

**CONTRIBUIÇÃO PARA A PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS DE
FOLHAS DE *CECROPIA GLAZIOVII* SNETHL.: ESTUDOS DE
VARIAÇÃO SAZONAL E INTRA-ESPECÍFICA DE FLAVONÓIDES E
PROANTOCIANIDINAS, DE METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO E
DE ATIVIDADE VASORELAXANTE**

PILAR ESTER LUENGAS-CAICEDO

PILAR ESTER LUENGAS-CAICEDO

**CONTRIBUIÇÃO PARA A PADRONIZAÇÃO DE
EXTRATOS DE FOLHAS DE *CECROPIA GLAZIOVII*
SNETHL.: ESTUDOS DE VARIAÇÃO SAZONAL E
INTRA-ESPECÍFICA DE FLAVONÓIDES E
PROANTOCIANIDINAS, DE METODOLOGIAS DE
EXTRAÇÃO E DE ATIVIDADE VASORELAXANTE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacéuticas - Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

BELO HORIZONTE

2005

A experiência como filha da memória que é, pode ser transmitida e condensada em uma imagem, em uma frase, em um poema e até, em uma música.

A.J. Serqueira

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter-me dado a oportunidade de viver esta experiência profissional e de vida.

Ao Programa RELAPLAMED-ALFA/União Européia pela bolsa de estudos.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À *Universidad Nacional de Colombia* pela liberação das minhas responsabilidades acadêmicas durante o doutorado.

À Universidade Federal de Minas Gerais, em particular à Faculdade de Farmácia, por ter me recebido e acolhido.

À Profa. Alaíde Braga de Oliveira pela orientação, apoio, dedicação e incentivo constantes, pela amizade e por ter-me aceitado como sua aluna.

Ao Prof. Fernão Castro Braga pela orientação, colaboração e incentivo permanentes e pela amizade.

Ao Prof. Júlio A. Lombardi do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela coleta do material vegetal de espécimens nativos.

Ao agrônomo Pedro Melillo de Magalhães, do CPQBA, Campinas, S.P., pelo fornecimento do material vegetal proveniente de cultivo e clones.

Ao Prof. Steyner Cortês do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela realização dos ensaios de atividade vasorelaxante.

Ao professor H. Wagner, do Instituto de Biologia Farmacêutica, Universidade de Munique, Alemanha, pela realização dos perfís cromatográficos, por CCD, de extratos de *C. glaziovii*.

Ao Prof. Roberto Gonçalves Junqueira da Faculdade de Farmácia da UFMG pelos comentários sobre a análise estatística.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da UFMG pelo apoio recebido.

Aos bolsistas de iniciação científica Graziella e Henrique pela colaboração e disponibilidade.

A todos os amigos do Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela amizade, colaboração, disponibilidade e incentivo.

Aos professores do Departamento de Farmácia, da *Universidad Nacional de Colombia*, pelo apoio e amizade.

Ao Padre José Leite pela amizade e hospitalidade.

À minha família, pelo carinho, apoio, confiança e incentivo.

Ao Lázaro, pelo carinho, paciência, apoio e compreensão.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para meu aperfeiçoamento profissional e para a realização desta tese.

SUMÁRIO

Pág.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ESTRUTURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. OBJETIVO GERAL	6
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3. REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1. IMPORTÂNCIA DOS FITOTERÁPICOS NOS DIAS ATUAIS	9
3.2. O MERCADO DOS PRODUTOS FITOTERÁPICOS	11
3.3. ASPECTOS REGULATÓRIOS E DE REGISTRO DE FITOTERÁPICOS	13
3.4. CONTROLE DE QUALIDADE E MONOGRAFIAS FARMACOPÉICAS	16
3.5. AS PLANTAS MEDICINAIS COMO MATÉRIA-PRIMA PARA A ELABORAÇÃO DE FITOTERÁPICOS	19
3.6. EXTRAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS	23
3.7. EXTRATOS SEMI-PURIFICADOS	28
3.8. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS	29
3.9. <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> E OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO	31
3.9.1. OCORRÊNCIA E USO MEDICINAL	32
3.9.2. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS	33
3.9.3. QUÍMICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>CECROPIA</i>	37
3.9.4. EXPERIÊNCIAS TECNOLÓGICAS	47
3.10. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO DE PRODUTOS NATURAIS	47

