |
| d.p. | 0,02 | 0,04 | 0,03 | 0,04 |
| DPR (%) | 0,30 | 0,80 | 0,72 | 0,93 |

Os valores de pH foram medidos para as dispersões a 10% dos extratos a fim de proporcionar uma diluição e melhor avaliação da concentração hidrogeniônica (pH aparente). Por isso, o pH das dispersões pode apresentar-se ligeiramente maior que o de extratos medidos diretamente. O pH encontrado para extratos glicólicos de barbatimão segundo Ardisson e colaboradores (2001) foi 4,94.

A presença de hidroxilas fenólicas nos taninos condensados nos extratos de barbatimão explica os valores de pH situados na faixa ácida, mais baixa, para o extrato etanólico seco.

5.2.4 Resíduo seco

De acordo com a monografia para extratos fluidos da Farmacopéia Brasileira 4ª edição, os extratos fluidos podem ser padronizados, em termos de concentração do solvente, teor dos constituintes ou do resíduo seco. Para os extratos secos, a sua monografia especifica um teor de no mínimo 95% de resíduo seco, calculado como porcentagem de massa (FARMACOPÉIA, 2002). Portanto, a determinação do teste de resíduo seco é um parâmetro importante de qualidade por expressar a quantidade de material não volátil extraído, incluindo os marcadores químicos e/ou grupos de compostos responsáveis pela ação farmacológica do extrato.

Para cada amostra de extrato, o resíduo seco foi realizado em triplicata, em estufa a seco (105 °C, 3 h).

Na Tabela 28 são apresentados os valores de teor de resíduo seco obtidos para cada amostra.

Tabela 28 Teor de resíduo seco (105 °C, 3 h) para os extratos de barbatimão

| Replicata | Amostra | Teor de resíduo seco (% p/p) | |
|-----------|---------|------------------------------|------------------------|
| | | Extrato glicólico | Extrato etanólico seco |
| 1 | | 36,49 | 86,87 |
| 2 | | 36,65 | 86,78 |
| 3 | | 36,59 | 86,78 |
| | Média | 36,58 | 86,81 |
| | d.p. | 0,08 | 0,05 |
| | DPR (%) | 0,23 | 0,06 |

Segundo Ardisson e colaboradores (2001), a primeira fração dos extratos glicólicos apresentou teor de resíduo seco de 21,10% p/p, valor menor do que o encontrado neste estudo (36,58% p/p).

O extrato etanólico seco apresentou teor de resíduo seco de 86,81% p/p, menor que 95%, teor mínimo preconizado pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição. Tal resultado indica que apenas a eliminação do solvente por evaporador rotatório não é ideal para a obtenção de um extrato mais seco. Provavelmente, outros processos de secagem do extrato seco, tais como o armazenamento em dessecador a vácuo, com pentóxido de fósforo ou secagem em estufa, poderão fornecer extratos com maior teor de resíduo seco. Estudos adicionais são necessários para validação de um processo de secagem industrial do extrato.

5.2.5 Determinação da densidade relativa

Foram realizadas três determinações de densidade relativa da primeira fração dos extratos glicólicos. Os resultados são apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 Valores de densidade relativa para amostras de extrato glicólico de barbatimão

| Replicata | Densidade relativa (g/mL) |
|-----------|---------------------------|
| 1 | 1,0902 |
| 2 | 1,1229 |
| 3 | 1,1122 |
| Média | 1,1084 |
| d.p. | 0,0167 |
| DPR (%) | 1,50 |

A densidade de massa dos extratos glicólicos calculada a partir da densidade relativa é de 1,1063 g/mL, menor do que 1,46 g/ml, determinado por Ardisson e colaboradores (2001).

5.2.6 Reações de identificação

As amostras de extrato glicólico e de extrato etanólico seco de barbatimão apresentaram teste positivo para todas as reações características aos taninos condensados e hidrolisáveis presentes na planta.

Para o desenvolvimento dos testes de identificação por reações químicas, procedeu-se a um teste com volumes de extrato glicólico com 0,5; 1 e 2 mL para avaliar a tomada de amostra mais adequada. Após a análise dos resultados, o volume 1 mL de amostra mostrou-se ser o mais adequado e prático, pois apresentava reações nítidas tendo em vista que o teor de taninos presentes nestes extratos conduziu a reações químicas de identificação intensas.

Teste B – Reação com gelatina - Desenvolveu-se reação positiva com formação de precipitado nítido. Neste teste de identificação também ocorre formação de complexos reversíveis e irreversíveis entre a gelatina e os taninos, como mostrado no item 5.1.4 e na Figura 8.

Teste C – Reação com cloreto férrico - Desenvolveu-se reação positiva por coloração cinza escura. Da mesma forma que apresentado no item 5.1.4 e na Figura 9, ocorre

complexação do Fe^{+3} com as hidroxilas fenólicas dos taninos condensados e hidrolisáveis presentes nos extratos glicólicos de barbatimão.

Teste D – Reação com vanilina - Desenvolveu-se reação positiva por coloração vermelha. Houve formação de complexo colorido entre a vanilina e os taninos condensados, como exemplificado no item 5.1.4 e na Figura 10.

5.2.7 Cromatografia em camada delgada

5.2.7.1 Extrato glicólico

Os resultados são apresentados no item 5.1.5, juntamente com os resultados do Teste A de identificação para a droga vegetal.

5.2.7.2 Extrato etanólico seco

Foram obtidos perfis por CCD em sílica gel, empregando-se a condição cromatográfica farmacopeica, utilizando-se cloreto férrico 1% (p/V) em metanol como revelador. Foram aplicados os padrões, a amostra de extrato etanólico seco e um ponto misto (amostra fortificada) nas placas, o que pode ser visualizado na Figura 15. O ponto misto foi obtido com a aplicação, no mesmo ponto, dos padrões e da amostra.

Na Tabela 30 são apresentados os valores do fator de retenção (R_f) calculados para os sete padrões e para as principais manchas reveladas na amostra de extrato etanólico seco e no extrato fortificado (ponto misto).

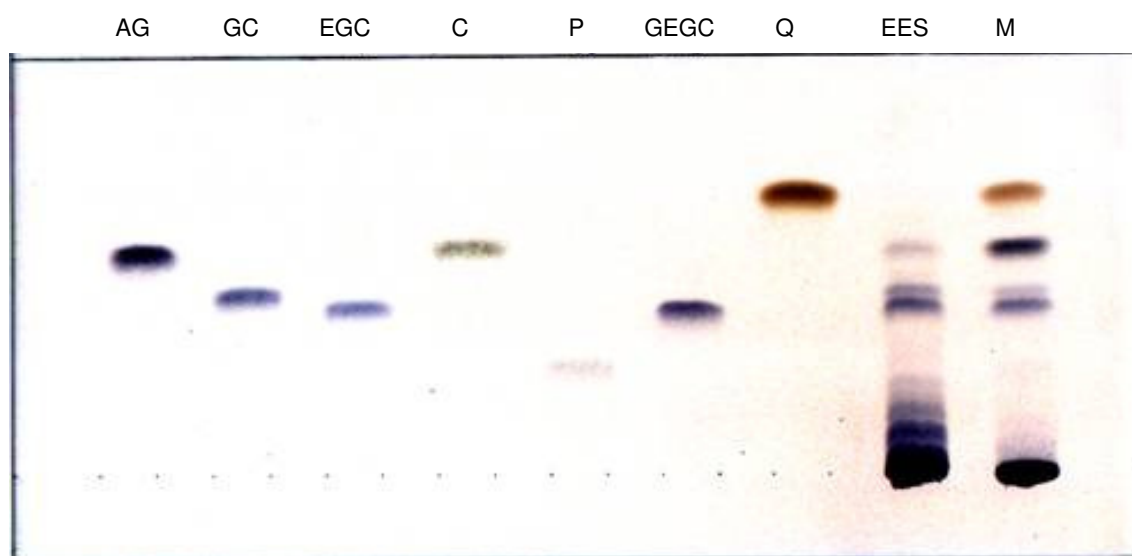


Figura 15 Perfis em CCD para ácido gálico (AG), galocatequina (G), epigalocatequina (EGC), catequina (C), proantocianidina B2 (P), galato de epigalocatequina (GEGC), quercetina (Q), extrato etanólico seco (EES) e ponto misto (M) em cromatofolha de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄. Eluente: acetato de etila:tolueno:ácido fórmico:água (80:10:5:5). Revelador: FeCl₃ 1% (p/V).

Com o sistema eluente acetato de etila:tolueno:ácido fórmico:água (80:10:5:5) foi possível a separação de todos os padrões indicando que este método cromatográfico apresenta seletividade para os marcadores apresentados. Todavia, os pares de padrões catequina e ácido gálico, epigalocatequina e galato de epigalocatequina apresentaram valores de R_f muito próximos o que dificulta a visualização das bandas. Portanto, o sistema eluente farmacopeico necessita de ajustes na força eluente e/ou seletividade com o intuito de se melhorar a resolução destes pares críticos.

O sistema eluente butanol:ácido acético:água (50:10:40) apresentou força eluente maior do que o eluente farmacopeico (maiores valores de R_f), mas não apresentou resolução adequada para a maioria dos compostos testados. Além disso, as manchas apresentaram-se irregulares dificultando a análise (Figura 16 e Tabela 30).

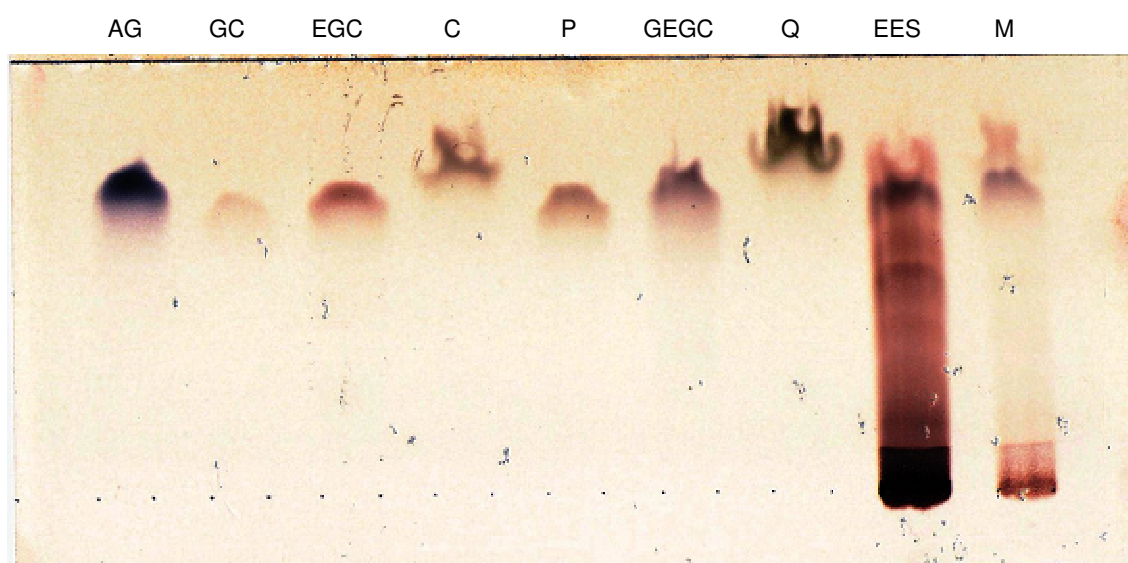


Figura 16 Perfis em CCD para ácido gálico (AG), galocatequina (GC), epigalocatequina (EGC), catequina (C), proantocianidina B2 (P), galato de epigalocatequina (GEGC), quercetina (Q), extrato etanólico seco (EES) e ponto misto (M) em cromatofolha de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄. Eluente: butanol, ácido acético e água (50:10:40). Revelador: FeCl₃ 1% (p/V).

Tabela 30 Valores de R_f para padrões e amostra de extrato etanólico seco de barbatimão obtidos em cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄. Revelador: FeCl₃ 1% (p/V) em metanol

| Sistema eluente | Valores de R _f | | | | | | | | |
|---|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | AG | GC | EGC | C | P | GEGC | Q | EES | M |
| acetato de etila:tolueno:ácido fórmico:água (80:10:5:5) | | | | 0,54 | | | 0,66 | | 0,66 |
| | 0,52 | | | | | | | 0,54 | 0,54 |
| | | 0,43 | | | | | | 0,43 | 0,43 |
| | | | 0,40 | | | | | 0,40 | 0,40 |
| | | | | | 0,25 | 0,39 | | | |
| butanol:ácido acético:água (50:10:40) | | | | 0,77 | | | 0,81 | | 0,81 |
| | 0,71 | | | | | 0,71 | | 0,77 | 0,71 |
| | | | 0,68 | | 0,68 | | | 0,68 | 0,68 |
| | | 0,66 | | | | | | | |

AG: ácido gálico, GC: galocatequina, EGC: epigalocatequina, C: catequina, P: proantocianidina B2, GEGC: galato de epigalocatequina, Q: quercetina, EES: extrato etanólico seco, M: ponto misto.

5.3 APLICAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS FARMACOPEICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS TOTAIS

Muitos métodos analíticos têm sido propostos para quantificar taninos em drogas vegetais. Os métodos comumente usados incluem despolimerização oxidativa das proantocianidinas, reações do anel A com um aldeído aromático e reações de oxi-redução.

Os métodos colorimétricos mais usados para a determinação de fenólicos são o doseamento com azul da Prússia, o método de Folin-Denis e o método de Folin-Ciocalteu, sendo este último um método modificado a partir do Folin-Denis. O cromóforo produzido é um complexo azul fosfotúngstico-fosfomolibdico de estrutura indefinida e cuja química desta reação também não é bem entendida. O método de Folin-Ciocalteu foi desenvolvido para se resolver o problema de formação de precipitado nas medidas espectrofotométricas com o reagente de Folin-Denis, o qual interfere com tais medições. Além disto, o método é menos propenso a interferências por não-fenólicos do que o método original (SINGLETON *et al.* 1999; SCHOFIELD *et al.*, 2001).

A catequina possui cinco hidroxilas livres das quais somente três são grupos reagentes (SINGLETON *et al.*, 1999). Os compostos estruturalmente relacionados a este padrão, selecionados como marcadores, quando reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu ou de Folin-Denis geram uma coloração semelhante à soma das cores devidas à reação do anel A de floroglucinol adicionado de duas possibilidades de reação no anel B. Portanto, uma hidroxila reage no anel A e duas reagem no anel B, o que pode ser visto na Figura 17. Propõe-se que uma molécula de Na_2CO_3 desprotona uma hidroxila por vez formando NaHCO_3 e que apenas Na_2MoO_4 participa da reação de oxi-redução devido a maior facilidade do molibdênio em sofrer redução.

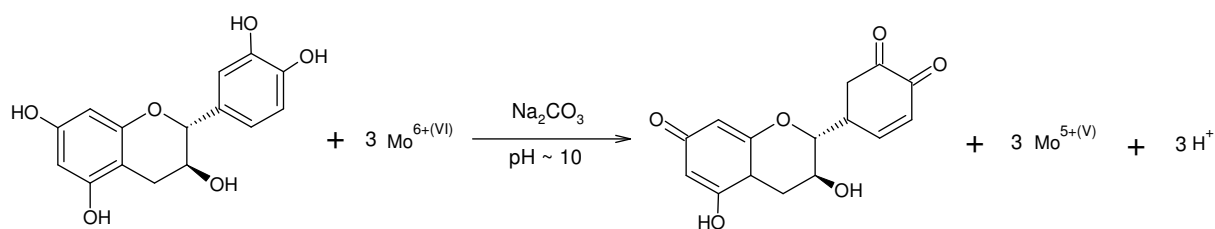


Figura 17 Proposta de reação química de oxidação da catequina com a redução do molibdênio do reagente fosfomolibdotúngstico gerando espécies azuis, tais como $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$.

As substâncias fenólicas tais como a catequina, o ácido gálico e a cianidina, podem ser padrões adequados para os métodos de análise de taninos. O ácido tânico é provavelmente o melhor padrão tânico comercialmente disponível, mas idealmente, o material comercial deve ser purificado (HAGERMAN *et al.*, 1989). Entretanto, o padrão especificado nas análises farmacopeicas é o pirogalol, substância também fenólica cuja molécula é mais simples. Como as cascas de *S. adstringens* são uma fonte rica de proantocianidinas com unidades de pirogalol com atividade biológica (MELLO *et al.*, 1996a), este marcador pode ser utilizado como um padrão adequado ao doseamento por espectrofotometria.

Os métodos espectrofotométricos no visível por se tratarem de ser métodos oficiais somente as figuras de mérito seletividade, linearidade e precisão foram avaliados, utilizando-se o extrato etanólico seco de barbatimão como amostra.

5.3.1 Método espectrofotométrico na região visível (λ 715 nm) utilizando reagente Folin-Denis para quantificação de taninos totais em extratos de barbatimão, de acordo com Farmacopéia Brasileira 4ª edição

5.3.1.1 Seletividade

Os espectros de pirogalol SQR antes e após a reação com o reagente de Folin-Denis são apresentados na Figura 18 (a). Pode-se observar a formação de um máximo de absorção em λ 715 nm indicando a formação de complexo entre o padrão e os metais molibdênio e tungstênio.

A formação deste complexo com as amostras de extrato etanólico seco também pode ser evidenciada com a formação de máximo de absorção no mesmo comprimento de onda (Figura 18, b). Entretanto, a seletividade deste método é relativa, pois não distingue os taninos entre si e entre os polifenóis que podem estar presentes nas amostras. Uma forma de contornar essa falta de especificidade é utilizar outros métodos analíticos que demonstrem a ausência de interferentes. Por exemplo, o pó-de-pele ou outros substratos protéicos podem ser acrescentados ao meio reacional para adsorção dos taninos. Assim o teor de taninos é calculado como a diferença entre o teor de polifenóis totais e teor da fração polifenólica não-adsorvida (BRUNETON, 1999; SANTOS *et al.*, 2002).

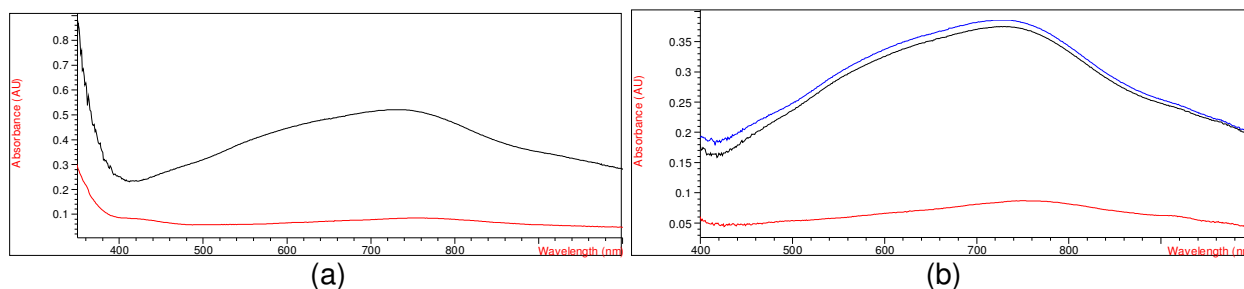


Figura 18 Sobreposição de espectros: (a) pirogalol antes (2,5 µg/mL, vermelho) e após reação com reagente Folin-Denis (3,5 µg/mL, preto); (b) extrato etanólico seco 8 µg/mL (preto), extrato etanólico seco após agitação com pó-de-pele (40 µg/mL, vermelho) e pirogalol 2,5 µg/mL (azul), todos após reação com reagente Folin-Denis.

5.3.1.2 Linearidade

Foi construída uma curva de calibração para o pirogalol, apenas em um dia, após reação com o reagente de Folin-Denis, a partir de cinco concentrações diferentes, cada uma em triplicata. A curva obtida demonstrou relação linear entre as concentrações das soluções (µg/mL) e as leituras de absorvância, na faixa de 1,5 a 3,5 µg/mL de pirogalol, o que corresponde de 60 a 140% da concentração de trabalho, englobando a concentração de 2,88 µg/mL de taninos totais em termos de pirogalol. Esta concentração foi obtida considerando-se que a amostra analisada possui em torno de 25 % de taninos totais, compatível com teores obtidos em trabalhos anteriores, entre 25 a 30 % (PANIZZA *et al.* 1988; ARDISSON *et al.*, 2002). Os valores de concentração, suas respectivas leituras de absorvâncias para avaliação da linearidade e valores de pH são apresentados na Tabela 31. Segundo Singleton e colaboradores (1999), a importância do íon fenolato é demonstrada pelo fato de que a sua oxidação pode ser completada rapidamente perto ou acima do valor de pK_a do fenol, usualmente, em cerca de pH 10 ($pK_a = 9,9$). Portanto, é necessária a utilização de solução de carbonato de sódio como alcalinizante para propiciar a reação de oxi-redução entre o reagente Folin-Denis, que se reduz provocando a oxidação dos grupos fenóis nos taninos. O pH das soluções no método de Folin-Ciocalteu provavelmente são mais elevados pois a concentração final de carbonato de sódio no ponto central (13,9%) é maior do que nas soluções com Folin-Denis no mesmo ponto (9,1%).

O reagente de Folin-Denis foi adicionado ao meio reacional com quantidades proporcionais ao ponto central da curva (2,5 µg/mL de pirogalol) para garantir o excesso deste reagente e não haver interferências durante as análises.

A curva foi construída plotando-se a concentração de pirogalol na solução *versus* a leitura de absorvância. Os dados foram submetidos à análise de regressão linear representados na Figura 19.

A partir dos dados obtidos para linearidade, foi realizada análise estatística da regressão da curva analítica de pirogalol.