	Pág.
4. PARTE EXPERIMENTAL	50
4.1. MATERIAL E EQUIPAMENTO	51
4.1.1. EQUIPAMENTOS	51
4.1.2. SOLVENTES	52
4.1.3. REAGENTES P.A.	52
4.1.4. MATERIAL PARA CROMATOGRAFIA	52
4.1.5. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA	52
4.2. MATERIAL VEGETAL	53
4.2.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL	53
4.2.1.1. ESPÉCIMENS NATIVOS	53
4.2.1.2. ESPÉCIMENS CULTIVADOS	53
4.2.2. ACONDICIONAMENTO DO MATERIAL VEGETAL	55
4.3. MÉTODOS	55
4.3.1. ENSAIOS FARMACOGNÓSTICOS GERAIS	55
4.3.1.1. PERDA POR DESSECAÇÃO	56
4.3.1.2. CINZAS TOTAIS	56
4.3.1.3. CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO	56
4.3.1.4. ÍNDICE DE INTUMESCÊNCIA	57
4.3.1.5. ÍNDICE DE ESPUMA	57
4.3.1.6. TEOR DE EXTRATIVOS EM DIFERENTES SOLVENTES	58
4.3.1.7. GRANULOMETRIA DO PÓ	59
4.3.2. PROSPEÇÃO FITOQUÍMICA POR CCD	59
4.3.3. ENSAIOS DE QUANTIFICAÇÃO DE CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS	62
4.3.3.1. ESTABELECIMENTO DAS QUANTIDADES DE AMOSTRA PARA OS TESTES QUANTITATIVOS	62
4.3.3.2. QUANTIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE POLIFENÓIS TOTAIS E TANINOS	63
4.3.3.3. QUANTIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FLAVONÓIDES	66
4.3.3.4. QUANTIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PROANTOCIANIDINAS	71

	Pág.
4.3.4. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALGUNS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR HPLC	74
4.3.4.1. DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS DA METODOLOGIA	74
4.3.4.2. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS EMPREGADAS	76
4.3.4.3. IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS NOS CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS	77
4.3.4.4. OBTENÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO	78
4.3.4.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	79
4.3.4.6. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ORIENTINA E ISOORIENTINA NAS FOLHAS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i>	80
4.3.4.7. OBTENÇÃO DE PERFIS POR HPLC	82
4.3.5. DEFINIÇÃO DE METODOLOGIA PARA A OBTENÇÃO DE UM EXTRATO SEMIPURIFICADO, ENRIQUECIDO EM FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS	83
4.3.5.1. ESCOLHA DO SOLVENTE EXTRATOR	83
4.3.5.2. SELEÇÃO DA PROPORÇÃO DE ETANOL E ÁGUA	85
4.3.5.3. ESCOLHA DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO	86
4.3.6. OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ENRIQUECIDAS EM FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS	88
4.3.6.1. EXTRATO AQUOSO PREPARADO POR DECOCCÃO	88
4.3.6.2. PARTIÇÃO DO EXTRATO AQUOSO COM SOLVENTES IMISCÍVEIS	88
4.3.6.3. FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20	90
4.3.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VASODILATADORA	91
4.3.7.1. ANIMAIS	91
4.3.7.2. PREPARAÇÃO DE ANÉIS DE AORTA	91
4.3.7.3. ATIVIDADE VASODILATADORA	92
4.3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	92
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
5.1. MATERIAL VEGETAL	94
5.2. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL – ENSAIOS FARMACOGNÓSTICOS GERAIS	95

	Pág.
5.2.1. PERDA POR DESSECAÇÃO	95
5.2.2. CINZAS TOTAIS	96
5.2.3. CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO	97
5.2.4. ÍNDICE DE INTUMESCÊNCIA	98
5.2.5. ÍNDICE DE ESPUMA	99
5.2.6. TEOR DE EXTRATIVOS EM DIFERENTES SOLVENTES	100
5.2.7. GRANULOMETRIA DO PÓ	102
5.2.8. RESUMO DOS RESULTADOS PARA OS ENSAIOS GERAIS	104
5.3. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO MATERIAL VEGETAL	105
5.4. DETERMINAÇÕES QUANTITATIVAS POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL	106
5.4.1. QUANTIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE POLIFENÓIS TOTAIS E TANINOS	108
5.4.2. QUANTIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FLAVONÓIDES	110
5.4.2.1. PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA REMOÇÃO DE CLOROFILAS E OUTROS COMPOSTOS DE BAIXA POLARIDADE	110
5.4.2.2. TEOR DE FLAVONÓIDES	111
5.4.3. QUANTIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PROANTOCIANIDINAS	119
5.4.3.1. TEOR DE PROANTOCIANIDINAS	119
5.4.4. TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS EM FOLHAS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> SNETHL. – RECOMENDAÇÕES PARA A COLETA E COMPARAÇÃO COM OUTRAS ESPÉCIES	126
5.5. ANÁLISES POR HPLC	129
5.5.1. ENSAIOS PRELIMINARES	130
5.5.2. PERFÍS CROMATOGRÁFICOS A 240 nm	136
5.5.3. PERFÍS CROMATOGRÁFICOS A 280 nm	142
5.5.4. PERFÍS CROMATOGRÁFICOS A 350 nm	151
5.5.5. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ORIENTINA E ISOORIENTINA POR HPLC	169
5.5.5.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	169
5.5.5.2. QUANTIFICAÇÃO POR HPLC DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ORIENTINA E ISOORIENTINA EM FOLHAS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i>	180

	Pág.
5.6. OBTENÇÃO DE UM EXTRATO ENRIQUECIDO EM FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS	191
5.6.1. ESCOLHA DO SOLVENTE EXTRATOR	191
5.6.2. ESCOLHA DA PROPORÇÃO DE ETANOL E ÁGUA	199
5.6.3. ESCOLHA DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO	205
5.7. OBTENÇÃO E SEMIPURIFICAÇÃO DE UM EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO	207
5.7.1. OBTENÇÃO DE EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO PREPARADO POR DECOÇÃO	207
5.7.2. PARTIÇÃO COM SOLVENTES IMISCÍVEIS	209
5.7.3. FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20	215
5.7.3.1. FRAÇÃO FAE	215
5.7.3.2. FRAÇÃO FB1	217
5.7.3.3. FRACIONAMENTO DA SUB-FRAÇÃO FB1-C EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20	220
5.7.3.4. RE-CROMATOLOGRAFIA DE FB1-D EM SEPHADEX LH-20	222
5.8 ATIVIDADE VASODILATADORA EM ANÉIS DE AORTA PRÉ-CONTRAÍDOS COM FENILEFRINA	223
5.8.1. EXTRATOS	223
5.8.2. FRAÇÕES	228
5.8.3. SUB-FRAÇÕES	229
5.8.4. CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS COM AS PORCENTAGENS DE RELAXAÇÃO EM ANÉIS DE AORTA	234
6. CONCLUSÕES	241
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	247

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. <i>Cecropia glaziovii</i> Snethl.	31
FIGURA 2. Traçado representativo do efeito contrátil induzidos por fenilefrina 0,3 μ M e do efeito vasoconstrictor de acetilcolina 1 μ M	49
FIGURA 3. Fluxogramas das partições com solventes imiscíveis do extrato aquoso liofilizado de <i>C. glaziovii</i>	89
FIGURA 4. Teor de polifenóis totais e taninos em folhas de <i>C. glaziovii</i>	109
FIGURA 5. Teor de flavonóides em folhas novas e maduras de <i>Cecropia glaziovii</i> coletadas nas épocas chuvosa e seca	113
FIGURA 6. Teor de flavonóides em folhas <i>Cecropia glaziovii</i> provenientes de árvores nativas, cultivadas e clones	114
FIGURA 7. Teor de flavonóides em folhas de <i>Cecropia glaziovii</i> coletadas nas épocas chuvosa e seca	114
FIGURA 8. Teor de flavonóides em pecíolos e lâminas foliares de folhas maduras de <i>Cecropia glaziovii</i> coletadas nas épocas seca e chuvosa	118
FIGURA 9. Teor de proantocianidinas em folhas novas e maduras de <i>Cecropia glaziovii</i> coletadas nas épocas chuvosa e seca	122
FIGURA 10. Teor de proantocianidinas em folhas <i>Cecropia glaziovii</i> provenientes de árvores nativas, cultivadas e clones	123
FIGURA 11. Teor de proantocianidinas em folhas de <i>Cecropia glaziovii</i> coletadas nas épocas chuvosa e seca	123
FIGURA 12. Teor de proantocianidinas em pecíolos e lâminas foliares de folhas maduras de <i>Cecropia glaziovii</i> coletadas nas épocas seca e chuvosa	126
FIGURA 13. Espectros UV-Vis de alguns ácidos orgânicos, catequinas, flavonas e flavonóis presentes em <i>Cecropia glaziovii</i>	131
FIGURA 14. Perfís cromatográficos, obtidos por HPLC, para o extrato hidroetanólico (7:3) de lâminas foliares de folhas maduras de <i>Cecropia glaziovii</i> . Detecção no UV – 210 nm	132
FIGURA 15. Perfil cromatográficos por HPLC para o extrato hidroetanólico (7:3) de lâminas foliares de folhas maduras de <i>Cecropia glaziovii</i> . Detecção no UV: 210 nm e 254 nm	133
FIGURA 16. Perfil cromatográfico obtido por HPLC, para a mistura de ácido protocatéquico, ácido clorogênico, (+)-catequina e (-)-catequina 0,05 mg/mL em metanol. Fase móvel: NaSO ₄ 0,4 M (água) – metanol (90:10). ...	134

	Pág.
FIGURA 17. Perfil cromatográfico obtido por HPLC para o extrato hidroetanólico (7:3) de lâminas foliares de folhas maduras de <i>Cecropia glaziovii</i> , amostra SP-S-M-2. Sistema Cromatográfico 4. Detecção no UV - 280 nm	135
FIGURA 18: Perfís cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras provenientes de <i>Cecropia glaziovii</i> . Sistema Cromatográfico 5 – Detecção no UV -240 nm	138
FIGURA 19. Cromatogramas obtidos por HPLC para as substâncias de referência. Sistema Cromatográfico 5. Detecção no UV – 280 nm	143
FIGURA 20. Co-injeções com as substâncias de referência: ácido protocatéquico, ácido clorogênico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, orientina, isorientina, vitexina, isovitexina, rutina, isoquercetrina e quercetina. Sistema Cromatográfico 5. Detecção no UV–280nm	144
FIGURA 21: Perfís cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras provenientes das árvores nativas de <i>Cecropia glaziovii</i> . Sistema Cromatográfico 5 – Detecção no UV -280 nm	147
FIGURA 22: Perfil cromatográfico, obtido por HPLC, para o extrato etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras de SP-S-8 a 350 nm	152
FIGURA 23. Cromatogramas obtidos por HPLC para as substâncias de referência. sistema cromatográfico 6 – detecção UV-Vis 350	154
FIGURA 24. Cromatogramas, obtidos por HPLC, para as co-injeções com as substâncias de referência. Sistema Cromatográfico 6 – Detecção UV-Vis 350 nm	155
FIGURA 25. Cromatogramas obtidos, por HPLC, variando os solventes de extração e dissolução final das amostras. Sistema Cromatográfico 6 – Detecção UV-Vis 350 nm	158
FIGURA 26. Perfís cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de pó de lâminas foliares de folhas maduras de <i>Cecropia glaziovii</i> . Sistema Cromatográfico 6 – Detecção UV-Vis 350 nm....	162
FIGURA 27. Perfís cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de pó de lâminas foliares de folhas novas de <i>Cecropia glaziovii</i> . Sistema Cromatográfico 6 – Detecção UV-Vis 350 nm....	166