Tabela 31 Resultados obtidos para a construção da curva de calibração para pirogalol após reação com reagente de Folin-Denis

| Solução | Replicata | Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | Absorvância | | | pH |
|---------|-----------|--------------------------------------|-------------|----------------------|---------|-------|
| | | | Abs | Média (d.p.) | DPR (%) | |
| 1 | 1 | 1,5234 | 0,22853 | 0,23082 (0,00215) | 0,93 | 10,83 |
| | 2 | 1,5291 | 0,23280 | | | 10,84 |
| | 3 | 1,5207 | 0,23114 | | | 10,84 |
| 2 | 1 | 2,0312 | 0,30510 | 0,30722 (0,00247) | 0,80 | 10,71 |
| | 2 | 2,0388 | 0,30664 | | | 10,72 |
| | 3 | 2,0276 | 0,30993 | | | 10,72 |
| 3 | 1 | 2,5390 | 0,38462 | 0,38544 (0,00450) | 1,17 | 10,62 |
| | 2 | 2,5485 | 0,39030 | | | 10,62 |
| | 3 | 2,5345 | 0,38140 | | | 10,62 |
| 4 | 1 | 3,0468 | 0,45070 | 0,45230 (0,00157) | 0,35 | 10,53 |
| | 2 | 3,0582 | 0,45236 | | | 10,53 |
| | 3 | 3,0414 | 0,45384 | | | 10,54 |
| 5 | 1 | 3,5546 | 0,51801 | 0,53180 (0,01291) | 2,43 | 10,44 |
| | 2 | 3,5679 | 0,53377 | | | 10,46 |
| | 3 | 3,5483 | 0,54361 | | | 10,46 |

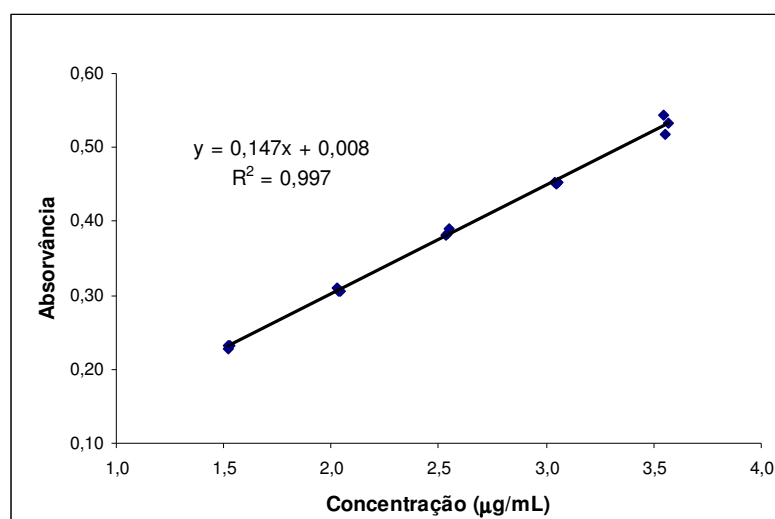


Figura 19 Curva analítica obtida pelo método de Folin-Denis para o pirogalol a λ 715 nm.

Segundo Mole e colaboradores (1987), o método Folin-Denis apresenta linearidade numa faixa muito restrita de absorvâncias variando de 0,2 a 0,6. Como pode ser observada na Tabela 31 e na Figura 19, a curva analítica apresenta linearidade na faixa de 0,2 a 0,5 de absorvância, sendo esta faixa próxima aos dados da literatura apresentados para Folin-Denis.

Os resíduos têm distribuição aleatória como pode ser visto na Figura 20. A regressão é significativa ($p < 0,001$). Além disto, o coeficiente de correlação (r) foi maior que 0,99 (0,9985) e a interseção com o eixo das abscissas não foi estatisticamente diferente de zero, não sendo necessário calcular a contribuição do intercepto para a resposta a 100% da concentração de trabalho. O desvio padrão relativo da curva de 1,64% demonstra precisão adequada. O erro padrão da inclinação foi de 0,0023 e o erro padrão do intercepto de 0,0059. Os resultados obtidos indicam uma linearidade satisfatória do método de Folin-Denis.

A possibilidade de esgotamento do reagente de oxi-redução em análises de taninos foi relatada anteriormente por Verza e colaboradores (2007), a qual constatou a perda de linearidade nas curvas analíticas do pirogalol frente a um volume fixo de 1,0 mL de reagente de Folin-Denis. Segundo a autora, adição de 2,0 mL de reagente colorimétrico restabelece a linearidade. Tal fato não foi verificado na curva analítica em nosso trabalho, uma vez que o reagente colorimétrico foi adicionado de forma proporcional às quantidades de analito garantindo-se o excesso para reação. O esgotamento do reagente de Folin-Denis não ocorrerá desde que a proporcionalidade deste reagente seja mantida frente aos analitos ou que o volume seja aumentado para 2,0 mL conforme autora citada anteriormente.

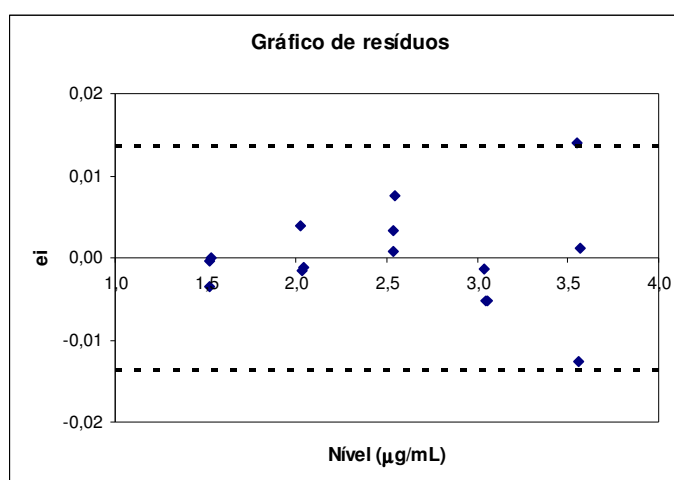


Figura 20 Distribuição dos resíduos da curva analítica para a determinação de pirogalol por Folin-Denis.

5.3.1.3 Precisão Intra-corrída e Inter-corrída

As concentrações das amostras de extrato etanólico seco utilizadas para determinação do teor de polifenóis totais e de polifenóis não adsorvidos estão apresentadas na Tabela 32.

Os valores obtidos para os teores de taninos totais, conforme Farmacopéia Brasileira 4ª edição, para avaliar a precisão intra-corrída do método são apresentados na Tabela 33.

Tabela 32 Concentrações de amostras de extrato etanólico seco utilizadas para avaliação da precisão intra-corrída do método Folin-Denis

| Amostra | Massa de EES ^a (mg) | Conc. EES ₁ (µg/mL) ^b | Conc. EES ₂ (µg/mL) ^c |
|---------|--------------------------------|---|---|
| 1 | 100,15 | 8,0120 | 80,120 |
| 2 | 99,99 | 7,9992 | 79,992 |
| 3 | 100,16 | 8,0128 | 80,128 |
| 4 | 100,27 | 8,0216 | 80,216 |
| 5 | 100,10 | 8,0080 | 80,080 |
| 6 | 100,07 | 8,0056 | 80,056 |

a: extrato etanólico seco, b: concentração de amostra utilizada para determinação de polifenóis totais, c: concentração de amostra utilizada para determinação de polifenóis não adsorvidos.

Tabela 33 Concentrações de polifenóis totais (PT) e de polifenóis não adsorvidos (PNA) obtidos da curva analítica de Folin-Denis, respectivos teores e teor de taninos totais (TT) para precisão intra-corrída

| Amostra | A _{PT} ^a | A _{PNA} ^b | Conc. PT (µg/mL) | Conc. PNA (µg/mL) | Teor PT (%) | Teor PNA (%) | TT (%) |
|---------|------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------------|-------------|--------------|--------|
| 1 | 0,37373 | 0,063767 | 2,48796 | 0,37937 | 31,05 | 0,47 | 30,58 |
| 2 | 0,38126 | 0,083208 | 2,53918 | 0,51162 | 31,74 | 0,64 | 31,10 |
| 3 | 0,36716 | 0,072299 | 2,44327 | 0,43741 | 30,49 | 0,55 | 29,95 |
| 4 | 0,37390 | 0,082182 | 2,48912 | 0,50464 | 31,03 | 0,63 | 30,40 |
| 5 | 0,37364 | 0,072773 | 2,48735 | 0,44063 | 31,06 | 0,55 | 30,51 |
| 6 | 0,37966 | 0,068647 | 2,52830 | 0,41256 | 31,58 | 0,52 | 31,07 |
| | | | | Média | 31,16 | 0,56 | 30,60 |
| | | | | d.p. | 0,45 | 0,06 | 0,44 |
| | | | | DPR (%) | 1,44 | 11,56 | 1,42 |

a: absorvância de polifenóis totais, b: absorvância de polifenóis não adsorvidos.

O valor de desvio padrão relativo de 1,42% está abaixo de 5,0% conforme RE nº 899/2003 da ANVISA, indicando que o método da Farmacopéia Brasileira 4ª edição apresenta precisão intra-corrída adequada.

A precisão inter-corrída foi avaliada por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho, em dois dias diferentes, somente com o mesmo analista, por se tratar de um método farmacopeico previamente validado.

As concentrações das amostras de extrato etanólico seco utilizadas para determinação do teor de polifenóis totais e de polifenóis não adsorvidos, obtidas no dia 1 e dia 2, estão apresentadas na Tabela 34.

A partir dos valores de absorvância calculou-se o teor de taninos totais nas amostras de extrato etanólico seco (n = 12) e o desvio padrão relativo. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 35.

Tabela 34 Concentrações de amostras de extrato etanólico seco utilizadas para avaliação da precisão inter-corrída do método Folin-Denis

| Amostra | Massa de EES ^a (mg) | Conc. EES ₁ (µg/mL) ^b | Conc. EES ₂ (µg/mL) ^c |
|---------|--------------------------------|---|---|
| Dia 1 | 1 | 100,15 | 8,0120 |
| | 2 | 99,99 | 7,9992 |
| | 3 | 100,16 | 8,0128 |
| | 4 | 100,27 | 8,0216 |
| | 5 | 100,10 | 8,0080 |
| | 6 | 100,07 | 8,0056 |
| Dia 2 | 7 | 100,60 | 8,0480 |
| | 8 | 100,41 | 8,0328 |
| | 9 | 100,95 | 8,0760 |
| | 10 | 100,43 | 8,0344 |
| | 11 | 100,12 | 8,0096 |
| | 12 | 100,77 | 8,0616 |

a: extrato etanólico seco, b: concentração de amostra utilizada para determinação de polifenóis totais, c: concentração de amostra utilizada para determinação de polifenóis não adsorvidos.

Tabela 35 Concentrações de polifenóis totais (PT) e de polifenóis não adsorvidos (PNA) obtidos da curva analítica de Folin-Denis, respectivos teores e teor de taninos totais (TT) para precisão inter-corrída

| Amostra | A _{PT} ^a | A _{PNA} ^b | Conc. PT (µg/mL) | Conc. PNA (µg/mL) | Teor PT (%) | Teor PNA (%) | TT (%) | |
|----------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------|----------------|-----------------|--------|-------|
| Dia 1 | 1 | 0,37373 | 0,063767 | 2,48796 | 0,37937 | 31,05 | 0,47 | 30,58 |
| | 2 | 0,38126 | 0,083208 | 2,53918 | 0,51162 | 31,74 | 0,64 | 31,10 |
| | 3 | 0,36716 | 0,072299 | 2,44327 | 0,43741 | 30,49 | 0,55 | 29,95 |
| | 4 | 0,37390 | 0,082182 | 2,48912 | 0,50464 | 31,03 | 0,63 | 30,40 |
| | 5 | 0,37364 | 0,072773 | 2,48735 | 0,44063 | 31,06 | 0,55 | 30,51 |
| | 6 | 0,37966 | 0,068647 | 2,52830 | 0,41256 | 31,58 | 0,52 | 31,07 |
| Dia 2 | 7 | 0,36848 | 0,22239 | 2,45224 | 1,45842 | 30,47 | 1,81 | 28,66 |
| | 8 | 0,37787 | 0,22125 | 2,51612 | 1,45068 | 31,32 | 1,81 | 29,52 |
| | 9 | 0,37133 | 0,22146 | 2,47163 | 1,45208 | 30,60 | 1,80 | 28,81 |
| | 10 | 0,37282 | 0,21822 | 2,48177 | 1,43008 | 30,89 | 1,78 | 29,11 |
| | 11 | 0,38768 | 0,22816 | 2,58286 | 1,49765 | 32,25 | 1,87 | 30,38 |
| | 12 | 0,37032 | 0,20731 | 2,46476 | 1,35586 | 30,57 | 1,68 | 28,89 |
| Média | | | | | 31,09 | 1,18 | 29,91 | |
| d.p. | | | | | 0,55 | 0,65 | 0,89 | |
| DPR (%) | | | | | 1,78 | 55,01 | 2,96 | |

a: absorvância de polifenóis totais, b: absorvância de polifenóis não adsorvidos.

O valor de desvio padrão relativo encontrado de 2,96, abaixo de 5,0%, indica que o método, conforme Farmacopéia Brasileira 4ª edição, apresenta precisão inter-corrída adequada (BRASIL, 2003). Os valores de absorvância para polifenóis não adsorvidos no dia 2 são maiores do que os encontrados no dia 1, devido à utilização de lote diferente de pó-de-pele. Tanto os teores de polifenóis não adsorvidos quanto de taninos totais obtidos no dia 1 são estatisticamente diferentes pelo Teste de ANOVA ($\alpha = 0,05$) daqueles obtidos no dia 2, cujos valores de p são $1,35 \times 10^{-11}$ e 0,0014, respectivamente. Entretanto, o valor de DPR para o teor de taninos totais está de acordo com o preconizado na legislação brasileira.

5.3.2 Método espectrofotométrico na região visível (λ 760 nm) utilizando reagente Folin-Ciocalteu para quantificação de taninos totais em extratos de barbatimão, de acordo com Farmacopéia Européia 6ª edição

5.3.2.1 Seletividade

Os espectros de pirogalol antes e após a reação com o reagente de Folin-Ciocalteu são apresentados na Figura 21 (a). Pode-se observar a formação de um máximo de

absorção em 760 nm indicando a formação de complexo entre o padrão e os metais molibdênio e tungstênio.

A formação deste complexo, com as amostras de extrato etanólico seco, também pode ser evidenciada com a formação de máximo de absorção no mesmo comprimento de onda. Este método também possui seletividade relativa para taninos sendo necessária a adição de pó-de-pele para retirada da fração tânica (Figura 21, b).

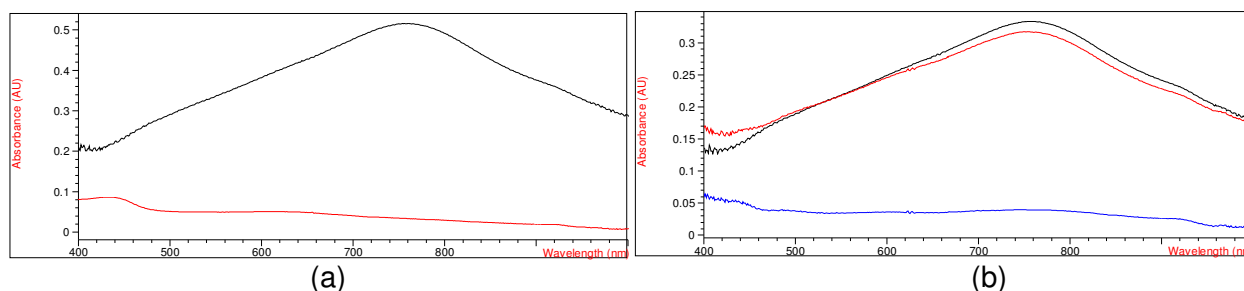


Figura 21 Sobreposição de espectros: (a) pirogalol antes (2,5 µg/mL, vermelho) e após reação com reagente Folin-Ciocalteau (3,0 µg/mL, preto); (b) extrato etanólico seco 6,4 µg/mL (vermelho), extrato etanólico seco após agitação com pó-de-pele (32 µg/mL, azul) e pirogalol 2,0 µg/mL (preto), todos após reação com reagente Folin-Ciocalteau.

5.3.2.2 Linearidade

Foi construída uma curva de calibração para o pirogalol, apenas em um dia, após reação com o reagente de Folin-Ciocalteau, a partir de cinco concentrações diferentes, cada uma em triplicata. A curva obtida demonstrou relação linear entre as concentrações das soluções (µg/mL) e as leituras de absorvância, na faixa de 1,0 a 3,0 µg/mL de pirogalol, o que corresponde de 50 a 150% da concentração de trabalho. Os valores de concentração e suas respectivas leituras de absorvâncias para avaliação da linearidade são apresentados na Tabela 36.

O reagente de Folin-Ciocalteau também foi adicionado ao meio reacional com quantidades proporcionais ao ponto central da curva (2,0 µg/mL de pirogalol) para se evitar o esgotamento deste reagente com o aumento da concentração do analito.

A curva foi construída plotando-se a concentração de pirogalol na solução *versus* a leitura de absorvância. Os dados foram submetidos à análise de regressão linear e estão representados na Figura 22.

A partir dos dados obtidos para linearidade, foi realizada análise estatística da regressão da curva analítica de pirogalol.

Tabela 36 Resultados obtidos para a construção da curva de calibração para pirogalol após reação com reagente de Folin-Ciocalteu

| Solução | Replicata | Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | Absorvância | | |
|---------|-----------|-----------------------------------|-------------|----------------------|---------|
| | | | Abs | Média (d.p.) | DPR (%) |
| 1 | 1 | 1,0100 | 0,15867 | 0,15807 (0,00277) | 1,75 |
| | 2 | 1,0146 | 0,16050 | | |
| | 3 | 1,0128 | 0,15505 | | |
| 2 | 1 | 1,5150 | 0,24642 | 0,24630 (0,01155) | 4,69 |
| | 2 | 1,5219 | 0,25779 | | |
| | 3 | 1,5192 | 0,23469 | | |
| 3 | 1 | 2,0200 | 0,33303 | 0,32866 (0,00702) | 2,14 |
| | 2 | 2,0292 | 0,33239 | | |
| | 3 | 2,0256 | 0,32055 | | |
| 4 | 1 | 2,5250 | 0,41172 | 0,41127 (0,00370) | 0,90 |
| | 2 | 2,5365 | 0,41472 | | |
| | 3 | 2,5320 | 0,40737 | | |
| 5 | 1 | 3,0300 | 0,51570 | 0,50775 (0,01425) | 2,81 |
| | 2 | 3,0438 | 0,51625 | | |
| | 3 | 3,0384 | 0,49129 | | |

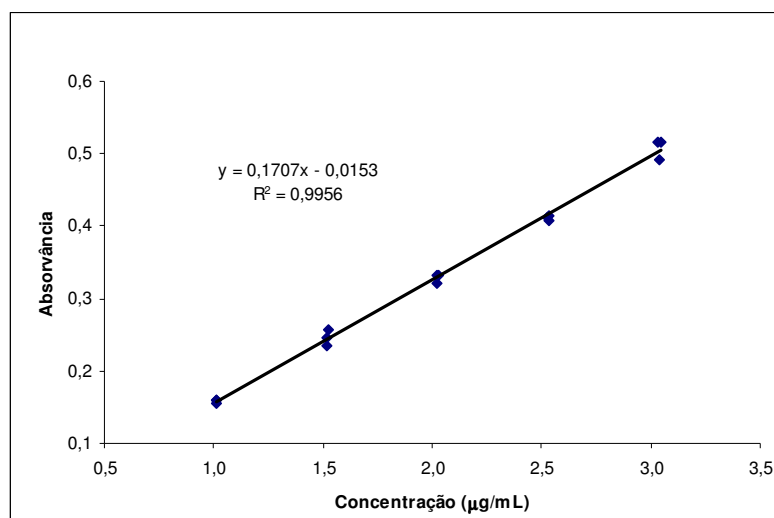


Figura 22 Curva de analítica obtida pelo método de Folin-Ciocalteu para a catequina λ 760 nm.

Os resíduos seguem distribuição aleatória como pode ser visto na Figura 23. A regressão é significativa ($p < 0,001$) e o coeficiente de correlação (r) é maior que 0,99

(0,9978). A interseção com o eixo das abscissas foi estatisticamente diferente de zero e contribui com 4,66% na resposta a 100% da concentração de trabalho. O desvio padrão relativo da curva foi de 2,65%, o erro padrão da inclinação foi de 0,0032 e o erro padrão do intercepto de 0,0068. Apesar do valor de DPR da curva ser maior do que 2,0%, os resultados indicam que o método de Folin-Ciocalteu apresenta linearidade adequada, considerando uma matriz vegetal.

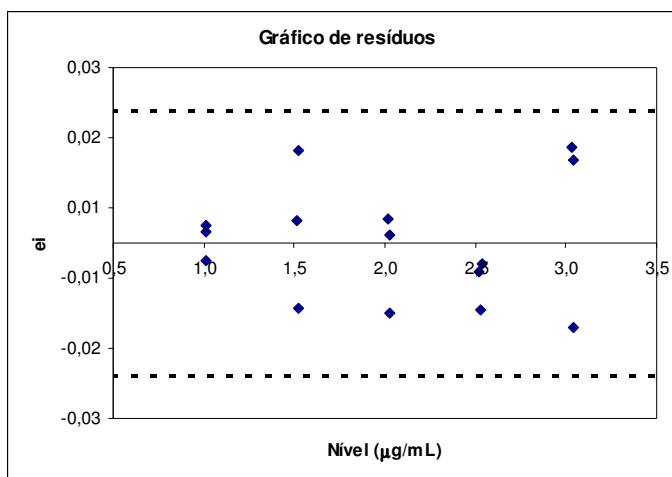


Figura 23 Distribuição dos resíduos da curva analítica para a determinação de pirogalol por Folin-Ciocalteu.

5.3.2.3 Precisão Intra-corrída e Inter-corrída

As concentrações das amostras de extrato etanólico seco utilizadas para determinação do teor de polifenóis totais e de polifenóis não adsorvidos estão apresentadas na Tabela 37.

Os valores obtidos para os teores de taninos totais, conforme Farmacopéia Européia 6ª edição, para avaliar a precisão intra-corrída do método são apresentados na Tabela 38.

Tabela 37 Concentrações de amostras de extrato etanólico seco utilizadas para avaliação da precisão intra-corrída do método de Folin-Ciocalteu

| Amostra | Massa de EES ^a (mg) | Conc. EES ₁ (µg/mL) ^b | Conc. EES ₂ (µg/mL) ^c |
|---------|--------------------------------|---|---|
| 1 | 100,60 | 6,4384 | 80,480 |
| 2 | 100,41 | 6,4262 | 80,328 |
| 3 | 100,95 | 6,4608 | 80,760 |
| 4 | 100,43 | 6,4275 | 80,344 |
| 5 | 100,12 | 6,4077 | 80,096 |
| 6 | 100,77 | 6,4493 | 80,616 |

a: extrato etanólico seco, b: concentração de amostra utilizada para determinação de polifenóis totais, c: concentração de amostra utilizada para determinação de polifenóis não adsorvidos.