	Pág.
FIGURA 28. Curvas de calibração empregadas na quantificação de ácido clorogênico, orientina e isoorientina por HPLC	170
FIGURA 29. Cromatogramas obtidos por HPLC para a amostra SP-S-M-8 - Sistema cromatográfico 6 e detecção no UV-Vis a 280 e 350 nm	177
FIGURA 30. Cromatogramas obtidos para determinar as quantidades mínimas detectáveis de ácido clorogênico, orientina e isoorientina	178
FIGURA 31. Teor de ácido clorogênico em lâminas foliares de <i>Cecropia glaziovii</i> provenientes de árvores nativas cultivadas e clones, coletadas nas épocas chuvosa e seca	181
FIGURA 32. Teor de orientina em lâminas foliares de <i>Cecropia glaziovii</i> provenientes de árvores nativas cultivadas e clones, coletadas nas épocas chuvosa e seca	182
FIGURA 33. Teor de isoorientina em lâminas foliares de <i>Cecropia glaziovii</i> provenientes de árvores nativas cultivadas e clones, coletadas nas épocas chuvosa e seca	183
FIGURA 34. Teores de ácido clorogênico, orientina e isoorientina em pecíolos e lâminas foliares de folhas maduras de <i>Cecropia glaziovii</i> , determinados por HPLC	186
FIGURA 35. Teor de flavonóides em extratos etanólicos, etanol-água (7:3), acetona-água (7:3) e aquosos e na droga vegetal empregada na sua preparação	195
FIGURA 36. Teor de proantocianidinas em extratos etanólicos (E), etanol-água (7:3), acetona-água (7:3) e aquosos e na droga vegetal empregada na sua preparação	195
FIGURA 37. Relação entre o teor de flavonóides no extrato e na droga vegetal utilizada para prepará-lo	198
FIGURA 38. Relação entre o teor de proantocianidinas no extrato e na droga vegetal utilizada para prepará-lo	198
FIGURA 39. Perfís cromatográficos, obtidos por HPLC, para os extratos etanol-água 3:7, etanol-água 1:1 e etanol-água 7:3 com e sem tratamento de concentração parcial e filtração, preparados por sonicação, a partir de folhas maduras de <i>Cecropia glaziovii</i>	202
FIGURA 40. Perfís cromatográficos, obtidos por CCD, para o extrato aquoso preparado por decocção e liofilizado e os extratos etanol-água 3:7, etanol-água 1:1, etanol-água 7:3 e acetona água 7:3 preparados por sonicação, a partir de folhas maduras de <i>Cecropia glaziovii</i>	203

	Pág.
FIGURA 41. Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, de extratos etanol- água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras provenientes de SP-Jun-M e SP-Jun-N e dos seus extratos aquosos preparados por decoção e liofilizados	209
FIGURA 42: Fluxograma das partições do extrato aquoso liofilizado de <i>Cecropia glaziovii</i> com solventes imiscíveis e porcentagens relativas das frações	211
FIGURA 43. Cromatogramas obtidos por CCD, para frações oriundas do extrato aquoso de <i>Cecropia glaziovii</i> por partição entre solventes imiscíveis	213
FIGURA 44: Perfís cromatográficos, obtidos por HPLC, para frações oriundas do extrato aquoso de <i>Cecropia glaziovii</i> (amostra SP-Jun-M) por partição entre solventes imiscíveis	214
FIGURA 45. Perfís cromatográficos, obtidos por HPLC, para as sub- frações obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 da fração acetato de etila (FAE)	216
FIGURA 46. Cromatograma por CCD de frações obtidas por cromatografia de fb1 em coluna de Sephadex LH-20	217
FIGURA 47. Perfís cromatográficos por HPLC das sub-frações obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 da fração butanólica (FB1)....	219
FIGURA 48. Perfís cromatográficos, por HPLC, das sub-frações obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 da subfração FB1-C.....	221
FIGURA 49. Porcentagem de relaxamento de anéis de aorta pré- contraídos com fenilefrina para extrato aquoso preparado por decoção e etanólico, etanol-água (7:3) e acetona-água (7:3) preparados por sonicação a partir de folhas de <i>Cecropia glaziovii</i>	223
FIGURA 50. Porcentagem de relaxamento de anéis de aorta pré- contraídos com fenilefrina para extratos etanol-água 7:3 de pecíolos e lâminas foliares de folhas maduras de <i>Cecropia glaziovii</i> do mesmo espécimen	225
FIGURA 51. Porcentagem de relaxamento de anéis de aorta pré- contraídos com fenilefrina para extratos aquoso liofilizado e etanol-água de lâminas foliares de folhas maduras de <i>Cecropia glaziovii</i>	226
FIGURA 52. Porcentagem de relaxamento de anéis de aorta pré- contraídos com fenilefrina para extratos em etanol-água (1:1) de lâminas foliares de folhas maduras de <i>Cecropia glaziovii</i> , preparados por maceração, percolação contínua, percolação com repouso e com ultra- som	227