Tabela 38 Concentrações de polifenóis totais (PT) e de polifenóis não adsorvidos (PNA) obtidos da curva analítica de Folin-Ciocalteu, respectivos teores e teor de taninos totais (TT) para precisão intra-corrída

| Amostra | A _{PT} ^a | A _{PNA} ^b | Conc. PT (µg/mL) | Conc. PNA (µg/mL) | Teor PT (%) | Teor PNA (%) | TT (%) |
|---------|------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------------|-------------|--------------|--------|
| 1 | 0,34476 | 0,22404 | 2,10931 | 1,40211 | 32,76 | 1,74 | 31,02 |
| 2 | 0,34312 | 0,22403 | 2,09971 | 1,40205 | 32,67 | 1,75 | 30,93 |
| 3 | 0,34098 | 0,19716 | 2,08717 | 1,24464 | 32,31 | 1,54 | 30,76 |
| 4 | 0,34376 | 0,19429 | 2,10346 | 1,22783 | 32,73 | 1,53 | 31,20 |
| 5 | 0,34355 | 0,20098 | 2,10223 | 1,26702 | 32,81 | 1,58 | 31,23 |
| 6 | 0,34331 | 0,21748 | 2,10082 | 1,36368 | 32,57 | 1,69 | 30,88 |
| | | | | Média | 32,64 | 1,64 | 31,00 |
| | | | | d.p. | 0,18 | 0,10 | 0,18 |
| | | | | DPR (%) | 0,56 | 6,09 | 0,59 |

a: absorvância de polifenóis totais, b: absorvância de polifenóis não adsorvidos.

O valor de desvio padrão relativo de 0,59% está muito abaixo de 5,0% conforme RE nº 899/2003 da ANVISA, indicando que o método da Farmacopéia Européia 6ª edição apresenta precisão intra-corrída adequada.

A precisão inter-corrída foi avaliada por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho, em dois dias diferentes, somente com o mesmo analista, por se tratar de um método farmacopeico previamente validado.

As concentrações das amostras de extrato etanólico seco utilizadas para determinação do teor de polifenóis totais e de polifenóis não adsorvidos, obtidas inter-dias, estão apresentadas na Tabela 39.

A partir dos valores de absorvância calculou-se o teor de taninos totais nas amostras de extrato etanólico seco e o desvio padrão relativo. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 40.

Tabela 39 Concentrações de amostras de extrato etanólico seco utilizadas para avaliação da precisão inter-corrída do método de Folin-Ciocalteu

| Amostra | Massa de EES ^a (mg) | Conc. EES ₁ (µg/mL) ^b | Conc. EES ₂ (µg/mL) ^c |
|---------|--------------------------------|---|---|
| Dia 1 | 1 | 100,60 | 6,4384 |
| | 2 | 100,41 | 6,4262 |
| | 3 | 100,95 | 6,4608 |
| | 4 | 100,43 | 6,4275 |
| | 5 | 100,12 | 6,4077 |
| | 6 | 100,77 | 6,4493 |
| Dia 2 | 7 | 100,05 | 6,4032 |
| | 8 | 100,22 | 6,4141 |
| | 9 | 100,28 | 6,4179 |
| | 10 | 100,62 | 6,4397 |
| | 11 | 100,15 | 6,4096 |
| | 12 | 100,11 | 6,4070 |

a: extrato etanólico seco, b: concentração de amostra utilizada para determinação de polifenóis totais, c: concentração de amostra utilizada para determinação de polifenóis não adsorvidos.

Tabela 40 Concentrações de polifenóis totais (PT) e de polifenóis não adsorvidos (PNA) obtidos da curva analítica de Folin-Ciocalteu, respectivos teores e teor de taninos totais (TT) para precisão inter-corrída

| Amostra | A _{PT} ^a | A _{PNA} ^b | Conc. PT (µg/mL) | Conc. PNA (µg/mL) | Teor PT (%) | Teor PNA (%) | TT (%) | |
|----------------|------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------------|-------------|--------------|--------|-------|
| Dia 1 | 1 | 0,34476 | 2,10931 | 1,40211 | 32,76 | 1,74 | 31,02 | |
| | 2 | 0,34312 | 0,22403 | 2,09971 | 1,40205 | 32,67 | 1,75 | 30,93 |
| | 3 | 0,34098 | 0,19716 | 2,08717 | 1,24464 | 32,31 | 1,54 | 30,76 |
| | 4 | 0,34376 | 0,19429 | 2,10346 | 1,22783 | 32,73 | 1,53 | 31,20 |
| | 5 | 0,34355 | 0,20098 | 2,10223 | 1,26702 | 32,81 | 1,58 | 31,23 |
| | 6 | 0,34331 | 0,21748 | 2,10082 | 1,36368 | 32,57 | 1,69 | 30,88 |
| Dia 2 | 7 | 0,36307 | 2,21658 | 1,27219 | 34,62 | 1,59 | 33,03 | |
| | 8 | 0,36751 | 0,200909 | 2,24259 | 1,26660 | 34,96 | 1,58 | 33,38 |
| | 9 | 0,35929 | 0,194622 | 2,19443 | 1,22977 | 34,19 | 1,53 | 32,66 |
| | 10 | 0,36265 | 0,203626 | 2,21412 | 1,28252 | 34,38 | 1,59 | 32,79 |
| | 11 | 0,35765 | 0,198529 | 2,18483 | 1,25266 | 34,09 | 1,56 | 32,52 |
| | 12 | 0,36368 | 0,210366 | 2,22015 | 1,32200 | 34,65 | 1,65 | 33,00 |
| Média | | | | | 33,56 | 1,61 | 31,95 | |
| d.p. | | | | | 0,99 | 0,08 | 1,02 | |
| DPR (%) | | | | | 2,96 | 4,81 | 3,19 | |

a: absorvância de polifenóis totais, b: absorvância de polifenóis não adsorvidos.

O valor de desvio padrão relativo encontrado 3,19 abaixo de 5,0% indica que o método conforme Farmacopéia Européia 6ª edição apresenta precisão inter-corrída adequada.

5.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO ALTERNATIVO POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO ULTRAVIOLETA PARA QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS TOTAIS EM EXTRATOS DE BARBATIMÃO

Existem diversos métodos analíticos para o doseamento de taninos em drogas vegetais, dentre eles métodos colorimétricos, químicos, gravimétricos, enzimáticos, microbiológicos e cromatográficos por CLAE (SCHOFIELD, 2001). Entretanto, os taninos condensados apresentam espectro de absorção na região do ultravioleta com dois máximos de absorção, um em λ 210 nm e outro em λ 280 nm, aproximadamente. Dessa forma, é possível, portanto, quantificar os taninos por meio de marcadores químicos, utilizando-se um agente precipitante para reduzir a interferência de substâncias polifenólicas não-tânicas, que podem estar presentes nos extratos de drogas vegetais. Além disto, estes interferentes podem apresentar cromóforos ou espectros com perfis semelhantes aos dos taninos na região ultravioleta dificultando-se a análise na região UV.

5.4.1 Seleção e otimização das condições analíticas

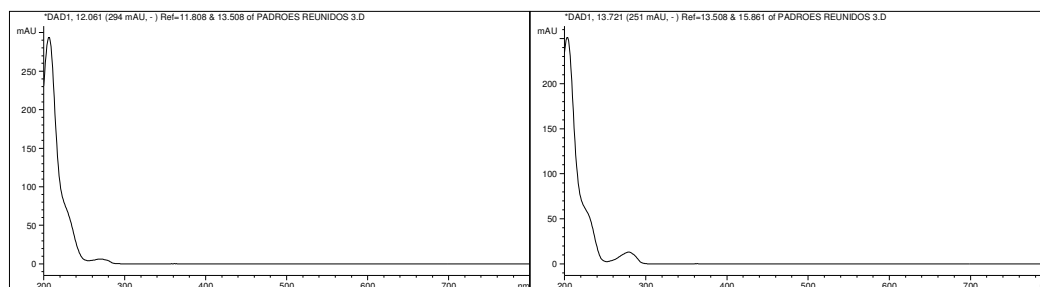
Inicialmente, os espectros obtidos para os marcadores químicos, na região ultravioleta na faixa λ 200 a 800 nm, foram analisados por meio do cromatógrafo a líquido acoplado ao detector ultravioleta (UV/DAD). Os espectros dos marcadores: ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, catequina e galato de epigalocatequina são apresentados na Figura 24 e apresentaram máximos de absorção em comprimentos de onda próximos aos descritos na literatura.

Com exceção do ácido gálico, os demais marcadores químicos apresentam espectros de absorção com perfis semelhantes com dois máximos de absorção, um na faixa λ 203-207 nm e outro na faixa λ 270-279 nm.

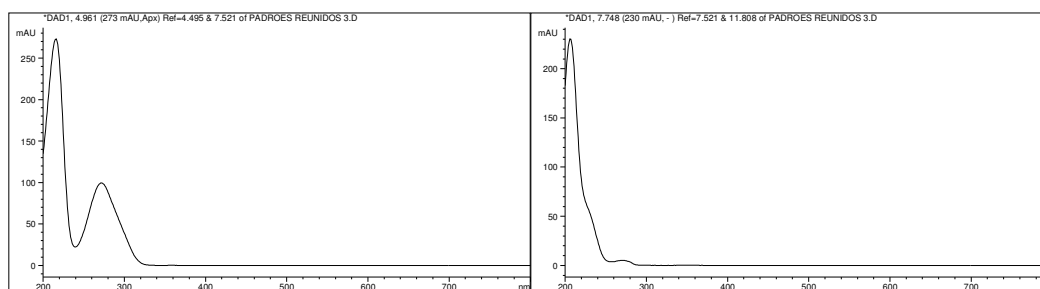
As análises por CLAE demonstraram que os marcadores: ácido gálico e catequina estão presentes em baixas concentrações nos extratos analisados. Portanto, a galocatequina, a epigalocatequina ou o galato de epigalocatequina poderiam ser utilizados como substância química de referência por meio de medidas no segundo máximo de absorção (λ máx 270-275 nm), pois esta é uma região mais seletiva do que aquela referente ao primeiro máximo de absorção (λ máx 206-207 nm). Esta proposição é reforçada quando se comparam os espectros dos padrões com espectros das amostras de extrato etanólico

seco (Figura 25), pois as amostras também apresentam λ máx 272 nm, de forma semelhante aos padrões.

Finalmente, comparando-se os espectros obtidos escolheu-se o galato de epigallocatequina como substância de referência por possuir uma absorção máxima maior que os demais padrões no comprimento de onda em torno de λ 275 nm, conferindo-se assim uma sensibilidade maior ao método.

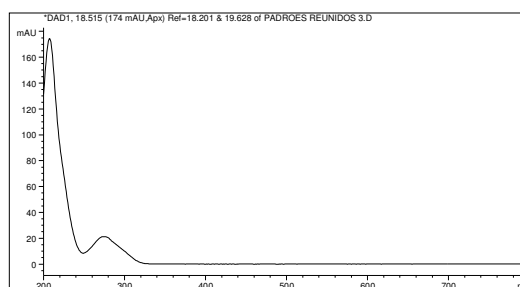


Epigallocatequina (λ máx. 206, 229^a e 270 nm) Catequina (λ máx. 203, 229^a e 279 nm)



Ácido gálico (λ máx. 216 e 272 nm)

Galocatequina (λ máx. 206, 229^a e 270 nm)



Galato de epigallocatequina (λ máx. 207 e 275 nm)

Figura 24 Espectros de padrões na região ultravioleta faixa λ 200 a 800 nm obtidos por meio de detector UV/DAD acoplado ao cromatógrafo; a: ombro.

Com base nos resultados de solubilidade dos extratos, a água poderia ser usada como solvente nas soluções do extrato glicólico, mas não para o extrato etanólico. Soluções de ácido clorídrico 0,1 mol/L seriam adequadas somente para o extrato etanólico seco, uma vez que pode existir a possibilidade de degradação, principalmente para o padrão galato de

epigallocatequina, um éster, portanto, lábil. Assim, os alcoóis são solventes de escolha por solubilizarem tanto os padrões quanto as amostras de extrato.

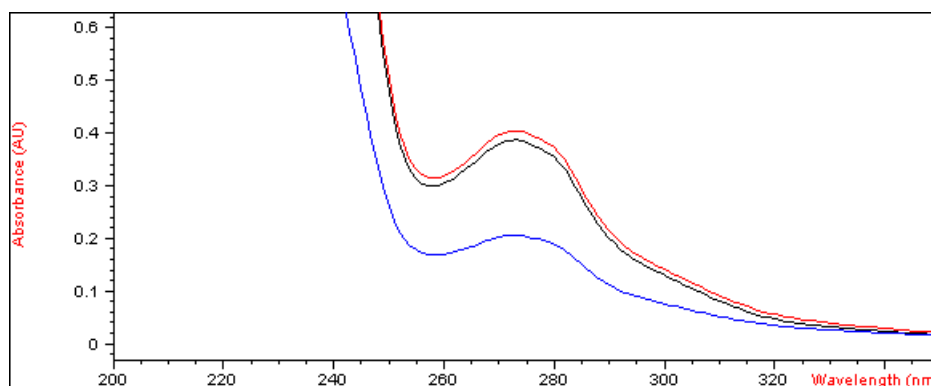


Figura 25 Espectros de extrato etanólico seco (50 µg/mL) em solução hidroalcoólica antes (preto e vermelho) e após (azul) a precipitação com pó-de-pele na região ultravioleta faixa λ 200 a 400 nm.

Embora a solubilidade das amostras seja menor no etanol esse solvente foi selecionado, inicialmente, pois é menos tóxico e mais barato do que metanol. Entretanto, a precipitação com pó-de-pele nesse solvente não foi possível, indicando que o meio aquoso é necessário para haver a formação/precipitação do complexo proteína-tanino. Portanto, optou-se por trabalhar com misturas de metanol em água, solubilizando-se primeiramente as amostras no metanol e posteriormente completando-se o volume com água ultrapura. A proporção ideal de metanol foi 10% (V/V) para solubilização do extrato etanólico. Concentrações menores de metanol levam a precipitação das amostras após 24 horas de armazenamento em geladeira.

Os espectros de água e de metanol 10% foram, separadamente, traçados na faixa de 200 nm a 400 nm, foram coincidentes. Portanto, os dois solventes poderiam ser utilizados como branco, entretanto, é mais conveniente utilizar a água ultrapura para ajuste do zero no espectrofotômetro.

Avaliaram-se etanol, metanol, água e metanol 10% (V/V) como solvente das frações orgânica e aquosa do extrato etanólico seco. Os perfis em metanol e etanol foram semelhantes e aqueles em água e metanol 10% V/V apresentaram menor absorção máxima no λ 275 nm, mas ainda mensuráveis.

Após a otimização das condições do preparo das amostras, verificou-se que a água ultrapura pode ser usada para o preparo do padrão, das diluições do extrato glicólico. Para o extrato etanólico seco e suas frações é necessário utilizar a solução hidrometanólica nas análises.

Nos métodos oficiais para doseamento de taninos totais da Farmacopéia Brasileira 4ª edição e Farmacopéia Européia 6ª edição utilizam-se 200 mg e 100 mg de pó-de-pele respectivamente. Selecionou-se a massa 200 mg de pó-de-pele como precipitante, ajustando-se à concentração e à alíquota das amostras que forneciam resposta dentro da faixa linear da Lei de Lambert-Beer, considerada em torno de 0,2 a 0,8 A.

Após otimização, os espectros de galato de epigalocatequina e de amostras foram traçados, na faixa λ 200 a 400 nm. A sobreposição dos espectros do padrão e dos extratos está representada na Figura 26. Pode-se observar a mesma banda de absorção em ambos os espectros, com comprimento de onda λ 272 nm, utilizando-se água ultrapura como branco.

5.4.2 Validação do método analítico por espectrofotometria na região ultravioleta

Foram avaliadas as seguintes figuras de mérito no método: seletividade, linearidade, precisão exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação de acordo com os parâmetros e especificações recomendadas pela RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA e o Guia do ICH de Validação de Procedimentos Analíticos (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL, 2005).

Para a realização dos testes utilizou-se o extrato etanólico seco e após a validação do método determinou-se o teor na droga vegetal, no extrato glicólico, nas frações orgânica e aquosa do extrato etanólico seco, todos da espécie *S. adstringens*. Além disto, quantificou-se o teor de taninos totais nas frações purificadas aquosa e orgânica obtidas de extrato metanólico de *S. obovatum*. Os resultados de tais frações foram comparados para as duas espécies de barbatimão.

5.4.2.1 Seletividade

Os espectros do galato de epigalocatequina, na região ultravioleta (faixa λ 200 a 400 nm), em água ultrapura, e os espectros de extratos de barbatimão, em metanol a 10% (V/V) antes e após reação com pó-de-pele são apresentados na Figura 26. Pode-se observar um máximo de absorção em 272 nm tanto no padrão quanto nas amostras. O perfil coincidente dos espectros de padrão e amostra demonstra a possibilidade de quantificação dos taninos totais em termos desta substância de referência. O espectro de amostra após reação com pó-de-pele possui menor absorção que a amostra antes da reação, indicando que a fração tânica foi retirada. Os taninos totais são calculados pela diferença entre a

concentração dos polifenóis totais e os polifenóis não adsorvidos, portanto, o método é seletivo para os taninos totais.

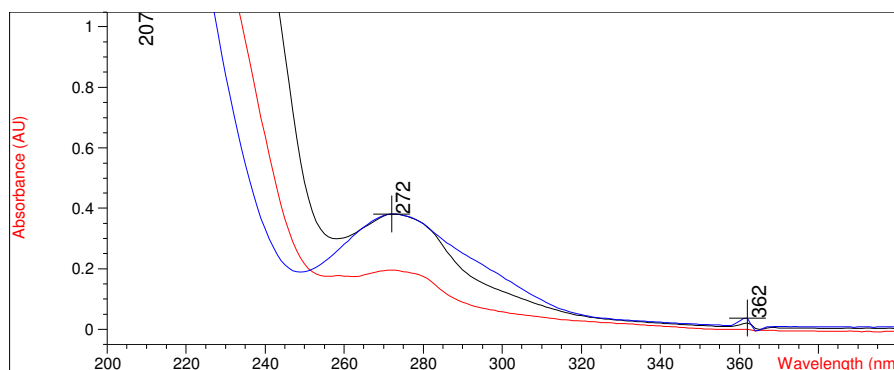


Figura 26 Sobreposição dos espectros de extrato etanólico seco 50 µg/mL antes de reagir com pó-de-pele (preto), extrato etanólicos seco 250 µg/mL após reação com pó-de-pele (vermelho) e galato de epigalocatequina 15 µg/mL (azul).

5.4.2.2 Linearidade

Foi construída uma curva analítica para o galato de epigalocatequina a partir de seis concentrações diferentes, cada uma em triplicata. A curva obtida demonstrou relação linear entre as concentrações das soluções (µg/mL) e as medidas de absorvância, na faixa 5,0 a 30,0 µg/mL de galato de epigalocatequina, correspondente a 33 a 200% da concentração de trabalho. A Tabela 41 apresenta os valores de concentração e suas respectivas medidas de absorvâncias para avaliação da linearidade.

A curva foi construída plotando-se a concentração de galato de epigalocatequina na solução *versus* absorvância (Figura 27).

Tabela 41 Resultados obtidos para a construção da primeira curva analítica para o galato de epigallocatequina por espectrofotometria na região ultravioleta λ 272 nm

| Solução | Replicata | Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | Absorvância | | |
|---------|-----------|-----------------------------------|----------------|----------------------|---------|
| | | | Abs | Média (d.p.) | DPR (%) |
| 1 | 1 | 5,13 | 0,13682 | 0,13723 (0,00057) | 0,42 |
| | 2 | 5,13^a | 0,12542 | | |
| | 3 | 5,13 | 0,13763 | | |
| 2 | 1 | 10,26 | 0,24909 | 0,24780 (0,00254) | 1,03 |
| | 2 | 10,26 | 0,24487 | | |
| | 3 | 10,26 | 0,24943 | | |
| 3 | 1 | 15,39 | 0,35741 | 0,35836 (0,00098) | 0,27 |
| | 2 | 15,39 | 0,35937 | | |
| | 3 | 15,39 | 0,35831 | | |
| 4 | 1 | 20,52^a | 0,46199 | 0,47137 (0,00191) | 0,41 |
| | 2 | 20,52 | 0,47002 | | |
| | 3 | 20,52 | 0,47272 | | |
| 5 | 1 | 25,65 | 0,58351 | 0,57864 (0,00441) | 0,76 |
| | 2 | 25,65 | 0,57748 | | |
| | 3 | 25,65 | 0,57492 | | |
| 6 | 1 | 30,78^a | 0,68004 | 0,69226 (0,00238) | 0,34 |
| | 2 | 30,78 | 0,69394 | | |
| | 3 | 30,78 | 0,69058 | | |

a: *outliers* conforme teste baseado no resíduo Jackknife (Ji) (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

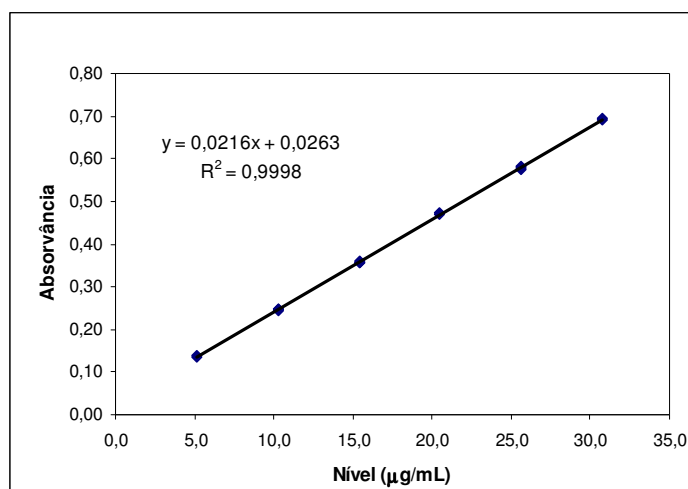


Figura 27 Curva analítica obtida pelo método de espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm para galato de epigallocatequina

Após análise estatística da curva analítica, concluiu-se que os resíduos seguem distribuição aleatória como pode ser visto na Figura 28. A regressão é significativa ($p = 6,20 \times 10^{-26} < 0,001$) e o coeficiente de correlação (r) foi maior que 0,99 (0,9999). A interseção com o eixo das abscissas não foi estatisticamente diferente de zero e contribui com 7,33% na resposta a 100% da concentração de trabalho representando um erro sistemático ao método. O desvio padrão relativo da curva foi 0,70%, indicando precisão adequada. O erro padrão da inclinação foi 0,00008 e o erro padrão do intercepto 0,00152. Os resultados encontrados demonstram que o método desenvolvido por UV apresenta linearidade adequada, considerando uma matriz vegetal.

Uma das possíveis causas deste problema pode ser alguma degradação do padrão nas condições de análise, provavelmente pela luz. Uma avaliação mais apurada da estabilidade do galato de epigallocatequina no solvente utilizado e em temperatura ambiente faz-se necessária para o estabelecimento de melhores condições para o teste. Mesmo assim, o método por espectrofotometria na região ultravioleta mostrou-se como uma alternativa viável em relação aos métodos clássicos Folin-Denis e Folin-Ciocalteu.