	Pág.
FIGURA 53. Atividade vasorelaxante de anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina para frações obtidas por partição entre solventes imiscíveis de extrato aquoso liofilizado de folhas maduras de <i>Cecropia glaziovii</i>	228
FIGURA 54. Atividade vasorelaxante em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina para sub-frações obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20	230
FIGURA 55. Atividade vasorelaxante em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina para sub-frações obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 a partir de FB1-C	232
FIGURA 56. Valores de CI_{50} obtidos para os extratos e frações, de folhas de <i>Cecropia glaziovii</i> , mais ativos	233
FIGURA 57. Retas de melhor ajuste para a regressão entre os teores de flavonóides e as porcentagens de relaxação observadas para os extratos e frações de folhas de <i>Cecropia glaziovii</i>	237
FIGURA 58. Retas de melhor ajuste para a regressão entre os teores de proantocianidinas e as porcentagens de relaxação observadas para os extratos e frações de folhas de <i>Cecropia glaziovii</i>	238
FIGURA 59. Retas de melhor ajuste para a regressão entre a soma dos teores de flavonóides e proantocianidinas e as porcentagens de relaxação observadas para os extratos e frações de folhas de <i>Cecropia glaziovii</i>	239

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1. AMOSTRAS DE MATERIAL VEGETAL	54
TABELA 2. FASES ESTACIONÁRIAS E MÓVEIS EMPREGADAS NA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CCD	60
TABELA 3. REVELADORES EMPREGADOS NA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CCD	61
TABELA 4. DIMENSÕES DAS FOLHAS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i>	94
TABELA 5. PERDA POR DESSECAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL DE <i>C. GLAZIOVII</i> (100 ± 5 °C) APÓS A SECAGEM E MOAGEM	96
TABELA 6. TEOR DE CINZAS TOTAIS NO PÓ DO MATERIAL VEGETAL DE <i>C. GLAZIOVII</i>	97
TABELA 7. TEOR DE CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO NO PÓ DO MATERIAL VEGETAL DE <i>C. GLAZIOVII</i>	97
TABELA 8. ÍNDICES DE INTUMESCÊNCIA PARA O PÓ DO MATERIAL VEGETAL	99
TABELA 9. TEOR DE EXTRATIVOS DO PÓ DAS FOLHAS MADURAS DE <i>C. GLAZIOVII</i> , EM DIFERENTES SOLVENTES (MÉTODO DE MACERAÇÃO A FRIO)	101
TABELA 10. ASPECTO DAS SOLUÇÕES DO PÓ DAS FOLHAS MADURAS DE <i>C. GLAZIOVII</i> , EM DIFERENTES SOLVENTES (MÉTODO DE MACERAÇÃO A FRIO)	102
TABELA 11. GRANULOMETRIA DO PÓ DAS FOLHAS MADURAS DE <i>C. GLAZIOVII</i> PARA A AMOSTRA COLETADA NO PARQUE ESTADUAL DO RIO DOCE (RD-C-M)	103
TABELA 12. GRANULOMETRIA DO PÓ DAS FOLHAS NOVAS DE <i>C. GLAZIOVII</i> PARA A AMOSTRA COLETADA NO PARQUE ESTADUAL DO RIO DOCE (RD-C-N)	103
TABELA 13. CARACTERIZAÇÃO DO PÓ DE FOLHAS MADURAS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> SNETHL. - ENSAIOS GERAIS -TABELA RESUMO	104
TABELA 14. RESULTADOS DA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE PECÍOLOS E LÂMINAS FOLIARES DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> SNETHL...	105
TABELA 15. VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA DO TEOR DE FLAVONÓIDES EM FOLHAS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> SNETHL. PROVENIENTES DE ÁRVORES NATIVAS, CULTIVADAS E CLONES	117
TABELA 16. VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA DO TEOR DE PROANTOCIANIDINAS EM FOLHAS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> SNETHL. PROVENIENTES DE ÁRVORES NATIVAS, CULTIVADAS E CLONES	124

	Pág.
TABELA 17. TEMPOS DE RETENÇÃO DOS PADRÕES - SISTEMA CROMATOGRÁFICO 5 - DETECÇÃO UV- 280 nm	142
TABELA 18. TEMPOS DE RETENÇÃO DOS PADRÕES - SISTEMA CROMATOGRÁFICO 6 - DETECÇÃO UV-VIS - 350 nm	153
TABELA 19. AVALIAÇÃO DO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO E DISSOLUÇÃO NA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO POR HPLC: ÁREAS DOS PICOS DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ORIENTINA E ISOORIENTINA	158
TABELA 20. CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS NOS CROMATOGRAMAS DE FOLHAS NOVAS E MADURAS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> , OBTIDOS POR HPLC A 350 nm	160
TABELA 21. CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS NOS CROMATOGRAMAS DE LÂMINAS FOLIARES DE FOLHAS DE ÁRVORES NATIVAS, CULTIVADAS E CLONES DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> , OBTIDOS, POR HPLC, A 280 E 350 nm	161
TABELA 22 PARÂMETROS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO POR HPLC – RETAS AJUSTADAS PARA PASSAR PELA ORIGEM	169
TABELA 23. RESULTADOS DE ANOVA PARA A REGRESSÃO LINEAR DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO ELABORADAS	171
TABELA 24. INTERCEPTOS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO ANTES DE SER AJUSTADA A PASSAGEM PELA ORIGEM	172
TABELA 25. RESULTADOS DO TESTE PARA OS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO LINEAR DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO ELABORADAS..	173
TABELA 26. MÉDIAS E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO CALCULADOS PARA AS ÁREAS OBTIDAS DURANTE A ELABORAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO	174
TABELA 27. COEFICIENTES DE VARIAÇÃO MÁXIMOS ACEITÁVEIS CALCULADOS PARA AS CONCENTRAÇÕES DE ANALITO UTILIZADAS..	174
TABELA 28. AVALIAÇÃO DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA O ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO EM CINCO DIAS DIFERENTES	175
TABELA 29. COEFICIENTES DE VARIAÇÃO MÁXIMOS RECOMENDADOS PARA UM MÉTODO ANALÍTICO EM FUNÇÃO DOS LIMITES DE ACEITAÇÃO	176
TABELA 30. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC PARA OS METABÓLITOS ANALISADOS	179
TABELA 31. TEORES DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ORIENTINA E ISOORIENTINA DETERMINADOS POR HPLC EM LÂMINAS FOLIARES DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i>	180

	Pág.
TABELA 32. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM FOLHAS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> , OBTIDOS POR HPLC E POR COLORIMETRIA	188
TABELA 33. TEORES DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ORIENTINA E ISOORIENTINA RELATADOS NA LITERATURA PARA DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS	190
TABELA 34. INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO DROGA / SOLVENTE NA COMPOSIÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> , PREPARADO POR DECOCCÃO	191
TABELA 35. TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS OBTIDOS POR PERCOLAÇÃO E POR SONICAÇÃO A PARTIR DE FOLHAS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i>	192
TABELA 36. RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE FOLHAS MADURAS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> COM DIFERENTES SOLVENTES UTILIZANDO ULTRA-SOM E A PROPORÇÃO 1 g / 33 mL	193
TABELA 37. TEOR DE FLAVONÓIDES EM EXTRATOS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> OBTIDOS EMPREGANDO ULTRA-SOM E DIFERENTES SOLVENTES	194
TABELA 38 – TEOR DE PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> OBTIDOS EMPREGANDO ULTRA-SOM E DIFERENTES SOLVENTES	194
TABELA 39. TEOR DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS NAS AMOSTRAS DE DROGA VEGETAL UTILIZADAS PARA PREPARAR OS EXTRATOS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i>	196
TABELA 40. RELAÇÃO TEOR DE FLAVONÓIDES NO EXTRATO / NA DROGA VEGETAL PARA EXTRATOS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> PREPARADOS COM DIFERENTES SOLVENTES	197
TABELA 41. RELAÇÃO TEOR DE PROANTOCIANIDINAS NO EXTRATO / NA DROGA VEGETAL PARA EXTRATOS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> PREPARADOS COM DIFERENTES SOLVENTES	197
TABELA 42. TEORES DE FLAVONÓIDES E DE PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS HIDRO-ETANÓLICOS DE <i>C. GLAZIOVII</i> PREPARADOS POR SONICAÇÃO E COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE ÁGUA E ETANOL	200
TABELA 43. TEOR DE FLAVONÓIDES E DE PROANTOCIANIDINAS TOTAIS EM EXTRATOS HIDROETANÓLICOS (1:1) DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> PREPARADOS	206