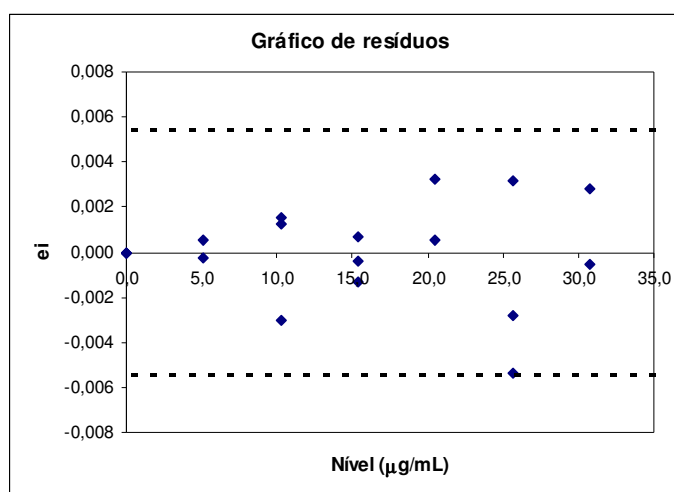


Figura 28 Distribuição dos resíduos da curva analítica obtida pelo método de espectrofotometria na região ultravioleta para a determinação de galato de epigallocatequina, λ 272 nm.

5.4.2.3 Precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio

As concentrações das amostras de extrato etanólico seco utilizadas com as respectivas concentrações para determinação do teor de taninos totais estão apresentadas na Tabela 42.

Os teores de taninos totais obtidos por espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm, para avaliar a precisão intra-corrida são apresentados na Tabela 43.

Tabela 42 Concentrações de amostras de extrato etanólico seco de *S. adstringens* utilizadas para avaliação da precisão intra-corrída por espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm

| Amostra | Massa de EES ^a (mg) | Conc. EES ₁ ($\mu\text{g/mL}$) ^b | Conc. EES ₂ ($\mu\text{g/mL}$) ^c |
|---------|--------------------------------|--|--|
| 1 | 25,09 | 50,18 | 250,90 |
| 2 | 25,18 | 50,36 | 251,80 |
| 3 | 25,35 | 50,70 | 253,50 |
| 4 | 25,60 | 51,20 | 256,00 |
| 5 | 25,24 | 50,48 | 252,40 |
| 6 | 25,23 | 50,46 | 252,30 |

a: extrato etanólico seco *S. adstringens*, b: concentração de amostra utilizada para determinação de polifenóis totais, c: concentração de amostra utilizada para determinação de polifenóis não adsorvidos.

Tabela 43 Teores de polifenóis totais (PT) e de polifenóis não adsorvidos (PNA) obtidos por espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm, e teor de taninos totais (TT) para precisão intra-corrída

| Amostra | A _{PT} ^a | A _{PNA} ^b | Conc. PT ($\mu\text{g/mL}$) | Conc. PNA ($\mu\text{g/mL}$) | Teor PT (%) | Teor PNA (%) | TT (%) |
|----------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------|--------------|--------|
| 1 | 0,38067 | 0,19551 | 16,40620 | 7,83361 | 32,69 | 3,12 | 29,57 |
| 2 | 0,38092 | 0,19822 | 16,41773 | 7,95931 | 32,60 | 3,16 | 29,44 |
| 3 | 0,38136 | 0,20271 | 16,43815 | 8,16713 | 32,42 | 3,22 | 29,20 |
| 4 | 0,39847 | 0,20999 | 17,23023 | 8,50435 | 33,65 | 3,32 | 30,33 |
| 5 | 0,39117 | 0,19561 | 16,89222 | 7,83856 | 33,46 | 3,11 | 30,36 |
| 6 | 0,39784 | 0,20880 | 17,20088 | 8,44917 | 34,09 | 3,35 | 30,74 |
| Média | | | | | 33,15 | 3,21 | 29,94 |
| d.p. | | | | | 0,67 | 0,10 | 0,62 |
| DPR (%) | | | | | 2,03 | 3,20 | 2,06 |

a: absorvância de polifenóis totais, b: absorvância de polifenóis não adsorvidos.

O valor de desvio padrão relativo, 2,06%, está abaixo de 5,0% conforme RE nº 899/2003 da ANVISA, indicando que o método espectrofotométrico na região ultravioleta apresenta precisão intra-corrída adequada.

A precisão inter-corrída foi avaliada por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho, em dois dias diferentes, com o mesmo analista. As concentrações das amostras de extrato etanólico seco utilizadas com as respectivas concentrações para determinação do teor de taninos totais estão apresentadas na Tabela 44.

A partir dos valores de absorvância calculou-se o teor de taninos totais nas amostras de extrato etanólico seco e o desvio padrão relativo. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 45.

Tabela 44 Concentrações de amostras de extrato etanólico seco de *S. adstringens* utilizadas para avaliação da precisão inter-corrída por espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm

| Amostra | Massa de EES ^a (mg) | Conc. EES ₁ ($\mu\text{g/mL}$) ^b | Conc. EES ₂ ($\mu\text{g/mL}$) ^c | |
|---------|--------------------------------|--|--|--------|
| Dia 1 | 1 | 25,09 | 50,18 | 250,90 |
| | 2 | 25,18 | 50,36 | 251,80 |
| | 3 | 25,35 | 50,70 | 253,50 |
| | 4 | 25,60 | 51,20 | 256,00 |
| | 5 | 25,24 | 50,48 | 252,40 |
| | 6 | 25,23 | 50,46 | 252,30 |
| Dia 2 | 7 | 25,49 | 50,98 | 254,90 |
| | 8 | 25,08 | 50,16 | 250,80 |
| | 9 | 25,04 | 50,08 | 250,40 |
| | 10 | 25,47 | 50,94 | 254,70 |
| | 11 | 25,52 | 51,04 | 255,20 |
| | 12 | 25,06 | 50,12 | 250,60 |
| Dia 3 | 13 | 25,57 | 51,14 | 255,70 |
| | 14 | 25,37 | 50,74 | 253,70 |
| | 15 | 25,31 | 50,62 | 253,10 |
| | 16 | 25,06 | 50,12 | 250,60 |
| | 17 | 25,59 | 51,18 | 255,90 |
| | 18 | 25,46 | 50,92 | 254,60 |

a: extrato etanólico seco, b: concentração de amostra utilizada para determinação de polifenóis totais, c: concentração de amostra utilizada para determinação de polifenóis não adsorvidos.

Tabela 45 Concentrações de polifenóis totais (PT) e de polifenóis não adsorvidos (PNA) obtidos da curva analítica do método alternativo UV, respectivos teores e teor de taninos totais (TT) para precisão inter-corrída de *S. adstringens*

| Amostra | A _{PT} ^a | A _{PNA} ^b | Conc. PT (µg/mL) | Conc. PNA (µg/mL) | Teor PT (%) | Teor PNA (%) | TT (%) | |
|----------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------|----------------|-----------------|--------|-------|
| Dia 1 | 1 | 0,38067 | 0,19551 | 16,40620 | 7,83361 | 32,69 | 3,12 | 29,57 |
| | 2 | 0,38092 | 0,19822 | 16,41773 | 7,95931 | 32,60 | 3,16 | 29,44 |
| | 3 | 0,38136 | 0,20271 | 16,43815 | 8,16713 | 32,42 | 3,22 | 29,20 |
| | 4 | 0,39847 | 0,20999 | 17,23023 | 8,50435 | 33,65 | 3,32 | 30,33 |
| | 5 | 0,39117 | 0,19561 | 16,89222 | 7,83856 | 33,46 | 3,11 | 30,36 |
| | 6 | 0,39784 | 0,20880 | 17,20088 | 8,44917 | 34,09 | 3,35 | 30,74 |
| Dia 2 | 7 | 0,36832 | 0,18827 | 15,83426 | 7,49861 | 31,06 | 2,94 | 28,12 |
| | 8 | 0,38385 | 0,19857 | 16,55324 | 7,97546 | 33,00 | 3,18 | 29,82 |
| | 9 | 0,37003 | 0,18776 | 15,91343 | 7,47500 | 31,78 | 2,99 | 28,79 |
| | 10 | 0,38667 | 0,18852 | 16,68380 | 7,51019 | 32,75 | 2,95 | 29,80 |
| | 11 | 0,38173 | 0,18999 | 16,45509 | 7,57824 | 32,24 | 2,97 | 29,27 |
| | 12 | 0,39137 | 0,19404 | 16,90139 | 7,76574 | 33,72 | 3,10 | 30,62 |
| Dia 3 | 13 | 0,40746 | 0,22455 | 17,64630 | 9,17824 | 34,51 | 3,59 | 30,92 |
| | 14 | 0,41156 | 0,22309 | 17,83611 | 9,11065 | 35,15 | 3,59 | 31,56 |
| | 15 | 0,41962 | 0,21528 | 18,20926 | 8,74907 | 35,97 | 3,46 | 32,52 |
| | 16 | 0,41875 | 0,21946 | 18,16898 | 8,94259 | 36,25 | 3,57 | 32,68 |
| | 17 | 0,42952 | 0,22550 | 18,66759 | 9,22222 | 36,47 | 3,60 | 32,87 |
| | 18 | 0,42192 | 0,21534 | 18,31574 | 8,75185 | 35,97 | 3,44 | 32,53 |
| Média | | | | | 33,77 | 3,26 | 30,51 | |
| d.p. | | | | | 1,64 | 0,24 | 1,43 | |
| DPR (%) | | | | | 4,84 | 7,29 | 4,68 | |

a: absorvância de polifenóis totais, b: absorvância de polifenóis não adsorvidos.

O valor de desvio padrão relativo encontrado 4,68% para 18 determinações, abaixo de 5,0%, indica que a espectrofotometria na região ultravioleta apresenta precisão inter-corrída adequada.

Os valores de DPR obtidos por espectrofotometria na região ultravioleta são maiores do que valores de DPR encontrados para métodos analíticos farmacêuticos (<2,0%). Tal variabilidade maior pode ser explicada pelo uso de pó-de-pele como substância precipitante dos taninos, que além de poder variar sua composição lote a lote onera bastante o tempo de análise (tempo de agitação 60 minutos).

5.4.2.4 Exatidão

Os resultados obtidos para exatidão do galato de epigallocatequina determinada utilizando-se soluções amostra fortificadas e soluções amostra sem adição de padrão são

apresentados na Tabela 46. A diferença entre a concentração da solução fortificada e a solução não fortificada, dividida pela concentração teórica do padrão, expressa a porcentagem de recuperação.

Tabela 46 Resultados de exatidão obtidos por espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm, para galato de epigallocatequina em amostras de extrato etanólico seco de *S. adstringens*

| Nível | N | Concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$) | | Conc. do Padrão ($\mu\text{g/mL}$) | Recuperação (%) | Média (%) | DPR (%) |
|------------------------------|---|--|-----------------|--------------------------------------|-----------------|-----------|---------|
| | | Fortificada | Não fortificada | | | | |
| Alto (167%) | 1 | 25,15 | 10,65 | 14,99 | 96,78 | 98,74 | 2,91 |
| | 2 | 25,25 | 10,65 | 14,99 | 97,41 | | |
| | 3 | 25,94 | 10,65 | 14,99 | 102,04 | | |
| Médio (133%) | 1 | 20,38 | 10,65 | 9,99 | 97,39 | 99,06 | 1,87 |
| | 2 | 20,51 | 10,65 | 9,99 | 98,73 | | |
| | 3 | 20,74 | 10,65 | 9,99 | 101,04 | | |
| Médio (100%) | 1 | 15,54 | 10,65 | 5,00 | 98,02 | 98,08 | 1,96 |
| | 2 | 15,45 | 10,65 | 5,00 | 96,18 | | |
| | 3 | 15,64 | 10,65 | 5,00 | 100,03 | | |
| Baixo (67%) | 1 | 10,39 | 5,32 | 5,00 | 101,42 | 102,99 | 1,34 |
| | 2 | 10,52 | 5,32 | 5,00 | 103,98 | | |
| | 3 | 10,50 | 5,32 | 5,00 | 103,57 | | |
| Recuperação média (%) | | | | | | 99,72 | |
| DPR (%) | | | | | | 2,69 | |

Os valores de porcentagem de recuperação entre 98,0% e 103,0% e desvio padrão relativo abaixo de 3,0% indicam que o método desenvolvido por espectrofotometria na região ultravioleta apresenta exatidão adequada para quantificação de galato de epigallocatequina.

5.4.2.5 Limite de detecção e limite de quantificação

O valor encontrado para o erro padrão do intercepto da curva analítica foi 0,0015 e o valor de inclinação da mesma curva foi 0,0216.

Aplicando-se a fórmula preconizada pelo Guia do ICH de Validação de Procedimentos Analíticos (INTERNATIONAL, 2005) e descrita no item 4.2.6.2.5, os valores calculados para os limites de quantificação e de detecção foram 0,71 $\mu\text{g/mL}$ e 0,23 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Na prática, normalmente, os valores estimados para o LD e para o LQ são maiores do que aqueles determinados experimentalmente. Portanto, sugere-se determinar tais

parâmetros por procedimento analítico com diluições sucessivas a partir de soluções nas concentrações estimadas até obtenção da relação sinal/ruído 3 e 10, para LD e LQ, respectivamente.

5.4.2.6 Robustez

A robustez foi avaliada variando-se deliberadamente as condições do método proposto e medindo-se o teor de taninos totais presente em seis amostras de extrato etanólico seco em cada condição. O único parâmetro avaliado foi o tempo de agitação com pó-de-pele, realizando-se o teste com 50 e 70 minutos. Os resultados estão relacionados na Tabela 47.

Tabela 47 Resultados da robustez obtidos por espectrofotometria na região ultravioleta, λ 272 nm para determinação de taninos totais em extrato etanólico seco

| Amostra | Teores de taninos totais por tempo de agitação | | |
|----------------|--|------------------|--------|
| | 50 min | 60 min (nominal) | 70 min |
| 1 | 30,61 | 29,57 | 31,17 |
| 2 | 32,08 | 29,44 | 32,64 |
| 3 | 32,37 | 29,20 | 32,05 |
| 4 | 31,51 | 30,33 | 31,61 |
| 5 | 30,73 | 30,36 | 33,04 |
| 6 | 31,58 | 30,74 | 32,51 |
| Média | 31,48 | 29,94 | 32,17 |
| DPR (%) | 2,23 | 2,06 | 2,17 |

Por comparação das médias utilizando ANOVA, demonstrou-se a diferença estatisticamente significativa entre a média obtida com as condições usuais e as médias obtidas com os tempos de agitação 50 e 70 minutos. As condições alteradas são semelhantes entre si e ambas diferem da condição usual pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Isto indica que este parâmetro é crítico para a realização desta análise e deve ser mantido em uma faixa estreita.

5.4.3 Comparação entre os métodos oficiais e o método espectrofotométrico na região ultravioleta para determinação de taninos totais

Os métodos analíticos Folin-Denis e Folin-Ciocalteu foram estatisticamente comparados com o método alternativo por espectrofotometria na região ultravioleta. Os

teores calculados para as amostras de extrato etanólico seco utilizados nesta comparação são apresentados na Tabela 48.

Tabela 48 Comparação das determinações de taninos totais de extrato etanólico seco por avaliação espectrofotométrica

| Amostra | Teores de taninos totais por tipo de método | | |
|---------|---|-------------|------------------|
| | UV alternativo | Folin-Denis | Folin-Ciocalteau |
| 1 | 29,57 | 30,58 | 33,03 |
| 2 | 29,44 | 31,10 | 33,38 |
| 3 | 29,20 | 29,95 | 32,66 |
| 4 | 30,33 | 30,40 | 32,79 |
| 5 | 30,36 | 30,51 | 32,52 |
| 6 | 30,74 | 31,07 | 33,00 |
| 7 | 28,12 | 28,66 | 31,02 |
| 8 | 29,82 | 29,52 | 30,93 |
| 9 | 28,79 | 28,81 | 30,76 |
| 10 | 29,80 | 29,11 | 31,20 |
| 11 | 29,27 | 30,38 | 31,23 |
| 12 | 30,62 | 28,89 | 30,88 |
| Média | 29,67 | 29,91 | 31,95 |
| DPR (%) | 2,62 | 2,96 | 3,19 |

A comparação das médias por ANOVA demonstrou diferença estatisticamente significativa entre as médias obtidas para os três métodos ($F = 23,24 > F_{\text{crítico}} = 3,28$). Pelo teste de Tukey pôde-se avaliar que os métodos de espectrofotometria na região ultravioleta e Folin-Denis não são estatisticamente diferentes e ambos diferem do método Folin-Ciocalteau. Tais resultados indicam que o método desenvolvido por espectrofotometria na região ultravioleta pode ser uma opção viável para a quantificação de taninos totais em extratos de barbatimão. Tal método é de execução mais fácil e menos sujeito a interferência por parâmetros considerados críticos nos métodos colorimétricos (tempo, ordem de adição, concentração de padrões e de reagentes). Além disto, o método desenvolvido utiliza menor quantidade de reagentes os quais são menos tóxicos para o analista e para o meio ambiente, haja vista que os reagentes Folin-Denis e Folin-Ciocalteau contêm metais pesados (molibdênio e tungstênio) na sua composição.

Entretanto, a utilização de algum reagente precipitante para retirar a fração tânica da amostra ainda é necessária. Uma alternativa viável seria a utilização de técnicas espectrais tais como a diferenciação ou a razão espectral entre determinados comprimentos de onda com o intuito de se eliminar interferências da matriz. Desta forma, seria possível a

quantificação dos taninos totais sem a utilização de etapa de eliminação de taninos não adsorvidos com o pó-de-pele, ou outro agente precipitante, como por exemplo, caseína, albumina bovina sérica (BSA), polietilenoglicol (PEG 4000) ou polivinilpirrolidona (PVP).

5.4.4 Doseamento dos extratos de barbatimão por espectrofotometria na região ultravioleta, método alternativo

Os resultados de doseamento das amostras de extrato e de suas frações para duas espécies de barbatimão, *S. adstringens* e *S. obovatum*, foram avaliados. Os teores médios encontrados, para cada amostra, estão representados na Tabela 49.

Tabela 49 Resultados de doseamento (n = 3) obtido por espectrofotometria na região ultravioleta para diferentes espécies e amostras de extratos de barbatimão

| Espécie | Amostra | Doseamento (% p/p) | | |
|-----------------------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | | PT ^b (d.p.) DPR% | PNA ^c (d.p.) DPR% | TT ^d (d.p.) DPR% |
| <i>S. adstringens</i> | Droga vegetal | 16,12 (0,19) | 1,89 (0,12) | 14,23 (0,09) |
| | | 1,21% | 6,35% | 0,64% |
| | Fração orgânica (EES) ^a | 37,34 (0,20) | 5,91 (0,02) | 31,43 (0,22) |
| | | 0,54% | 0,33% | 0,69% |
| | Fração aquosa (EES) | 36,99 (0,08) | 1,61 (0,09) | 35,38 (0,05) |
| | | 0,22% | 5,51% | 0,14% |
| Extrato glicólico | 8,79 (0,08) | 0,76 (0,05) | 8,04 (0,13) | |
| | 0,92% | 6,23% | 1,60% | |
| <i>S. obovatum</i> | Fração orgânica (EES) | 41,66 (0,76) | 3,00 (0,09) | 38,66 (0,85) |
| | | 1,83% | 2,98% | 2,20% |
| | Fração aquosa (EES) | 37,41 (0,16) | 2,26 (0,60) | 35,15 (0,74) |
| | | 0,42% | 26,72% | 2,10% |

a: extrato etanólico seco; b: polifenóis totais; c: polifenóis não adsorvidos; d: taninos totais.

De acordo com os resultados, observa-se que os teores da droga vegetal são menores do que os dos extratos secos, demonstrando que, com exceção do extrato glicólico, os processos de extração empregados são capazes de concentrar os ativos nas amostras.

O extrato glicólico apresentou um teor de taninos totais muito baixo em relação às demais amostras demonstrando que apesar do propilenoglicol ser um solvente adequado para extração deste grupo químico é menos eficiente do que o etanol. A obtenção dos extratos etanólicos secos pela evaporação do solvente extrator em evaporador rotatório explica os altos teores de taninos totais presentes nestas amostras.

As frações purificadas de extrato etanólico seco das duas espécies de barbatimão estudadas, preparadas conforme item 4.2.7.2, apresentaram teores de taninos totais ligeiramente diferentes entre si. Como são espécies distintas, coletadas em locais diferentes, elas podem apresentar variações na concentração de taninos totais (Mello *et al.*, 1996a, 1996b, 1999). Tal variação ocorre até na mesma espécie em função de variações sazonais climáticas e de qualidade do solo onde a planta se encontra.

Tanto as frações orgânicas quanto as aquosas de extrato etanólico seco das duas espécies possuem grande teor de taninos totais, avaliados por espectrofotometria na região ultravioleta. Portanto, a purificação do extrato etanólico seco por partição líquido-líquido não alterou de forma significativa a composição das frações, ou seja, não houve um deslocamento quase completo dos taninos para uma das frações purificadas.

5.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DE GALOCATEQUINA E DE GALATO DE EPIGALOCATEQUINA EM EXTRATOS DE BARBATIMÃO

5.5.1 Desenvolvimento do método cromatográfico

Inicialmente, a determinação dos melhores solventes para os extratos foi avaliada com base nos dados de solubilidade dos padrões e dos próprios extratos de barbatimão selecionada e otimizada como descrito para o método espectrofotométrico na região ultravioleta (item 4.2.6.1). O metanol foi utilizado como solvente em análises prévias de curvas analíticas para os marcadores químicos galocatequina e galato de epigalocatequina, entretanto, os mesmos foram pouco estáveis neste solvente nas concentrações estudadas.

Optou-se por trabalhar com soluções hidroalcoólicas para solubilização das amostras e dos padrões, de forma semelhante ao utilizado no método por UV. Os marcadores químicos apresentaram estabilidade suficiente para a construção das curvas analíticas.

Por meio de uma corrida cromatográfica inicial em gradiente exploratório amplo obteve-se o cromatograma apresentado na Figura 29. As amostras eluíram num tempo máximo de 25 minutos, em um tempo total de corrida de 60 minutos, e apresentaram composição complexa, com grande elevação de linha de base.

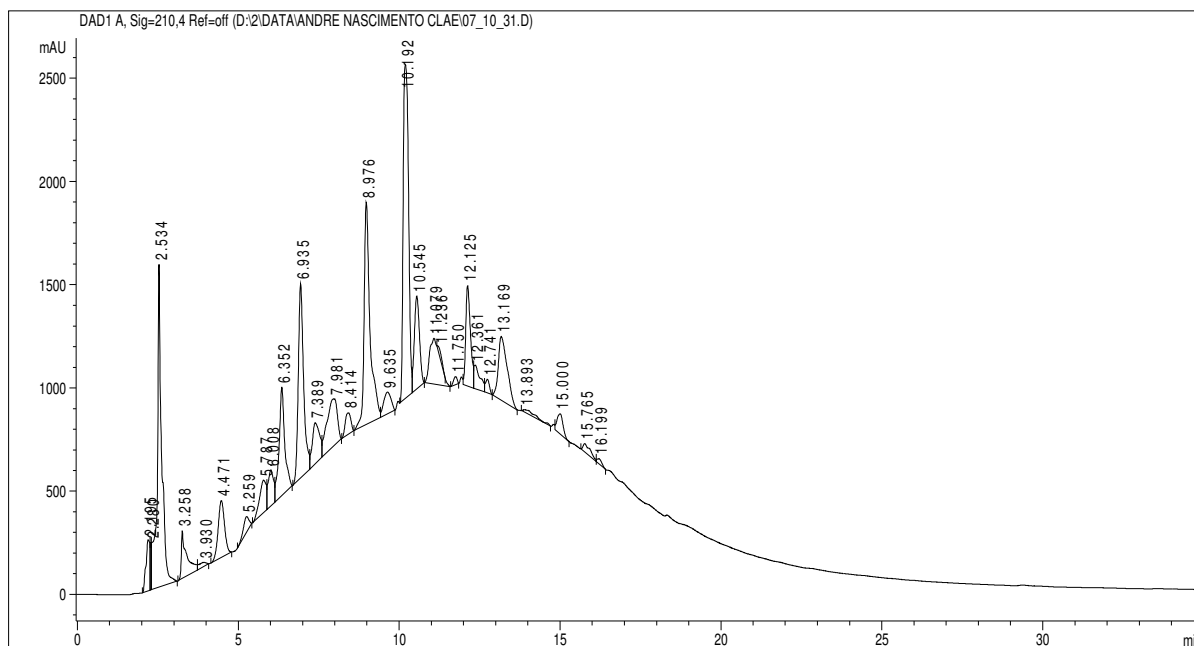


Figura 29 Cromatograma inicial obtido por eluição em gradiente exploratório amplo: 5% a 95% acetonitrila (ACN), 60 min, para extrato etanólico seco de *S. adstringens* a 10 mg/mL em metanol 10% V/V; volume de injeção 10 μ L; fase móvel ACN:água (5:95) acidificados com ácido fosfórico 0,1% (V/V); fluxo 1 mL/min; 40 °C; detecção λ 210 nm.

Apos avaliação dos perfis cromatográficos apresentados pelos extratos etanólico seco de *S. adstringens*, condições cromatográficas pré-otimizadas para uma eluição em gradiente mais brando foram estabelecidas (Tabela 50).

Tabela 50 Condições cromatográficas pré-otimizadas em gradiente para determinação de taninos em insumos ou produtos vegetais (barbatimão *S. adstringens* (Martius) Coville)

| Parâmetros | Condições |
|----------------------------------|--|
| Volumes de injeção | 10 μ L |
| Fase móvel e modo de eluição | Água:ACN (95:5) Etapa 1: Gradiente ACN 5% a 40% por 60 min Etapa 2: Isocrático ACN 40% por 5 min Etapa 3: Gradiente ACN 40% a 5% por 10 min |
| Fluxo | 1 mL/min |
| Coluna | LiChroCART® 250x4 mm, LiChrospher® 100 RP-18, 5 μ m, Merck, lote 849117 |
| Temperatura da coluna | 30 °C |
| Comprimentos de onda de detecção | λ 210 nm, 274 nm, 280 nm, 330 nm e 550 nm; aquisição de espectros UV-VIS/DAD |
| Tempo de corrida | 60 min |

Com o gradiente pré-otimizado, obteve-se o cromatograma apresentado na Figura 30. As amostras eluíram no tempo máximo de 40 minutos, em um tempo de corrida total de 60 minutos, e os picos principais apresentaram melhor resolução.

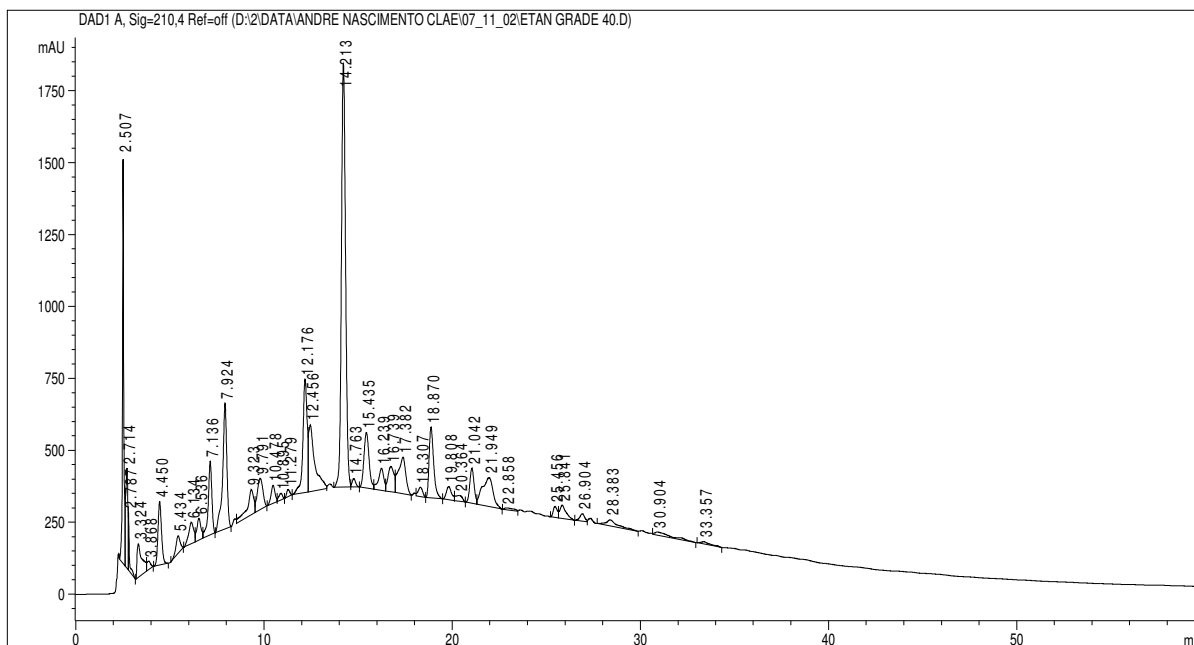


Figura 30 Cromatograma inicial obtido por eluição em gradiente linear: 5% a 40% acetonitrila (ACN), 60 min, para extrato etanólico seco de *S. adstringens* a 10 mg/mL em metanol 10% V/V; volume de injeção 10 μ L; fase móvel ACN:água (5:95) acidificados com ácido fosfórico 0,1% (V/V); fluxo 1 mL/min; 40 °C; detecção λ 210 nm.

Observa-se neste cromatograma que a linha de base sofre grande alteração ao longo da análise. Com o intuito de minimizar tal problema, um método para purificação da amostra por partição líquido-líquido foi desenvolvido e está descrito no item 5.5.2.

5.5.2 Pré-purificação das amostras de extrato etanólico seco de *S. adstringens* por partição líquido-líquido

O objetivo da etapa de purificação é eliminar, da amostra, interferentes que possam prejudicar a análise sem, no entanto, retirar os marcadores de interesse para quantificação no extrato. Tais interferentes podem ainda prejudicar a eluição da amostra ao longo da coluna cromatográfica levando a obtenção de uma linha de base, no cromatograma, com alterações ao longo do gradiente. Este problema dificulta a integração adequada do cromatograma, perdendo-se exatidão e precisão no método.

Com a purificação por meio de PLL dos extratos etanólicos de *S. adstringens* obtiveram-se duas frações: orgânica e aquosa. Os cromatogramas das frações são apresentados nas Figuras 31 e 32.

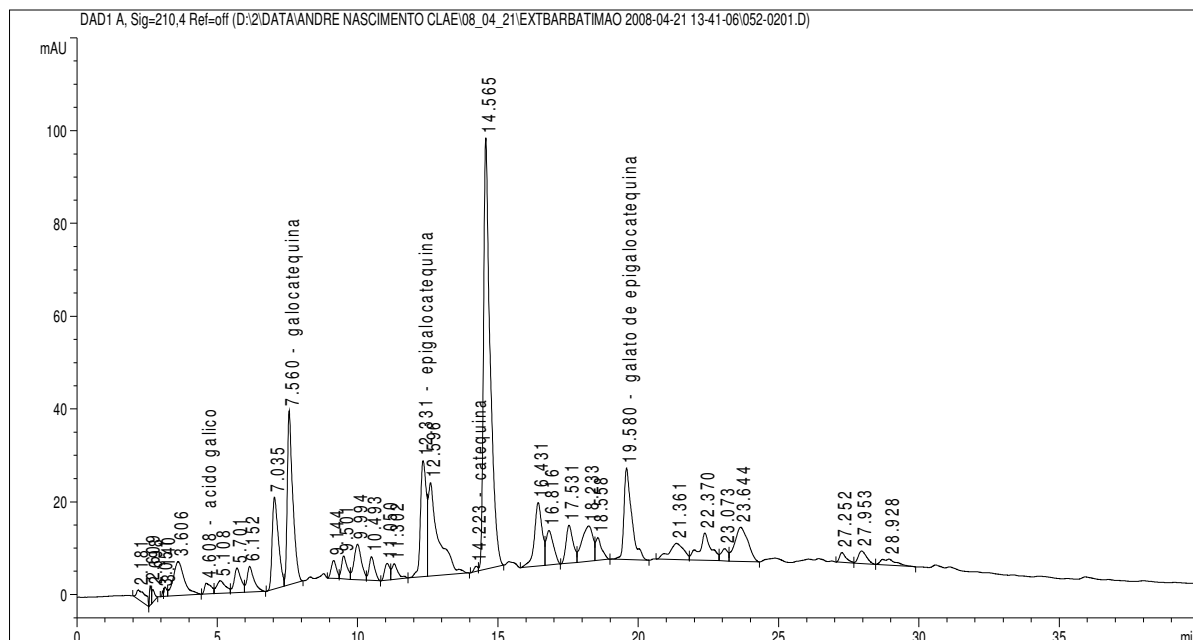


Figura 31 Cromatograma obtido por eluição em gradiente linear: 5% a 40% acetonitrila (ACN), 60 min, para a fração orgânica de *S. adstringens* a 1 mg/mL em metanol 10% V/V; volume de injeção 2,5 μ L; fase móvel ACN:água (5:95) acidificados com ácido fosfórico 0,1% (V/V); fluxo 1 mL/min; 40 °C; detecção λ 210 nm. Amostra de partida 250 mg de extrato etanólico seco de *S. adstringens*.

Os cromatogramas obtidos com injeções de soluções de frações purificadas por PLL apresentaram linha de base com menor variação da inclinação ao longo do gradiente, melhorando-se a resolução dos picos. Pode-se observar que a fração aquosa também apresentou picos dos marcadores galocatequina e galato de epigalocatequina em concentração muito baixa. Isto demonstra que tais marcadores têm o equilíbrio deslocado no sentido da fração orgânica quando dissolvidos no sistema particional binário de purificação. Portanto, a purificação por PLL desenvolvida foi capaz de retirar compostos da matriz da amostra, os quais poderiam interferir nas análises por CLAE e conservar em quase sua totalidade os marcadores.

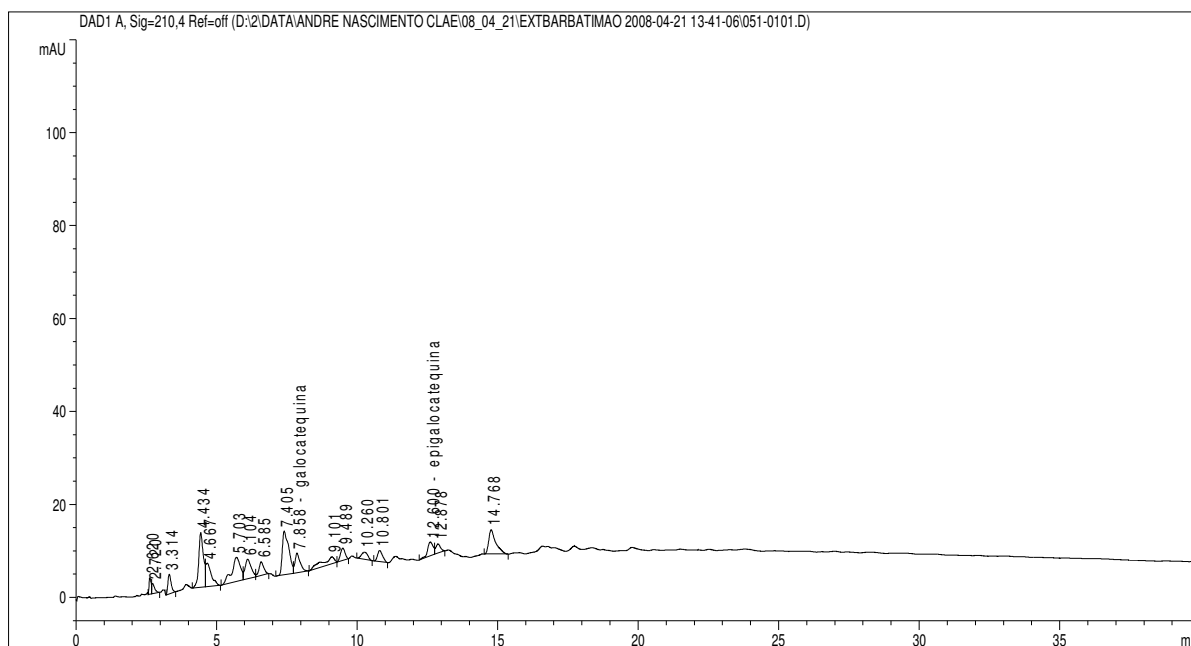


Figura 32 Cromatograma obtido por eluição em gradiente linear: 5% a 40% acetonitrila (ACN), 60 min, para a fração aquosa de *S. adstringens* a 1 mg/mL em metanol 10% V/V; volume de injeção 2,5 μ L; fase móvel ACN:água (5:95) acidificados com ácido fosfórico 0,1% (V/V); fluxo 1 mL/min; 40 °C; detecção λ 210 nm. Amostra de partida 250 mg de extrato etanólico seco de *S. adstringens*.

5.5.2.1 Caracterização das frações por espectrofotometria de absorção no infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho das frações purificadas do extrato etanólico seco são apresentados na Figura 33. As bandas de absorção observadas são consistentes com a estrutura química de monômeros de taninos condensados (flavan-3-óis). Alguns exemplos destes monômeros são apresentados na Figura 1, item 3.2 Constituição Química.

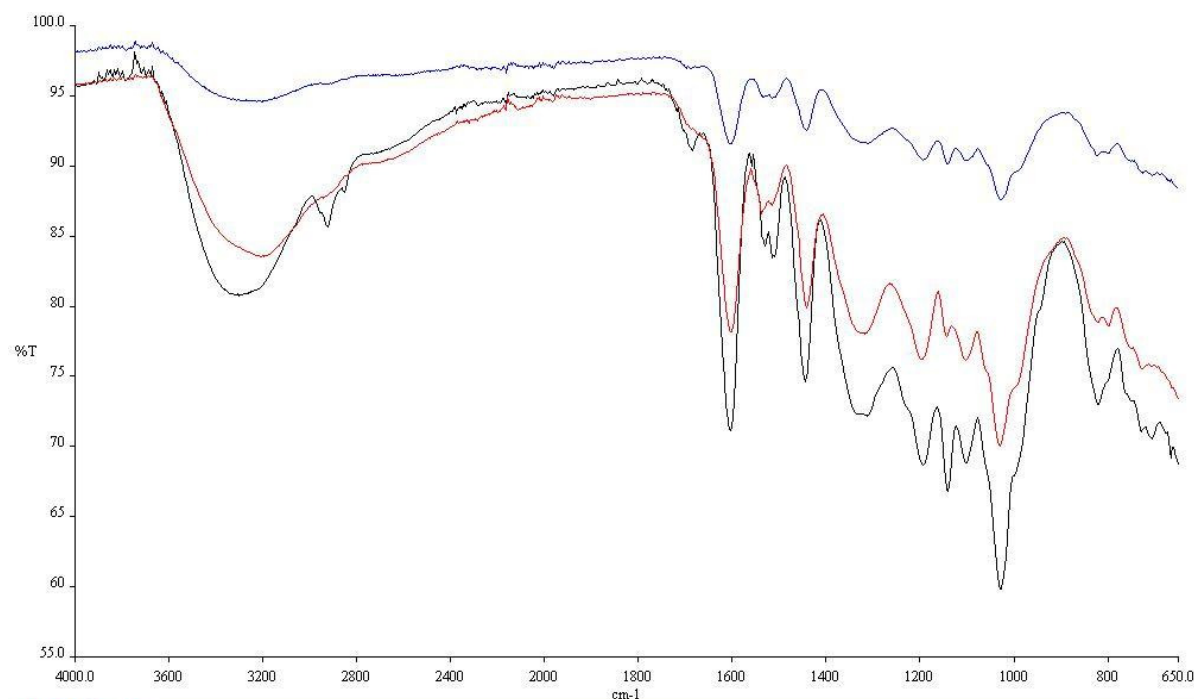


Figura 33 Sobreposição dos espectros de absorção no infravermelho da fração orgânica I (preta), fração orgânica II (azul) e fração aquosa (vermelho).

Na Tabela 51 são apresentadas as atribuições das principais bandas observadas nos espectros das frações purificadas.

Tabela 51 Atribuições das principais bandas de absorção das frações purificadas do extrato etanólico seco de *S. adstringens* na região do infravermelho (4000 a 650 cm^{-1})

| Número de onda (cm^{-1}) | | | Intensidade | Atribuição |
|-------------------------------------|---------|---------|-------------|---|
| Org I | Org II | Aquosa | | |
| 3301,91 | 3208,43 | 3209,34 | F, L | Deformação axial de O-H |
| 2925,12 | - | - | F | Deformação axial de C-H em aromático |
| 1605,49 | 1603,07 | 1602,80 | F | Deformação axial C=C do anel aromático |
| 1532,30 | 1532,30 | 1538,22 | f | Deformação axial C=C do anel aromático |
| 1515,14 | 1512,07 | 1514,60 | f | Deformação axial C=C do anel aromático |
| 1445,93 | 1443,59 | 1441,67 | F | Deformação axial C=C do anel aromático |
| 1312,18 | 1312,18 | 1317,71 | F | Deformação axial C-O de álcool primário |
| 1194,55 | 1193,53 | 1197,01 | f | Deformação angular de O-H de álcool secundário |
| 1029,52 | 1028,65 | 1031,08 | F | Deformação axial simétrica de C-O-C de éter cíclico |

Nota: F = forte; f = fraca; L = larga.

Observa-se nos espectros que o perfil é semelhante nas três amostras, indicando que tais amostras contêm substâncias com funções químicas parecidas, levando-se em conta que os extratos são compostos por taninos condensados os quais são polímeros de unidades de flavan-3-ol.

A fração orgânica II apresenta menor intensidade na absorção por ser a mais diluída em relação às demais frações. É importante notar que a fração orgânica II tem perfil intermediário entre a fração aquosa e fração orgânica I indicando que parte dos compostos afins à fração aquosa começou a ser extraída na fase orgânica.

5.5.3 Otimização das condições cromatográficas

Para uma verificação individualizada do perfil de marcadores comuns para taninos, uma solução padrão de catequina 1 mg/mL em metanol, volume de injeção 1 μ L, foi injetada variando-se o pH da fase móvel (em torno de 2 a 6) para avaliação e determinação do menor fator de cauda possível. Os parâmetros cromatográficos obtidos em função da variação do pH da fase móvel são apresentados na Tabela 52.

Tabela 52 Parâmetros cromatográficos obtidos para catequina SQR 1 mg/mL em metanol, volume de injeção 1 μ L, em diferentes composições de fase móvel

| Fase móvel | Tempo de retenção (t_R) | Fator de retenção (k) | Fator de cauda (T) | pH aparente |
|--|-----------------------------|-----------------------|--------------------|-------------|
| Água:ACN (95:5) | 12,792 | 4,51 | 1,582 | 6,18 |
| Água-Ácido acético 0,001%:ACN (95:5) | 13,701 | 4,90 | 1,585 | 4,42 |
| Água-Ácido fosfórico 0,001%: ACN (95:5) | 12,835 | 4,53 | 1,688 | 3,96 |
| Água-Ácido fosfórico 0,01% : ACN (95:5) | 13,625 | 4,87 | 1,526 | 2,94 |
| Água-Ácido fosfórico 0,05% : ACN (95:5) | 12,488 | 4,38 | 1,516 | 2,38 |
| Água-Ácido fosfórico 0,075% : ACN (95:5) | 13,420 | 4,78 | 1,446 | 2,29 |
| Água-Ácido fosfórico 0,1% : ACN (95:5) | 13,703 | 4,90 | 1,449 | 2,14 |
| Água ultrapura | - | - | - | 6,57 |

Observa-se que os menores fatores de cauda foram obtidos com pH aparente entre 2,0 e 3,0, alcançado com solução de ácido fosfórico de no mínimo 0,075% (V/V) na fase aquosa. A melhoria na simetria do pico ocorreu devido à supressão da ionização das hidroxilas fenólicas dos taninos condensado. Esta faixa de pH está próxima ao limite de trabalho da coluna de fase ligada reduzindo-se o tempo de vida útil da mesma, entretanto, a redução do fator de cauda permite uma análise mais precisa e exata.

Como o método baseia-se em um gradiente linear, o pH aparente da fase móvel se altera ao longo da análise com a acidificação somente da fase aquosa, portanto, os dois componentes da fase móvel: aquoso e orgânico foram acidificados (ACN).

Também se avaliou a temperatura da coluna e o comprimento de onda para a detecção estabelecendo-se as condições cromatográficas finais, apresentadas na Tabela 53, utilizando-se soluções diluídas de extrato etanólico seco (1 mg/mL, em metanol 10% V/V). Em λ 210 nm houve maior sensibilidade na detecção uma vez que os taninos apresentam uma boa absorção neste comprimento de onda. O aumento de temperatura de 30 °C para 40 °C aprimorou o perfil cromatográfico aumentando-se a resolução entre os picos.