	Pág
TABELA 44. RENDIMENTO NA OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO DE FOLHAS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i>	208
TABELA 45. TEOR DE FLAVONÓIDES E DE PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS AQUOSOS LIOFILIZADOS DE <i>C. GLAZIOVII</i>	208
TABELA 46. TEOR DE FLAVONÓIDES E DE PROANTOCIANIDINAS EM FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÃO COM SOLVENTES IMISCÍVEIS DE EXTRATO AQUOSO DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i>	212
TABELA 47. MASSAS E PORCENTAGENS RELATIVAS À FAE DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS POR FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20	215
TABELA 48. MASSAS E PORCENTAGENS RELATIVAS A FB1 DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS POR FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20	218
TABELA 49. TEOR DE FLAVONÓIDES E DE PROANTOCIANIDINAS NAS SUB-FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA DE FB1 EM SEPHADEX LH-20	218
TABELA 50. MASSAS E PORCENTAGENS RELATIVAS A FB1 DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS POR FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20	220
TABELA 51. TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> PREPARADOS COM DIFERENTES SOLVENTES VS VASORELAXAÇÃO DE ANÉIS DE AORTA	224
TABELA 52. TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS DE PECÍOLO E LÂMINA FOLIAR DE FOLHAS MADURAS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> VS VASORELAXAÇÃO EM ANÉIS DE AORTA.....	225
TABELA 53. TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> PREPARADOS COM ÁGUA E MISTURAS HIDROETANÓLICAS VS VASORELAXAÇÃO EM ANÉIS DE AORTA	226
TABELA 54. TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS ETANOL-ÁGUA (1:1) DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> PREPARADOS EMPREGANDO DIFERENTES METODOLOGIAS EXTRATIVAS VS VASORELAXAÇÃO EM ANÉIS DE AORTA	227
TABELA 55. TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS VS PORCENTAGEM DE RELAXAMENTO DE ANÉIS DE AORTA PRÉ-CONTRAÍDOS COM FENILEFRINA PARA FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÃO ENTRE SOLVENTES IMISCÍVEIS DO EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO DE FOLHAS MADURAS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i>	229

	Pág.
TABELA 56. PORCENTAGEM DE RELAXAMENTO EM ANÉIS DE AORTA PRÉ-CONTRAÍDOS COM FENILEFRINA PARA SUB-FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20 A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE)	231
TABELA 57. PORCENTAGEM DE RELAXAMENTO EM ANÉIS DE AORTA PRÉ-CONTRAÍDOS COM FENILEFRINA PARA SUB-FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20 A PARTIR DA FRAÇÃO BUTANÓLICA 1 (FB1)	231
TABELA 58. PORCENTAGEM DE RELAXAMENTO DE ANÉIS DE AORTA PRÉ-CONTRAÍDOS COM FENILEFRINA PARA SUB-FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20 A PARTIR DE FB1-C	232
TABELA 59. ATIVIDADE VASORELAXANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>CRATAEGUS</i> , <i>MUSANGA CECROPIOIDES</i> , <i>CECROPIA HOLOLEUCA</i> , <i>C. PACHYSTACHAYA</i> , <i>C. GLAZIOVII</i> E FRAÇÕES ENRIQUECIDAS EM PROANTOCIANIDINAS	234
TABELA 60. EQUAÇÕES PARA AS RETAS DE MELHOR AJUSTE PARA A CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE FLAVONÓIDES E PRPOANTOCIANIDINAS E AS PORCENTAGENS DE RELAXAÇÃO OBSERVADAS PARA OS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHAS DE <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> EMPREGANDO DIFERENTES MODELOS MATEMÁTICOS	236
TABELA 61. ATIVIDADE VASODILATADORA DE ALGUNS CONSTITUINTES VEGETAIS	240

LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS

		Pág.
1	Ácido fumárico	37
2	Ácido cafeico	37
3	Ácido gálico	37
4	Ácido mirístico	37
5	Ácido miricílico	37
6	β -Sitosterol	37
7	β -Sitosterona	38
8	α -Amirina	38
9	Celobiose	38
10	Leucocianidina	39
11	Ácido protocatéquico	40
12	Ácido clorogênico	40
13	(+)-Catequina	40
14	(-)-Epicatequina	40
15	Procianidina B ₂	40
16	Procianidina C ₁	41
17	Orientina	41
18	Isoorientina	41
19	Isoquercitrina	42
20	Isovitexina	42
21	Vitexina	42
22	Estigmast-4-en-3-ona	43
23	β -Amirina	43
24	Escoparona	43
25	Ácido ursólico	44
26	(E)-3,7,11,15,19,23-hexametil-tetracos-2-en-1-ol	44
27	Ácido O-acetilursólico	45
28	Lupeol	45
29	Ácido oleanólico	45

	Pág.
30	Ácido 2 α -acetóxi-3 β ,19 α -diidroxi-urs-12-eno-28-óico 46
31	Ácido 2 α ,3 β ,19 α -triidroxi-urs-12-eno-28-óico 46
32	Ácido 2 α -acetoxi,3 β ,19 α -diidroxi-urs-12-eno-28-óico 46
33	Ácido 2 α ,3 α ,19 α -triidroxi-urs-12-eno-28-óico 46
34	2 α -acetoxi,3 α ,19 α -diidroxi-11,12-epoxi-13,16-ursanolactona 46
35	3 α -acetóxi,2 α ,19 α -diidróxi,11,12-epoxi-13,16-ursanolactona 46
36	Rutina 130
37	Quercetina 130
38	Canferol 157
39	Hiperosídeo 203