As condições estabelecidas na Tabela 53 também foram utilizadas para a validação do método. Para se avaliar a influência do perfil de uma solução branco, o procedimento foi realizado com a injeção dos solventes utilizados para a solubilização das soluções de extrato etanólico seco, nas mesmas condições de análise.

Tabela 53 Condições cromatográficas em gradiente otimizadas para análise de extratos de barbatimão

| Parâmetros | Condições |
|----------------------------------|---|
| Volumes de injeção | 10 μ L |
| Fase móvel | A:B (95:5) A: H ₃ PO ₄ 0,1% V/V em água B: H ₃ PO ₄ 0,1% V/V em ACN |
| Modo de eluição | Etapa 1: Gradiente B 5% a 40% por 60 min Etapa 2: Isocrático B 40% por 5 min Etapa 3: Gradiente B 40% a 5% por 10 min |
| Fluxo | 1 mL/min |
| Coluna | LiChroCART [®] 250x4 mm, LiChrospher [®] 100 RP-18, 5 μ m, Merck, lote 849117 |
| Temperatura da coluna | 40 °C |
| Comprimentos de onda de detecção | λ 210 nm com aquisição de espectros UV-VIS/DAD |
| Tempo de corrida | 60 min |

Foram injetadas, isoladamente e em conjunto, soluções das substâncias químicas de referência: ácido gálico, catequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina, galocatequina, proantocianidina B2 e quercetina demonstrando a resolução entre os picos e para determinação dos tempos de retenção.

Em seguida, foram injetadas soluções de extrato etanólico seco fortificadas de *S. adstringens* com os padrões: ácido gálico (AG), catequina (C), epigalocatequina (EGC), galato de epigalocatequina (GEGC), galocatequina (GC), proantocianidina B2 (P) e

quercetina (Q) (Figura 34). O volume de injeção 5 μ L foi utilizado nesta corrida para confirmação de melhor ajuste com a concentração das amostras. A concentração 1 mg/mL para as amostras com volume de injeção de 10 μ L foi considerada ideal.

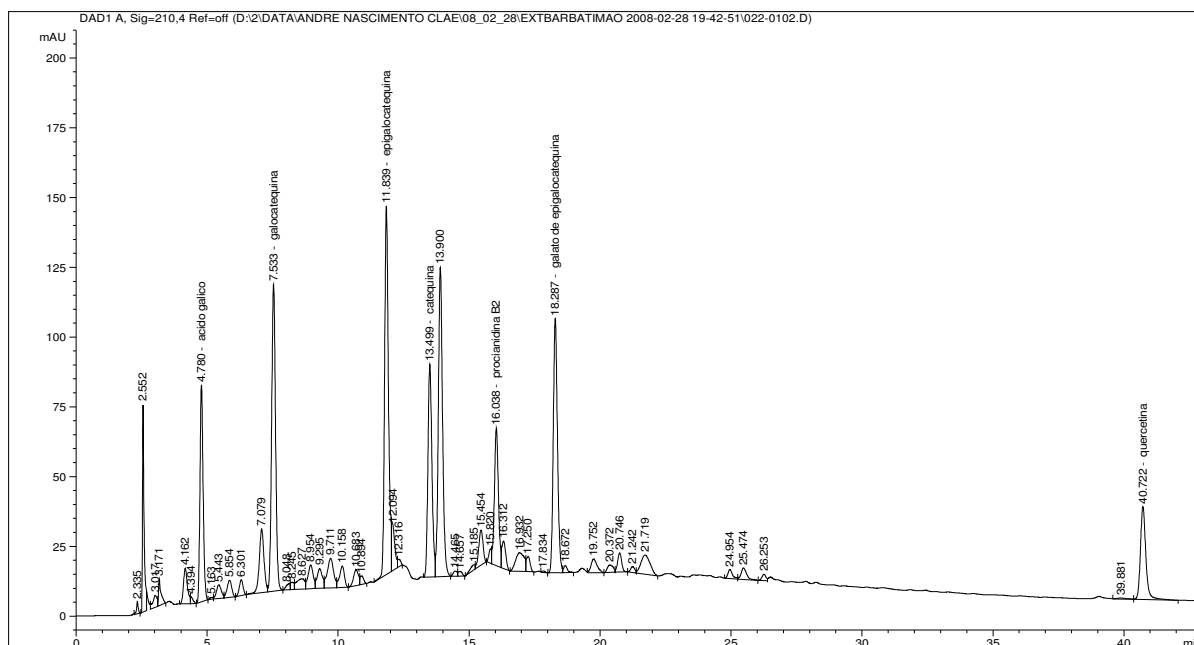


Figura 34 Cromatograma obtido por eluição em gradiente linear: 5% a 40% acetonitrila (ACN), 60 min, para o extrato etanólico seco de *S. adstringens* a 1 mg/mL em metanol 10% V/V; volume de injeção 5 μ L; fase móvel ACN:água (5:95) acidificados com ácido fosfórico 0,1% (V/V); fluxo 1 mL/min; 40 °C; detecção λ 210 nm. Amostra de partida 250 mg de extrato etanólico seco de *S. adstringens*.

Analisando-se o cromatograma da solução fortificada conclui-se que os extratos etanólicos secos de *S. adstringens* não possuem as substâncias de referência proantianidina B2 e quercetina em sua composição. Estes dados podem ser confirmados pela sobreposição do cromatograma da solução sem adição de padrão e após adição de padrões apresentados na Figura 35. Os demais padrões estão presentes no extrato etanólico seco, sendo que ácido gálico e catequina estão em concentração muito baixa em relação aos demais padrões. A epigalocatequina não apresentou resolução adequada nas condições de análise. Portanto, é possível quantificar somente a galocatequina e o galato de epigalocatequina no método desenvolvido por CLAE.

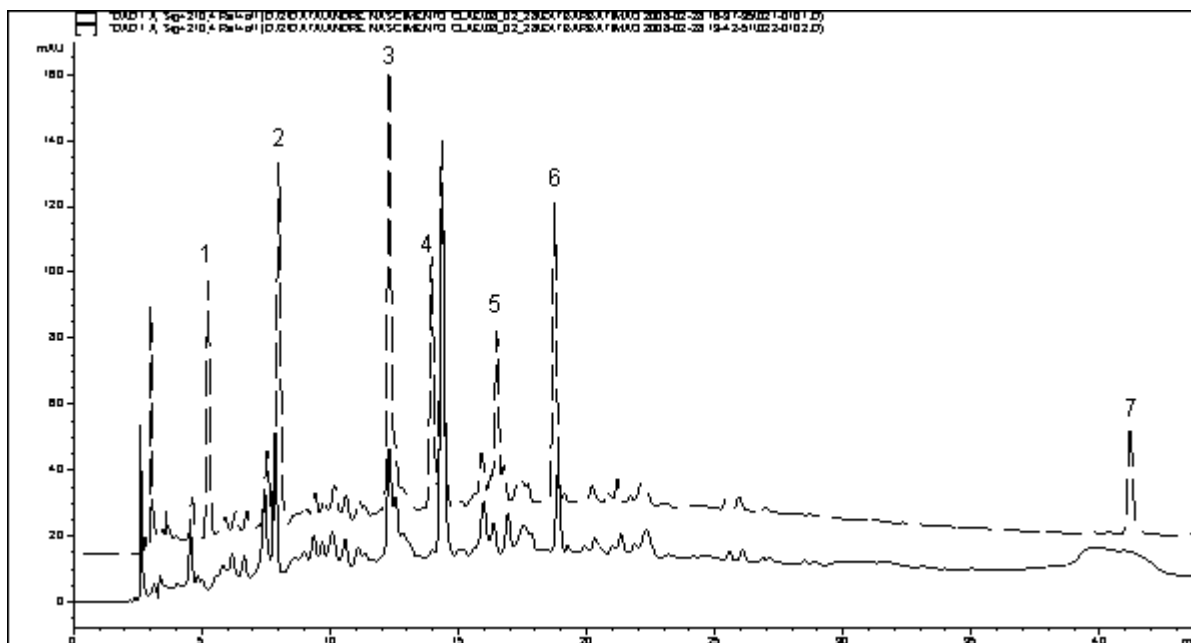


Figura 35 Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico seco de *S. adstringens* a 1 mg/mL em metanol 10% V/V; volume de injeção 5 μ L; sem adição de padrões (linha cheia) e após adição dos padrões (linha tracejada): (1) ácido gálico, (2) galocatequina, (3) epigalocatequina, (4) catequina, (5) proantocianidina B2, (6) galato de epigalocatequina e (7) quercetina.

É importante ressaltar a presença de um pico mais intenso no centro do cromatograma, com tempo de retenção próximo a 14 minutos. Não foi possível identificar este composto por meio dos padrões utilizados, entretanto, pode-se afirmar que se trata de um derivado de flavan-3-ol pela semelhança do espectro UV/DAD (pureza de pico de 99,17%) obtido em relação aos espectros dos demais padrões. Esforços estão sendo envidados pela equipe da Professora Rachel Oliveira Castilho do Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG no sentido de isolar e identificar tal substância para, futuramente, padronizar o extrato de barbatimão também em relação a este marcador.

5.5.4 Validação do método analítico por CLAE

O método analítico por CLAE para quantificação de galocatequina e galato de epigalocatequina nos extratos de barbatimão foi validado da mesma forma que o método por espectrofotometria na região ultravioleta (item 5.4.2).

Para a realização dos testes utilizou-se a fração orgânica do extrato etanólico seco da espécie *S. adstringens*. Após a validação do método, determinou-se também o teor

dos marcadores na fração orgânica do extrato etanólico seco obtido de cascas da espécie *S. obovatum*.

Para determinação do tempo morto (t_0), 5 μ L de solução de nitrato de sódio a 0,1% (p/V) solubilizado em fase móvel ACN:água (5:95) acidificada com ácido fosfórico 0,1% V/V foram injetados nas mesmas condições de análise.

5.5.4.1 Seletividade

Os marcadores químicos galocatequina e galato de epigalocatequina apresentaram valores de pureza de pico maiores do que 99,0% nas análises (Tabela 54). Tal parâmetro foi obtido pelo programa computacional do cromatógrafo *HPChemStation for LC 3D Systems software* Rev. B.02.01-SR2[260] 2001-2006.

A seletividade também foi avaliada pela eficiência da separação da condição cromatográfica estabelecida através dos parâmetros de conformidade do sistema (resolução, R; fator de retenção, k; fator de cauda, T; número de pratos teóricos, N) para os picos dos marcadores químicos, apresentados na Tabela 54. O cromatograma dos padrões reunidos e os espectros obtidos no detector UV/DAD para proantocianidina B2 e quercetina são apresentados na Figura 36. Os espectros na região ultravioleta dos demais padrões foram apresentados na Figura 24 (item 5.4.1).

Tabela 54 Resultados dos parâmetros cromatográficos obtidos para os padrões reunidos em solução por CLAE

| Marcador químico | Tempo de retenção (min) | Fator de retenção (k) | Fator de cauda (T) | Resolução (R) ^a | Nº de pratos/coluna (N) | Pureza de pico (%) |
|------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------|
| AG | 4,960 | 1,14 | 1,295 | - | 13.634 | 98,58 |
| GC | 7,749 | 2,34 | 1,236 | 14,745 | 22.272 | 100,00 |
| EGC | 12,062 | 4,19 | 1,197 | 20,180 | 48.523 | 100,00 |
| C | 13,722 | 4,91 | 1,198 | 7,210 | 51.980 | 99,89 |
| P | 16,254 | 6,00 | 1,155 | 10,199 | 65.051 | 99,90 |
| GEGC | 18,514 | 5,68 | 1,200 | 8,756 | 80.772 | 99,88 |
| Q | 40,806 | 16,57 | 1,223 | 75,555 | 246.798 | 99,35 |

a: A resolução foi calculada em relação ao pico precedente.

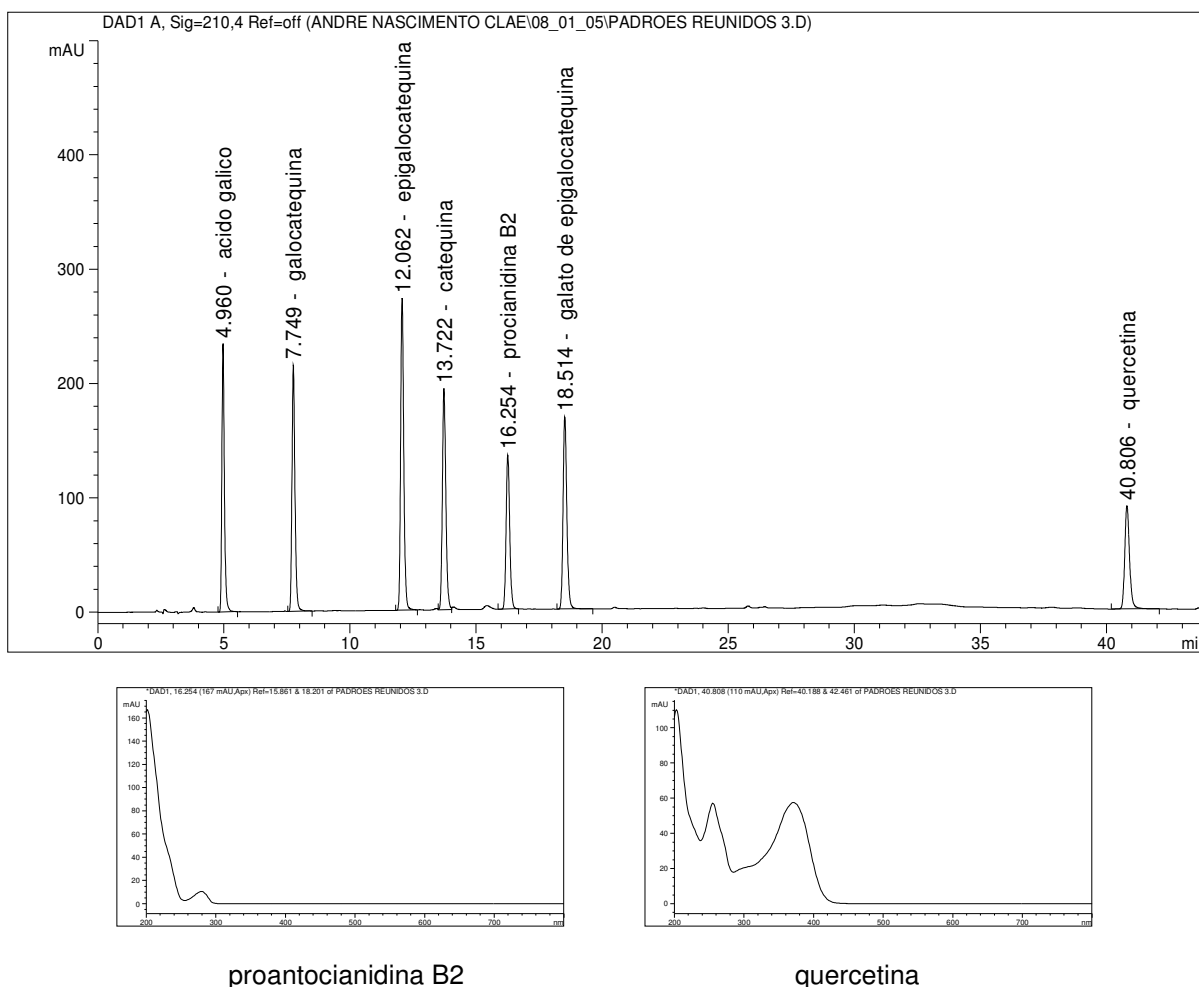


Figura 36 Cromatograma dos padrões reunidos em solução (0,1 mg/mL cada em metanol, volume de injeção 2 μ L) e espectros ultravioleta de proantocianidina B2 e quercetina.

5.5.4.2 Linearidade

Foram construídas duas curvas analíticas, em dois dias diferentes, para galocatequina SQR e para galato de epigalocatequina SQR, a partir de seis concentrações diferentes, cada uma em triplicata. As curvas obtidas demonstraram relação linear entre a massa do padrão injetado (ng) e o valor da área do pico, na faixa 30 a 330 ng, para os dois marcadores, correspondendo de 20 a 220% da concentração de trabalho.

As Tabelas 55 e 56 apresentam os valores de massa injetada e suas respectivas áreas para avaliação da linearidade. As curvas foram construídas plotando-se a massa injetada de cada marcador *versus* a respectiva área do pico. Os dados foram submetidos à análise de regressão linear.

As Figuras 37 e 39 representam as curvas analíticas obtidas com galocatequina SQR e com galato de epigalocatequina SQR, respectivamente.

Tabela 55 Resultados obtidos para a construção das curvas analíticas para determinação de galocatequina por CLAE.

| Solução | Replicata | Massa injetada (ng) | Curva analítica - Dia 1 | | Curva analítica - Dia 2 | |
|---------|-----------|---------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| | | | Área (GC) | Média (d.p.) DPR % | Área (GC) | Média (d.p.) DPR% |
| 1 | 1 | 30,0 | 482,86 | 483,42 (2,28) 0,47% | 485,7 | 484,8 (3,4) 0,70% |
| | 2 | 30,0 | 481,47 | | 481,1 | |
| | 3 | 30,0 | 485,93 | | 487,7 | |
| 2 | 1 | 90,0 | 1450,86 | 1449,71 (3,75) 0,26% | 1465,1 | 1461,7 (3,6) 0,24% |
| | 2 | 90,0 | 1445,51 | | 1462,0 | |
| | 3 | 90,0 | 1452,74 | | 1458,0 | |
| 3 | 1 | 150,0 | 2402,91 | 2394,52 (7,27) 0,30% | 2423,9 | 2415,4 (7,9) 0,33% |
| | 2 | 150,0 | 2389,94 | | 2408,2 | |
| | 3 | 150,0 | 2390,73 | | 2414,2 | |
| 4 | 1 | 210,0 | 3364,38 | 3330,66 (56,95) 1,71% | 3387,5 | 3353,6 (55,7) 1,66% |
| | 2 | 210,0 | 3264,91 | | 3289,3 | |
| | 3 | 210,0 | 3362,69 | | 3384,2 | |
| 5 | 1 | 270,0 | 4353,97 | 4352,65 (15,20) 0,35% | 4396,7 | 4395,3 (15,3) 0,35% |
| | 2 | 270,0 | 4367,15 | | 4410,0 | |
| | 3 | 270,0 | 4336,83 | | 4379,4 | |
| 6 | 1 | 330,0 | 5317,61 | 5288,46 (26,28) 0,50% | 5357,0 | 5329,6 (25,0) 0,47% |
| | 2 | 330,0 | 5281,16 | | 5323,5 | |
| | 3 | 330,0 | 5266,59 | | 5308,1 | |

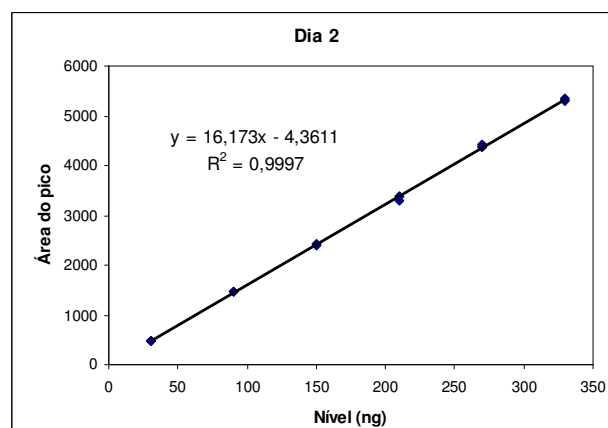
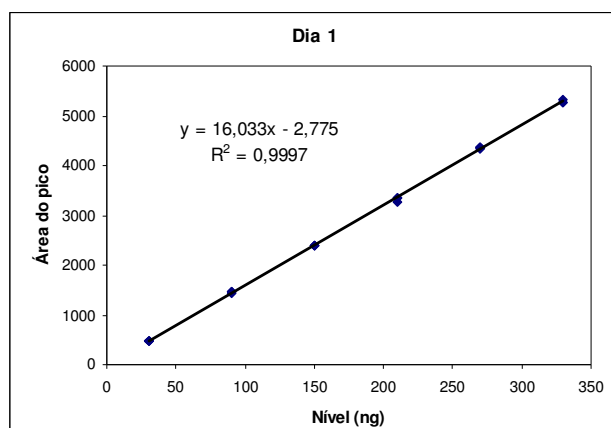


Figura 37 Curvas analíticas obtidas em dois dias diferentes por CLAE para galocatequina.

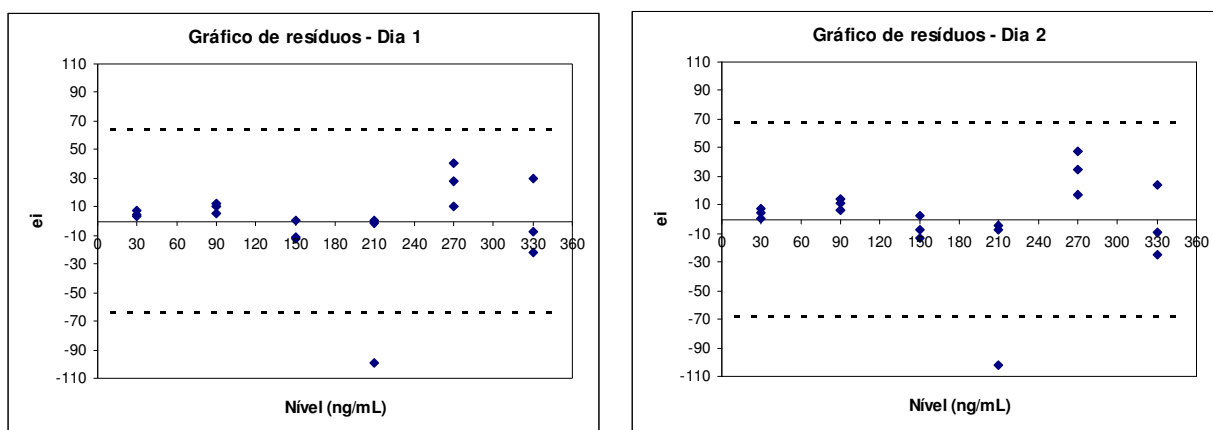
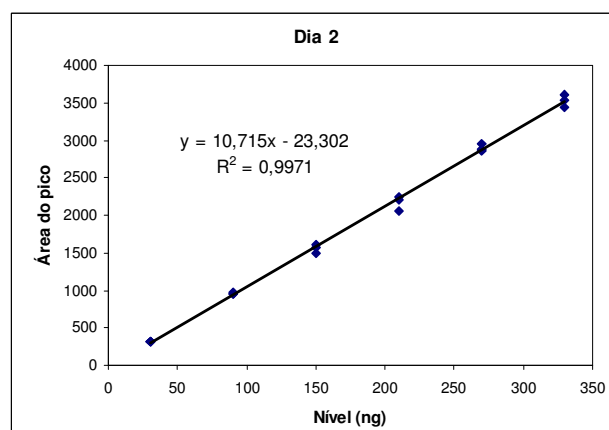
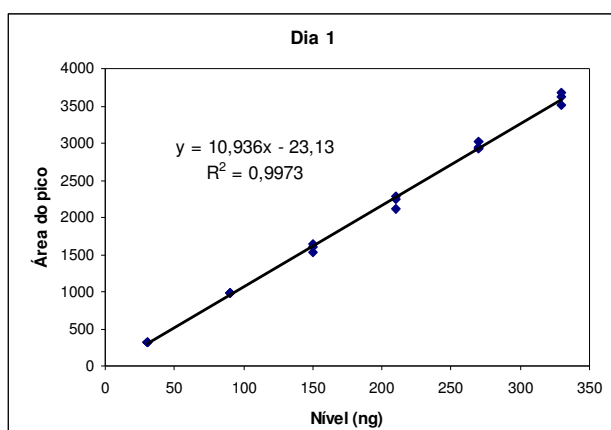


Figura 38 Distribuição dos resíduos das curvas analíticas (dia 1 e dia 2) para a determinação de galocatequina por CLAE.

Na análise estatística das curvas analíticas para galocatequina, os resíduos possuem distribuição aleatória como pode ser visto na Figura 38. A regressão é significativa, tanto para a primeira curva ($p = 1,22 \times 10^{-29} < 0,001$) quanto para a segunda curva analítica ($p = 2,74 \times 10^{-29} p < 0,001$). Os coeficientes de correlação (r) foram maiores que 0,99 (0,9998) e as interseções com o eixo das abscissas não foram estatisticamente diferentes de zero, para ambas as curvas. Obteve-se para a primeira curva, desvio padrão relativo de 1,04%, erro padrão da inclinação de 0,0692 e erro padrão do intercepto de 14,3314. Já para a segunda curva, o desvio padrão relativo foi 1,10%, o erro padrão da inclinação foi 0,0734 e o erro padrão do intercepto foi 15,2065. Os resultados obtidos indicam linearidade adequada para o método por CLAE para determinação de galocatequina, conforme RE 899/03 da ANVISA.

Tabela 56 Resultados obtidos para a construção da curva analítica para galato de epigallocatequina por CLAE

| Solução | Replicata | Massa injetada (ng) | Curva analítica - Dia 1 | | Curva analítica - Dia 2 | |
|---------|-----------|---------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | | | Área (GEGC) | Média (d.p.) DPR% | Área (GEGC) | Média (d.p.) DPR% |
| 1 | 1 | 30,0 | 327,12 | 321,57 (4,89) 1,52% | 321,00 | 314,97 (5,23) 1,66% |
| | 2 | 30,0 | 319,70 | | 311,95 | |
| | 3 | 30,0 | 317,89 | | 311,95 | |
| 2 | 1 | 90,0 | 982,26 | 977,94 (3,74) 0,38% | 963,90 | 958,03 (5,09) 0,53% |
| | 2 | 90,0 | 975,64 | | 955,34 | |
| | 3 | 90,0 | 975,94 | | 954,85 | |
| 3 | 1 | 150,0 | 1644,61 | 1593,35 (60,98) 3,83% | 1610,62 | 1561,90 (59,41) 3,80% |
| | 2 | 150,0 | 1525,91 | | 1495,72 | |
| | 3 | 150,0 | 1609,52 | | 1579,34 | |
| 4 | 1 | 210,0 | 2247,72 | 2218,31 (90,57) 4,08% | 2198,43 | 2166,09 (97,09) 4,48% |
| | 2 | 210,0 | 2116,69 | | 2056,96 | |
| | 3 | 210,0 | 2290,53 | | 2242,89 | |
| 5 | 1 | 270,0 | 2942,66 | 2960,50 (50,92) 1,72% | 2887,65 | 2905,16 (49,97) 1,72% |
| | 2 | 270,0 | 3017,94 | | 2961,53 | |
| | 3 | 270,0 | 2920,90 | | 2866,31 | |
| 6 | 1 | 330,0 | 3679,10 | 3600,00 (86,54) 2,40% | 3604,92 | 3526,09 (85,43) 2,42% |
| | 2 | 330,0 | 3613,33 | | 3538,02 | |
| | 3 | 330,0 | 3507,57 | | 3435,32 | |

**Figura 39** Curvas analíticas obtidas em dois dias diferentes por CLAE para galato de epigallocatequina.

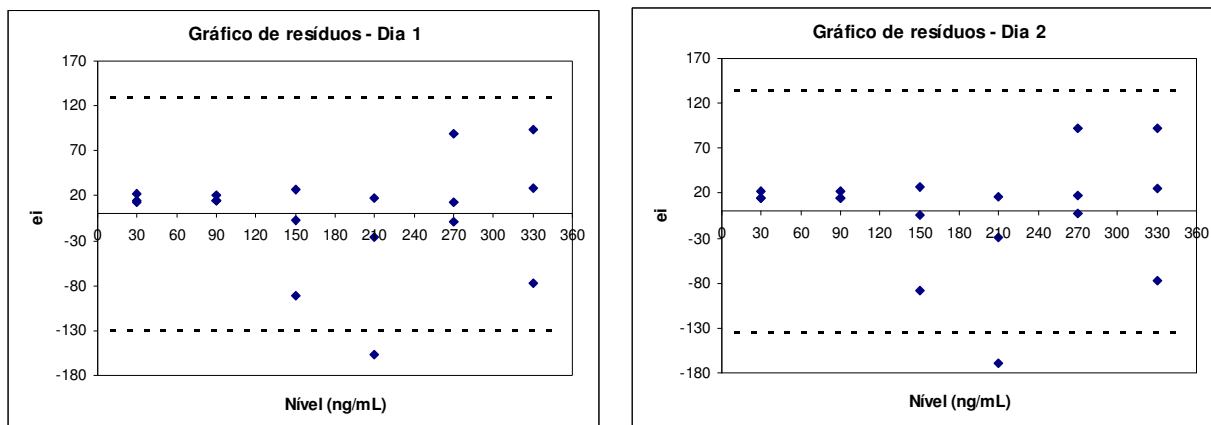


Figura 40 Distribuição dos resíduos das curvas analíticas (dia 1 e dia 2) para a determinação de galato de epigallocatequina por CLAE.

Na análise estatística da curva analítica para determinação de galato de galocatequina os resíduos apresentaram distribuição aleatória como pode ser visto na Figura 40.

A primeira curva analítica apresentou regressão significativa ($p = 4,79 \times 10^{-22} < 0,001$) e o coeficiente de correlação (r) foi maior que 0,99 (0,9986). A interseção com o eixo das abscissas não foi estatisticamente diferente de zero. O desvio padrão relativo da curva foi 3,15%, o erro padrão da inclinação foi 0,1409 e o erro padrão do intercepto foi 29,1917.

Com relação à segunda curva analítica, também se verificou que a regressão é significativa ($p = 1,12 \times 10^{-21} < 0,001$) e o e o coeficiente de correlação (r) foi maior que 0,99 (0,9985). A interseção com o eixo das abscissas também não foi estatisticamente diferente de zero. O desvio padrão relativo da curva foi 3,32%, o erro padrão da inclinação foi 0,1457 e o erro padrão do intercepto foi 30,1694.

As curvas analíticas obtidas apresentaram baixo valor de intercepto, o que demonstra que o erro inerente ao método é significativamente baixo. Apesar dos valores de desvio padrão relativo serem maiores que 2,0%, os resultados obtidos indicam que o método por CLAE para determinação de galato de epigallocatequina apresenta linearidade adequada, considerando uma matriz vegetal.

As curvas analíticas obtidas para os dois marcadores químicos, nos dois dias diferentes, foram comparadas pelo teste de coincidência das retas utilizando-se o programa GraphPad Prism[®] versão 4.00 e não houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas obtidas no dia 1 e no dia 2 de análise.

5.5.4.3 Precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio

Os valores obtidos para os teores de galocatequina e de galato de epigalocatequina por CLAE, para avaliar a precisão intra-corrída são apresentados na Tabela 57.

Tabela 57 Teores de galocatequina (GC) e de galato de epigalocatequina (GEGC) obtidos para precisão intra-corrída

| Amostra | Teor GC (%) | Teor EGCG (%) |
|---------|-------------|---------------|
| 1 | 1,31 | 1,35 |
| 2 | 1,33 | 1,32 |
| 3 | 1,34 | 1,36 |
| 4 | 1,33 | 1,33 |
| 5 | 1,30 | 1,33 |
| 6 | 1,28 | 1,35 |
| Média | 1,31 | 1,34 |
| d.p. | 0,02 | 0,01 |
| DPR (%) | 1,86 | 1,10 |

O valor de desvio padrão relativo de 1,86% e de 1,10% para a galocatequina e para o galato de epigalocatequina respectivamente, indicam que o método por CLAE apresenta precisão intra-corrída adequada (valores abaixo de 5%).

A precisão inter-corrída foi avaliada por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho, em dois dias diferentes, com o mesmo analista, e em dois dias diferentes com analistas diferentes. Os valores obtidos são apresentados nas Tabelas 58 e 59.

Tabela 58 Teores de galocatequina (GC) e de galato de epigalocatequina (GEGC) obtidos para precisão inter-corrida com mesmo analista.

| Amostra | Teor GC (%) | Teor EGCG (%) | |
|---------|-------------|---------------|------|
| Dia 1 | 1 | 1,31 | 1,35 |
| | 2 | 1,33 | 1,32 |
| | 3 | 1,34 | 1,36 |
| | 4 | 1,33 | 1,33 |
| | 5 | 1,30 | 1,33 |
| | 6 | 1,28 | 1,35 |
| Dia 2 | 7 | 1,33 | 1,33 |
| | 8 | 1,28 | 1,35 |
| | 9 | 1,31 | 1,36 |
| | 10 | 1,28 | 1,35 |
| | 11 | 1,28 | 1,29 |
| | 12 | 1,30 | 1,24 |
| Média | 1,31 | 1,33 | |
| d.p. | 0,02 | 0,03 | |
| DPR (%) | 1,76 | 2,62 | |

Os valores de desvio padrão relativo encontrados de 1,76% e 2,62% para a galocatequina e para o galato de epigalocatequina, respectivamente, para as 12 determinações (abaixo de 5,0%) indicam que o método por CLAE apresenta precisão inter-corrida adequada com o mesmo analista.

Tabela 59 Teores de galocatequina (GC) e de galato de epigalocatequina (GEGC) obtidos para precisão inter-corrída com analistas diferentes.

| Amostra | Teor GC (%) | Teor EGCG (%) | |
|---------|-------------|---------------|------|
| Dia 1 | 1 | 1,31 | 1,35 |
| | 2 | 1,33 | 1,32 |
| | 3 | 1,34 | 1,36 |
| | 4 | 1,33 | 1,33 |
| | 5 | 1,30 | 1,33 |
| | 6 | 1,28 | 1,35 |
| Dia 2 | 7 | 1,38 | 1,36 |
| | 8 | 1,43 | 1,30 |
| | 9 | 1,48 | 1,29 |
| | 10 | 1,44 | 1,24 |
| | 11 | 1,44 | 1,28 |
| | 12 | 1,45 | 1,31 |
| Média | 1,38 | 1,32 | |
| d.p. | 0,07 | 0,04 | |
| DPR (%) | 5,22 | 2,77 | |

O valor de desvio padrão relativo encontrado de 2,77% para galato de epigalocatequina para as 12 determinações (abaixo de 5,0%) indica que o método por CLAE apresenta precisão inter-corrída adequada para determinação deste marcador químico com analistas diferentes.

Com relação à galocatequina, o valor de desvio padrão obtido de 5,22%, acima de 5,0%, indica que o método por CLAE, para quantificação deste marcador químico, não apresenta precisão inter-corrída adequada para métodos analíticos, de acordo com a RE nº 899/03 da ANVISA. Entretanto, a exemplo da validação dos métodos bioanalíticos da mesma resolução permite-se um DPR até 15%. Assim, devido à natureza da amostra cuja matriz é complexa aliada à dificuldade de análise dos taninos por CLAE, pode-se considerar aceitável este valor de DPR para precisão inter-corrída nas análises cromatográficas.

5.5.4.4 Exatidão

Os resultados obtidos para exatidão de galocatequina e de galato de epigalocatequina adicionados antes e após o processo de pré-purificação são apresentados nas Tabelas 60 e 61, respectivamente.

Tabela 60 Resultados de exatidão para quantificação de GC e de GEGC, adicionados antes do processo de pré-purificação, em amostras de extrato etanólico seco de *S. adstringens* por CLAE

| Padrão | Nível ^a | n | Teor da amostra (%) | | Teor do Padrão (%) | Recuperação (%) | Média (%) (d.p.) | DPR (%) |
|-------------------------------------|--------------------|---|---------------------|-----------------|--------------------|----------------------|------------------|---------|
| | | | Fortificada | Não fortificada | | | | |
| Galocatequina | Alto (137%) | 1 | 2,0400 | | | 69,15 | 70,06 (2,10) | 3,00 |
| | | 2 | 2,0309 | 0,9830 | 1,5284 | 68,56 | | |
| | | 3 | 2,0905 | | | 72,46 | | |
| | Médio (111%) | 1 | 1,6140 | | | 62,46 | 67,94 (4,80) | 7,07 |
| | | 2 | 1,6893 | 0,9830 | 1,0101 | 69,92 | | |
| | | 3 | 1,7045 | | | 71,43 | | |
| | Baixo (93%) | 1 | 1,3814 | | | 94,33 | 97,75 (3,31) | 3,39 |
| | | 2 | 1,3967 | 0,9830 | 0,4223 | 97,96 | | |
| | | 3 | 1,4094 | | | 100,95 | | |
| Recuperação média (%) (d.p.) | | | | | | 78,58 (14,73) | | |
| DPR (%) | | | | | | 18,75 | | |
| Galato de epigalocatequina | Alto (253%) | 1 | 3,7458 | | | 97,13 | 99,34 (2,10) | 2,11 |
| | | 2 | 3,8502 | 1,3186 | 2,4990 | 101,31 | | |
| | | 3 | 3,8075 | | | 99,60 | | |
| | Médio (196%) | 1 | 2,9257 | | | 101,47 | 102,79 (1,15) | 1,12 |
| | | 2 | 2,9551 | 1,3186 | 1,5838 | 103,32 | | |
| | | 3 | 2,9590 | | | 103,57 | | |
| | Baixo (134%) | 1 | 1,9949 | | | 101,66 | 103,39 (1,53) | 1,48 |
| | | 2 | 2,0140 | 1,3186 | 0,6653 | 104,53 | | |
| | | 3 | 2,0105 | | | 104,00 | | |
| Recuperação média (%) (d.p.) | | | | | | 101,84 (2,37) | | |
| DPR (%) | | | | | | 2,32 | | |

a: valor experimental.

Os baixos valores de recuperação média para a galocatequina, antes (78,58%) e após (76,50%, Tabela 61) o processo de purificação, podem indicar uma possível degradação durante a execução das análises.

Fatores como a exposição à luz e a temperatura podem ter favorecido a degradação deste marcador químico no processo de purificação, a exemplo de outros flavan-3-óis (FRIEDMAN, 2000; CHEN *et al.*, 2001; SU *et al.* 2003; SUZUKI *et al.*, 2003; WANG, 2006; YANG, 2007; WANG, 2008).

O valor médio de desvio padrão relativo para recuperação de galocatequina antes da purificação (18,75%) indica presença de fonte de variação sistemática no método, tais como perdas, manuseio de quantidades pequenas de amostras, ou substâncias que possam comprometer a resolução da galocatequina provenientes de matrizes complexas. Entretanto,

o valor de desvio padrão relativo obtido (4,53%) para a recuperação média deste marcador após processo de pré-purificação foi menor que 5,0%, indicando precisão adequada da análise, conforme RE nº 899/2003 da ANVISA.

De acordo com esta resolução, no item Recuperação para Validação de Métodos Bioanalíticos, porcentagens de recuperação do analito próximas a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa. Portanto, os valores de recuperação e de DPR para galocatequina indicam que o método por CLAE desenvolvido apresenta exatidão satisfatória.

Contudo, estudos adicionais podem ser conduzidos para confirmação da exatidão do método por CLAE para galocatequina em amostras de extrato de barbatimão.

Tabela 61 Resultados de exatidão para quantificação de GC e de GEGC, adicionados após o processo de pré-purificação, em amostras de fração orgânica de extrato etanólico seco de *S. adstringens* por CLAE

| Padrão | Nível ^a | n | Conc. da amostra (µg/mL) | | Conc. do padrão (µg/mL) | Recuperação (%) | Média (%) (d.p.) | DPR (%) |
|----------------------------|--------------------|---|--------------------------|-----------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------|---------|
| | | | Fortificada | Não fortificada | | | | |
| Galocatequina | Alto (87%) | 1 | 13,071 | | | 75,65 | | |
| | | 2 | 13,050 | 2,763 | 13,627 | 75,49 | 75,81 (0,43) | 0,57 |
| | | 3 | 13,161 | | | 76,30 | | |
| | Médio (56%) | 1 | 8,592 | | | 77,00 | | |
| | | 2 | 8,663 | 2,763 | 7,571 | 77,94 | 74,73 (4,77) | 6,38 |
| | | 3 | 8,006 | | | 69,26 | | |
| | Baixo (26%) | 1 | 4,011 | | | 82,44 | | |
| | | 2 | 3,913 | 2,763 | 1,514 | 75,97 | 78,95 (3,26) | 4,13 |
| | | 3 | 3,950 | | | 78,45 | | |
| | | | | | | Recuperação média (%) (d.p.) | 76,50 (3,46) | |
| | | | | | | DPR (%) | 4,53 | |
| Galato de epigalocatequina | Alto (123%) | 1 | 18,420 | | | 103,00 | | |
| | | 2 | 18,576 | 3,229 | 14,749 | 104,06 | 103,24 (0,72) | 0,70 |
| | | 3 | 18,372 | | | 102,67 | | |
| | Médio (88%) | 1 | 11,766 | | | 104,19 | | |
| | | 2 | 11,820 | 3,229 | 8,194 | 104,84 | 103,91 (1,09) | 1,05 |
| | | 3 | 11,645 | | | 102,71 | | |
| | Baixo (33%) | 1 | 4,931 | | | 103,85 | | |
| | | 2 | 4,966 | 3,229 | 1,639 | 106,00 | 107,78 (5,06) | 4,70 |
| | | 3 | 5,089 | | | 113,49 | | |
| | | | | | | Recuperação média (%) (d.p.) | 104,98 (3,37) | |
| | | | | | | DPR (%) | 3,21 | |

a: valor experimental.

Os valores de porcentagem de recuperação para galato de epigallocatequina próximos a 100,0% e os baixos valores obtidos para os desvios padrão relativos, nos dois experimentos, antes e após a purificação, indicam que o método por CLAE desenvolvido apresenta exatidão adequada para quantificação deste marcador químico.

Os níveis de concentração avaliados abrangem uma faixa ampla dentro do intervalo de linearidade estudada levando-se em conta a natureza complexa da matriz vegetal analisada.

5.5.4.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O valor encontrado para o desvio padrão do intercepto da curva analítica do dia 1, para galocatequina, foi 14,3314 e o valor de inclinação da mesma curva foi 16,0334. Para a curva analítica do dia 2 o desvio padrão do intercepto foi 15,2065 e o valor de inclinação foi 16,1728.

Já para a curva analítica do dia 1, para galato de epigallocatequina, o desvio padrão do intercepto foi 29,1917 e o valor de inclinação da mesma curva foi 10,9356. A curva analítica do dia 2 apresentou o desvio padrão do intercepto 30,1694 e o valor de inclinação 10,7149.

Aplicando-se a fórmula preconizada pelo Guia do ICH de Validação de Procedimentos Analíticos (INTERNATIONAL, 2005) como descrito no item 4.2.7.3.5, obtiveram-se os valores para os limites de detecção e quantificação apresentados na Tabela 62.

Tabela 62 Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os marcadores químicos analisados estimados pelas curvas analíticas.

| Marcador químico | LD pela curva analítica (ng) | | LQ pela curva analítica (ng) | |
|------------------|------------------------------|-------|------------------------------|-------|
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 1 | Dia 2 |
| GC | 2,95 | 3,10 | 8,94 | 9,40 |
| GEGC | 8,81 | 9,29 | 26,69 | 28,16 |

De acordo com os resultados de LD e LQ, verifica-se que os valores calculados a partir da primeira curva analítica são muito próximos aos estimados pela segunda curva analítica, sendo que os resultados do dia 2 são maiores.

De forma semelhante à descrita para a espectrofotometria na região ultravioleta sugere-se determinar tais parâmetros por procedimento analítico com diluições sucessivas a

partir de soluções nas concentrações estimadas até obtenção da relação sinal/ruído 3 e 10, para LD e LQ, respectivamente.

5.5.4.6 Robustez

Os resultados dos teores de galocatequina e de galato de epigalocatequina para cada condição avaliada, incluindo as médias, desvios padrão relativos e respectivos coeficientes de variação são apresentados na Tabela 63.

Tabela 63 Resultados das determinações de marcadores químicos na fração orgânica de extrato etanólico seco de *S. adstringens* para avaliação da robustez do método por CLAE

| Marcador | Amostra | Teor de marcadores químicos | | | |
|----------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | Condição usual ^a | Coluna Agilent ^b | 4,8% a 41,0% ACN 60' | 5,2% a 39,0% ACN 60' |
| Galocatequina | 1 | 1,28 | 1,19 | 1,31 | 1,23 |
| | 2 | 1,25 | 1,30 | 1,27 | 1,26 |
| | 3 | 1,24 | 1,25 | 1,26 | 1,26 |
| | 4 | 1,22 | 1,24 | 1,24 | 1,25 |
| | 5 | 1,25 | 1,24 | 1,28 | 1,25 |
| | 6 | 1,24 | 1,23 | 1,28 | 1,23 |
| | Média (d.p.) | 1,25 (0,02) | 1,24 (0,04) | 1,27 (0,02) | 1,24 (0,01) |
| | DPR (%) | 1,50 | 2,83 | 1,87 | 1,07 |
| | Avaliação ^c | a | a | a | a |
| Galato de epigalocatequina | 1 | 1,33 | 1,27 | 1,51 | 1,27 |
| | 2 | 1,35 | 1,29 | 1,48 | 1,32 |
| | 3 | 1,36 | 1,29 | 1,48 | 1,31 |
| | 4 | 1,35 | 1,28 | 1,44 | 1,31 |
| | 5 | 1,29 | 1,28 | 1,46 | 1,31 |
| | 6 | 1,24 | 1,27 | 1,46 | 1,23 |
| | Média (d.p.) | 1,32 (0,05) | 1,28 (0,01) | 1,47 (0,02) | 1,29 (0,03) |
| | DPR (%) | 3,59 | 0,69 | 1,60 | 2,64 |
| | Avaliação ^c | b | b | c | b |

a: Etapa 1 gradiente 5%-40% ACN 60'; coluna LiChroCART[®] 250x4 mm, LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 µm, Merck

b: Coluna Zorbax[®] Eclipse XDB-C18, 250x4,6 mm, 5 µm, Agilent

c: Letras iguais indicam médias equivalentes (Teste de Tukey)

A comparação das médias de teor para galocatequina, por ANOVA, demonstrou que as médias amostrais não diferem entre si, num nível de significância de 5%, para todas as condições analisadas, uma vez que F calculado (1,77) é menor do que F crítico (3,10). O teste de Tukey confirmou esta hipótese, conforme apresentado na Tabela 63.

Já para o marcador galato de epigalocatequina, a comparação das médias de teor, por ANOVA, demonstrou que existe pelo menos uma média diferente das demais ($F_{\text{calculado}} = 46,16 > F_{\text{crítico}} = 3,10$). Pelo teste de Tukey pode-se avaliar que a condição usual de análise não é estatisticamente diferente da condição utilizando coluna cromatográfica de marca diferente (Agilent) e da condição com inclinação do gradiente de 5,2% a 39,0% de acetonitrila em 60 minutos. Estas condições analíticas são estatisticamente diferentes da condição com a inclinação do gradiente de 4,8% a 41,0% de acetonitrila em 60 minutos, conforme demonstrado na Tabela 63. Isto evidencia que esta condição analítica é crítica para marcadores com tempo de eluição maior.

Portanto, o método desenvolvido mostrou-se robusto para todas as condições avaliadas na determinação de galocatequina. Entretanto, para a determinação de galato de epigalocatequina, o método também se apresentou robusto para as condições avaliadas, exceto para a condição com inclinação de gradiente de 4,8% a 41,0% de acetonitrila em 60 minutos.

5.5.5 Doseamento do extrato de *S. obovatum* por CLAE

Realizou-se o doseamento da fração orgânica do extrato de *S. obovatum*. Os teores médios encontrados foram 1,22% para galocatequina e 1,42% para galato de epigalocatequina. Para a espécie *S. adstringens* os teores médios encontrados foram 1,35% para galocatequina e 1,32% para galato de epigalocatequina.

Nas duas espécies, os marcadores químicos estão presentes na fração orgânica, variando-se somente a concentração dos mesmos.

6 CONCLUSÕES

Os ensaios farmacopeicos para a droga vegetal e para os extratos mostraram-se úteis na identificação da espécie *Stryphnodendron adstringens* e no controle de qualidade farmacognóstico das cascas de barbatimão e de seus derivados.

A cromatografia em camada delgada foi adequada para a identificação dos marcadores químicos, presentes nos extratos das cascas de barbatimão, permitindo a identificação da espécie botânica pelo perfil cromatográfico obtido.

Os métodos farmacopeicos de doseamento da droga vegetal e dos extratos de barbatimão por espectrofotometria na região do visível, (Folin-Denis, λ 715 nm e Folin-Ciocalteu, λ 760 nm), são precisos, seletivos e apresentam linearidade adequada, entretanto, são de difícil execução e geram grandes quantidades de resíduos químicos contendo metais pesados.

O método de doseamento proposto por espectrofotometria na região do ultravioleta (λ 272 nm) apresentou-se adequado ao controle de qualidade da droga vegetal e dos extratos de barbatimão. Além disto, demonstrou ser uma técnica de fácil execução, com custo menor e gerar menos resíduos tóxicos do que os métodos oficiais.

O método de doseamento proposto por espectrofotometria na região do ultravioleta (λ 272 nm) apresentou linearidade, precisão, exatidão e especificidade adequadas para a análise de taninos totais. Entretanto, não se apresentou robusto às variações nas condições analíticas estudadas, demonstrando que o tempo de agitação das amostras com o pó-de-pele é crítico para a realização desta análise e deve ser mantido em uma faixa estreita.

O estudo comparativo entre os métodos espectrofotométricos oficiais na região do visível e o método desenvolvido por UV demonstrou que este último não é estatisticamente diferente do método Folin-Denis, podendo ser uma alternativa viável para determinação de taninos totais em amostras vegetais e seus derivados em análises de rotina. Entretanto, estes dois métodos apresentaram-se estatisticamente diferentes do método Folin-Ciocalteu.

O doseamento de taninos totais da droga vegetal por UV apresentou teor acima de 8,0% p/p, valor preconizado pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição, de acordo com a especificação. O extrato glicólico de barbatimão apresentou teor de taninos totais menor que o teor obtido para os extratos etanólicos secos, indicando que este último é mais adequado para o desenvolvimento tecnológico de produtos acabados.

O método de pré-purificação de insumos e produtos vegetais contendo taninos para a análise cromatográfica (CLAE) possibilitou a separação, identificação e quantificação de

marcadores químicos específicos de taninos em um tempo de corrida adequado para análises de rotina.

O método por CLAE, em fase reversa, com detecção UV (λ 210 nm) desenvolvido para quantificação de galocatequina (GC) e de galato de epigalocatequina (GEGC), marcadores presentes nos extratos de barbatimão, apresentou seletividade, linearidade, precisão e exatidão satisfatórias. O método apresentou-se robusto para GC e para GEGC.

As amostras de extratos da espécie *S. obovatum* analisadas apresentaram perfis cromatográficos semelhantes às de *S. adstringens*. Isso indica uma composição química semelhante entre elas demonstrando que as duas espécies podem ser usadas como sucedâneas.

O estudo permitiu o desenvolvimento de método extrativo-analítico para determinação de taninos em insumos e produtos vegetais o que possibilita a padronização de extratos de barbatimão e garante a obtenção de fitoterápicos seguros e eficazes. Além disso, o método por CLAE desenvolvido permite a análise específica de taninos utilizando os monômeros (marcadores) característicos e não de fenóis totais, conforme métodos oficiais.

REFERÊNCIAS

ADAMOVICS, J. A.; ESCHBACH, J. C. Planar chromatography. In: ADAMOVICS, J. A. (Ed.) **Chromatographic analysis of pharmaceuticals**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 57-77.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira. **Guia para a Redação das Monografias da Farmacopéia Brasileira Quinta Edição**. Belo Horizonte, 2005. 83 p.

ALICE, C. B. *et al.* **Plantas medicinais de uso popular, Atlas farmacognóstico**. Canoas: Ulbra, 1995. 205 p.

ARDISSON, L. *et al.* Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 27-34, 2002.

AUDI, E. A. *et al.* Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 264-266, 1999.

BAURIN, N. *et al.* Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 155-158, 2002.

BEZERRA, J. C. B. *et al.* Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 73, p. 428-430, 2002.

BRANDÃO, M. G. L.; GOMES, C. G.; NASCIMENTO, A. M. Plantas nativas da medicina tradicional brasileira: uso atual e necessidade de proteção. **Revista Fitos**, v. 2, n. 3, p. 24-29, 2006.

BRANDÃO, M. G. L. (Coord.); MONTE-MÓR, R. L. M. (Coord.). **Plantas medicinais – Um saber ameaçado. Uma viagem pela Estrada Real**. Belo Horizonte: UFMG, 2007. DVD.

BRANDÃO, M. G. L. *et al.* Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 141–148, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.916, de 30 de outubro de 1998. Aprova a política nacional de medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 nov. 1998. Seção 1, p. 18.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=10230>>. Acesso em: 26 abr. 2006.

BRASIL. Decreto Presidencial nº 5.813, de 22 de junho de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 jun. 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC)**. Brasília, DF, 2006b. 49 p.

BRUNETON, J. Tannins. In: BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. 2nd ed. Paris: Lavoisier Publishing Inc., 1999. p. 369-403.

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, p. 179-189, 2001.

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

CARVALHO, P. S. P.; TAGLIAVINI, D. G.; TAGLIAVINI, R. L. Cicatrização cutânea após a aplicação tópica de creme de calêndula e de associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas: um estudo clínico e histológico em ratos. **Revista de Ciências Biomédicas**, v. 12, p. 39-50, 1991.

CASTILHO, Rachel Oliveira. **Avaliação Química e Farmacológica de *Stryphnodendron obovatum* Benth.** 2007. 65 p. Relatório técnico – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

CASTRO e SILVA, H. V. Ação do *Stryphnodendron barbatiman* sobre a cicatrização: Estudo experimental em ratos. **HB científica**, v. 3, n. 1, p. 77-79, 1996.

CHAMPS, N. S. *et al.* Utilização de plantas em feridas por pacientes do Hospital Público Regional de Betim (MG). **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 13, n. 3, p. 173-178, 2003.

CHEN, Z. *et al.* Degradation of green tea catechins in tea drinks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 477-482, 2001.

CHEYNIER, V. *et al.* Size separation of condensed tannins by normal-phase high performance liquid chromatography. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 178-184, 1999.

CHITHRA, P.; SAJITHAL, G. B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of *Aloe vera* on collagen characteristics in healing dermal wounds. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 181, n. 1/2, p. 71-6, 1998a.

CHITHRA, P.; SAJITHAL, G. B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of *Aloe vera* on the healing of dermal wounds in diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, India: Chennai. v. 59, n. 3, p. 195-201, 1998b.

CHOI, S. W. *et al.* The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from *Aloe vera*. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 4, p. 535-45, 2001.

CORREA, M. P.; PENNA, L. A. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1926-78. 428 p.

COSTA, P. R. *et al.* Aplicação de fitoterápicos em feridas. In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, 2000, Centro de convenções da UFPE. **Livro de Resumos**. Recife, 2000. p. 235.

DE BRUYNE, T. *et al.* Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Byochemistry and Systematic Ecology**, v. 27, p. 445-459, 1999.

DIEMUNSCH, A. M.; MARTHS, C. Préparation et controle d'extraits végétaux à usage cosmétologique. **Lobo-Pharma-Problemes et Techniques**. Strasbourg. v. 294, p. 55-63. 1980.

DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on health promotion properties of tea. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 404-421, 2001.

EUROPEAN pharmacopoeia. 5th ed. France: Council of Europe, 2004.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004. p. 229-245.

FARMACOPÉIA brasileira. 2. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1959.

FARMACOPÉIA brasileira, 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

FAVORETO, L. V.; CONTRERA, M. G. D.; PETENUSCI, S. O.; SILVA-NETO, C.; LOPES, R. A.; SATAKE, T. Ação cicatrizante do extrato aquoso da casca do barbatimão *Stryphnodendron obovatum* em úlcera por contenção em ratos. **Revista da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas**, v. 8, p. 7-12, 1985.

FERREIRA, E. C.; NOGUEIRA, A. R. A. Vanillin-condensed tannin study using flow injection spectrophotometry. **Talanta**, v. 51, p. 1-6, 2000.

FORERO, E. Studies in *Stryphnodendron* (Leguminosae: Mimosoideae) including two new taxa. **Brittonia**, v. 24, n. 2, p. 143-147, 1972.

FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H. S. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2101-2110, 2000.

GOMEZ-FLORES, R. *et al.* Immunoenhancing properties of *Plantago major* leaf extract. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 8, p. 617-22, 2000.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 205-309, 1996.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 809-812, 1978.

HAGERMAN, A. E.; RICE, M. E.; RITCHARD, N. T. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin₁₆ (4→8) catechin (procyanidin). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2590-2595, 1998.

HAGERMAN, A. E. **Tannin Chemistry**. 2002. Disponível em: <<http://www.users.muohio.edu/hagermae/>>. Acesso em: 29 abr. 2009.

HAMMERSTONE, J. F.; LAZARUS, S. A.; MITCHELL, A. E.; RUCKER, R.; SCHMITZ, H. H. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 490-496, 1999.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The Flavonoids**. London: Chapman and Hall, 1975. 1204 p.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HASLAM, E. **Practical polyphenols; From structure to molecular recognition and physiological action**. Cambridge:Cambridge University, 1998. 438 p.

HEGGERS, J. P. *et al.* Beneficial effect of *Aloe* on wound healing in an excision wound model. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 2, n. 2, p. 271-7, 1996.

HEIJMEN, F. H. *et al.* Cross-linking of dermal sheep collagen with tannic acid. **Biomaterials**, v.18, n. 10, p. 749-754, 1997.

HERZOG-SOARES, J. D. *et al.* Bioatividade in vitro do extrato da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão verdadeiro). In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, 2000, Centro de convenções da UFPE. **Livro de Resumos**. Recife, 2000. p. 256.

HETLAND, G. *et al.* Protective effect of *Plantago major* L. pectin polysaccharide against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 52, n. 4, p. 348-55, 2000.

HUGHES-FORMELLA, B. J.; BOHNSACK, K.; RIPPKE, F.; BENNER, G.; RUDOLPH, M.; TAUSCH, I.; GASSMUELLER, J. Anti-inflammatory effect of Hamamelis lotion in a UVB erythema test. **Pharmacology and Treatment**, v. 196, n. 3, p. 316-322, 1998.

INFANTE, C. M. C.; SOARES, V. R. B.; KORN, M.; ROCHA, F. R. P. An improved flow-based procedure for microdetermination of total tannins in beverages with minimized reagent consumption. **Microchim Acta**, v. 161, p. 279-283, 2008.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH) OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Validation of Analytical Procedures, Q2(R1)**. Geneva. 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2009.

ISHIDA, K. *et al.* Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 942-949, 2006.

JONES, P. C.; TEIXEIRA, S. T.; BRANDÃO, M. G. L. Comportamento do propilenoglicol como solvente extrator frente a diferentes drogas vegetais. In: XV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1998, Centro de convenções da UFPE. **Livro de Resumos**. Recife, 1998. p. 184.

JORGE-NETO, J.; FRACASSO, J. F.; CAMARGO NEVES, M. C. L.; SANTOS, L. E.; BANUTH, V. L. Tratamento de úlcera varicosa e lesões de pele com *Calendula officinalis* L. e/ou com *Stryphnodendron barbadetiman* (Veloço) Martius. **Revista Ciências Farmacêuticas**, v. 17, p. 181-186, 1996.

KLOUCHEK-POPOVA, E.; POPOV, A.; PAVLOVA, N.; KUSTEVA, S. Influence of the physiological regeneration and epithelization using fractions isolated from *Calendula officinalis*. **Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarian**, v. 8, n. 4, p. 63-7, 1982.

KRISHNAN, P. The scientific study of herbal wound healing therapies: Current state of play. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 17, p. 21-27, 2006.

LAZARUS, S. A.; ADAMSON, G. E.; HAMMERSTONE, J. F.; SCHMITZ, H. H. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and Beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3693-3701, 1999.

LEE, M. H.; CHIOU, J. F.; YEN, K. Y.; YANG, L. L. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Letters**, v. 154, p. 131-136, 2000.

LIANG, Y. *et al.* Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 53-70, 2004.

LIEBERMANN, H. A.; LACHMAN, L.; SCHWARTZ, J. B. (Ed.). **Pharmaceutical dosage forms: tablets**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1990. 3v.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SOUZA JR., P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for anti-inflammatory activity. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 218-220, 1998.

LOGGIA, R.; DELLA, T. A.; SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, S. T.; ISAAC, O. The role of triterpenoides in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta Medica**, v. 60, p. 516-520, 1994.

LOPES, G. C. *et al.* Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 265-272, 2005.

LYSS, G.; SCHMIDT, T. J.; MERFORT, I.; PAHL, H. L. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from *Arnica*, selectively inhibits transcription factor NK-kappa B. **Biological Chemistry**, v. 378, n. 9, p. 951-961. 1997.

MALTA-JÚNIOR, A. *et al.* Caracterização química de tinturas (*Casearia arborea* e *Stryphnodendron adstringens*) utilizadas no tratamento de odontopatologias. In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, 2000, Centro de convenções da UFPE. **Livro de Resumos**. Recife, 2000. p. 180.

MARTINS, D. T. O.; LIMA, J. C. S.; RAO, V. S. N. The acetone soluble fraction from bark extract of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville inhibits gastric acid secretion and experimental gastric ulceration in rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 427-431, 2002.

MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Monomeric flavan-3-ols from the stem bark of *Stryphnodendron adstringens*. **Planta Medica**, v. 59, n. 7, p. A607, 1993.

MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelfinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 807-813, 1996a.

MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 857-862, 1996b.

MELLO, J. C. P. Taninos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville – Mimosaceae – barbatimão. **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 2, p. 105-109, 1997.

MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 1105-1107, 1999.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN (MOBOT). **Nomenclatural database**. St. Louis, 2007. Disponível em: <<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>>. Acesso em: 13 mai. 2007.

MOFFAT, A. C *et al.* **Clarke's isolation and identification of drugs: in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material**. 2nd ed. London: The Pharmaceutical Press, 1986. 1223 p.

MOLE, S.; WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. **Oecologia**, v. 72, p. 137-147, 1987.

MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hidrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 3-20, 2001.

MULLER, A. Herbal extract. **D8CI**, v. 150, n. 4, p. 32-90, 1992.

NASSIS, C. Z.; HAEBISCH, E. M.; GIESBRECHT, A. M. Antihistamine activity of *Bryophyllum calycinum*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 9, p. 929-36, 1992.

NETO, J. J.; FRACASSO, J. F.; NEVES, M. C. L. C.; SANTOS, L. E.; BANUTH, V. L. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 17, p. 181, 1996.

OBASEIKI-EBOR, E. E. Preliminary report on the in Vitro antibacterial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaf juice. **African Journal of Medicine and Medical Sciences**, v.14, n. 3/4, p.199-202, 1985.

PANIZZA, S.; ROCHA, A. B.; GECCHI, R.; SILVA, R. S.; PENTEADO, R. *Stryphnodendron barbatiman* (Vellozo) Martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 10, p. 101-6, 1988.

PÉREZ, M. H.; HERNÁNDEZ, T.; CORDOVÉS, C. G.; ESTRELLA, I.; RABANAL, R. M. Phenolic composition of the “Mocán” (*Visnea mocanera* L.f.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 3512–3515, 1996.

PHARMACOPOEIA dos Estados Unidos do Brasil. 1. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1929.

PRIYA, K. S. *et al.* Healing potential of *Datura alba* on burn wounds in albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 193-199, 2002.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REBECCA, M. A. *et al.* Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 101-104, 2002.

REBECCA, M.A. *et al.* Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 55-63, 2003.

ROMAN JUNIOR, W. A. *et al.* Estudo preliminar da atividade antibacteriana do extrato total e frações das cascas de *Stryphnodendron obovatum*. In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. 16, 2000, Centro de convenções da UFPE. **Livro de Resumos**. Recife, 2000. p. 184.

SAMUELSEN, A. B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 1-21, 2000.

SANTOS, C. A.; TORRES, K. R.; LEONART, R. **Plantas Mediciniais**, Curitiba: Scientis et Labor, 1987. 39 p.

SANTOS, S. C.; WESLEY, F. C.; RIBEIRO, J. P.; GUIMARÃES, D. O.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. C. Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, v. 73, p. 292-299, 2002.

SCHMIDGALL, J.; SCHNETZ, E.; HENSEL, A. Evidence for bioadhesive effects of polysaccharides and polysaccharide-containing herbs in an ex vivo bioadhesion assay on bucal membranes. **Planta Medica**, v. 66, n. 1, p. 48-53, 2000.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 21-40, 2001.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de productos fitoterapéuticos**. Niterói:Universidade Federal Fluminense, 2000. 246 p.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004. 1102 p.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.152-178, 1999.

SIQUEIRA, J. C. Plantas do cerrado na medicina popular. **Spectrum Jornal Brasileiro de Ciências**, v. 2, p. 41, 1982.

SNYDER, I. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 765 p.

SOUSA, N. C. *et al.* Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Environental and Molecular Mutagenesis**, v. 41, p. 293-299, 2003.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

SU, Y. L. *et al.* Stability of tea theaflavins and catechins. **Food Chemistry**, v. 83, p. 189-195, 2003.

SUN, B.; LEANDRO C.; SILVA, J. M. R.; SPRANGER, I. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1390-1396, 1998.

SUZUKI, M. *et al.* Epimerization of tea catechins and O-methylated derivatives of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate: relationship between epimerization and chemical structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 510-514, 2003.

THE MERCK INDEX. **An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 14. ed. New Jersey: Merck Research Laboratories, 2006. 155 p.

THE UNITED STATES Pharmacopeia. National Formulary. 29th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005.

UEMURA, L. M.; YAMAGUTI, E.; MELLO, J. C. P. Análise da droga vegetal barbatimão. In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. 16, 2000, Centro de convenções da UFPE. **Livro de Resumos**. Recife, 2000. p. 182.

VERZA, S. G.; KREINECKER, M. T.; REIS, V.; HENRIQUES, A. T.; ORTEGA, G. G. Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. **Química Nova**, v.30, n. 4, p. 815-820, 2007.

WAGNER, H. *et al.* Immunostimulating action of polysaccharides (heteroglycans) from higher plants. **Arzneimittelforschung**, v. 35, n. 7, p. 1069-75, 1985.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis, A thin layer chromatography**. 2nd ed. Germany:Springer-Verlog, 1996. 384 p.

WANG, R.; ZHOU, W.; WEN, R. H. Kinetic study of the thermal stability of tea catechins in aqueous systems using a microwave reactor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5924-5932, 2006.

WANG, R.; ZHOU, W.; JIANG, X. Reaction kinetics of degradation and epimerization of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system over a wide temperature range. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 2694-2701, 2008.

WATERHOUSE, A. L.; PRICE, S. F.; MACCORD, J. D. Reversed-phase high-performance liquid chromatography methods for analysis of wine polyphenols. **Methods in Enzymology**. v. 299, p. 113-121, 1999.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific, 1994.

WESTERHOF, W.; DAS, P. K.; MIDDELKOOP, E.; VERSCHOOR, J.; STOREY, L.; REGNIER, C. Mucopolysaccharides from psyllium involved in wound healing. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 27, n. 5-6, p. 165-75, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: WHO, 1992. 88 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Monographs on selected medicinal plants**. Geneva: WHO, 1999. 1 v.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Traditional Medicine Strategy 2002–2005**. Geneva: WHO, 2002.

YANG, D.; HWANG, L. S.; LIN, J. Effects of different steeping methods and storage on caffeine, catechins and gallic acid in bag tea infusions. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, p. 312-320, 2007.

ZHANG, L.; TIZARD, I. R. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. **Immunopharmacology**, v.35, n. 2, p. 119-28, 1996.