RESUMO

Cecropia glaziovii Snethl. é uma planta medicinal tradicional cuja atividade anti-hipertensiva é atribuída a flavonóides e proantocianidinas. Estudos de variação intraespecífica e sazonal dessas duas classes de metabólitos foram realizados, espectrofotométricamente, para amostras de folhas novas e maduras coletadas de árvores nativas, cultivadas e clones, nas épocas seca e chuvosa. Os teores de flavonóides e proantocianidinas variaram de 0,64 +/- 0,21% a 3,44 +/- 0,56%, e de 2,23 +/- 0,89% a 5,36 +/- 0,68%, respectivamente entre as várias populações analisadas. Como esperado, observou-se maior variabilidade química em árvores nativas do que em cultivadas e clones. Análises por HPLC permitiram a identificação de ácido protocatéquico, ácido clorogênico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, orientina, isoorientina, isovitexina e isoquercetrina, e a quantificação de ácido clorogênico, orientina e isoorientina em folhas novas e maduras de *C. glaziovii*, provenientes de diferentes espécimes. O teor de ácido clorogênico variou de 0,03% a 2,39%, o de orientina de 0,01% a 0,42%, e o de isoorientina de 0,08 a 1,16% nos diferentes indivíduos analisados. Com o objetivo de estabelecer uma metodologia para obtenção de um extrato padronizado de folhas de *C. glaziovii*, foram avaliados diferentes solventes de extração e várias técnicas extrativas, em escala de laboratório. Avaliou-se o efeito do teor de metabólitos na matéria-prima, do solvente de extração, da proporção droga / solvente e do método de extração na concentração de flavonóides e proantocianidinas e na atividade vasodilatadora em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina. Foram obtidas frações por partições com solventes imiscíveis e cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, as quais foram caracterizadas em relação ao perfil cromatográfico por HPLC, teores de flavonóides e proantocianidinas, e atividade vasorelaxante. Confirmou-se que tanto flavonóides quanto proantocianidinas estão envolvidos na atividade vasodilatadora observada, mas que os teores destes metabólitos, por si só, não explicam a atividade hipotensora de folhas de *Cecropia glaziovii*. A semelhança dos perfis químicos e farmacológicos de *Cecropia glaziovii* e *Crataegus* sugerem que *C. glaziovii* poderia ser um sucedâneo desta droga.

ABSTRACT

STUDIES ON THE STANDARDIZATION OF *CECROPIA GLAZIOVII* SNETHL. LEAVES EXTRACTS: SEAZONAL AND INTRASPECIFIC VARIATION OF FLAVONOID AND PROANTHOCYANIDIN CONTENTS, EXTRACTION METODOLOGIES AND VASORELAXANT ACTIVITY

Cecropia glaziovii Snethl. is a traditional medicinal plant whose anti-hypertensive effect was shown to be related to flavonoids and proanthocyanidins. The present work describes studies on the sazonal and intraspecific variation of these metabolite classes, whose contents were determined by spectrophotometry, for samples of young and mature leaves collected from native, cultivated and clone trees, along the dried and rainy periods of a year. The flavonoid and proanthocyanidin contents varied from 0.64 +/- 0.21% to 3.44 +/-0.56% and from 2.23 +/- 0.89% to 5.36 +/- 0.68% , respectively, for the assayed populations. As expected, a greater variability was observed for native than for cultivated and clone trees. HPLC analyses allowed the identification of protocatechic acid, chlorogenic acid, (+)-catechin, (-)-epicatechin, orientin, isoorientin, isovitexin and isoquercetrin, as well as the quantification of chlorogenic acid, orientin and isoorientin in young and mature leaves of *C. glaziovii*. The percentage of chlorogenic acid varied from 0.03% to 2.39%, for orientin the contents were from 0.01 to 0.42% and for isoorientin, from 0.08 to 1.16%. Aiming to develop a standardized extract of *C. glaziovii* leaves, several solvents and extraction methodologies were assayed in a bench scale evaluating the effect of the solvent, the ratio drug/solvent and the extraction technique in the flavonoid and proanthocyanidin contents, as well in the vasorelaxant activity on rat aorta rings pre-contracted with phenylephrine. Crude extracts of *C. glaziovii* leaves were partitionated by extraction with immiscible solvents followed by column chromatography on Sephadex LH-20 and the obtained fractions were characterized by their HPLC profiles, flavonoid and proanthocyanidin contents, as well vasorelaxant acivity. The results confirm the effect of flavonoid and proanthocyanidin in the vasorelaxant activity but it seems they are not totally

responsible for the experimentally previously observed anti-hypertensive effect of *C. glaziovii* leaves. The similarities on the phytochemical and pharmacological profiles of *C glaziovii* and *Crataegus* suggest its possible use as a *Crataegus* substitute.

CÁPITULO 1

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais incluem-se entre as plantas úteis, sendo empregadas diretamente na terapia ou na preparação de extratos, para a elaboração de produtos fitoterápicos, e como fontes de precursores para a síntese de princípios ativos. Além disso, muitas plantas fornecem materiais utilizados em formulações nas indústrias farmacêutica, de alimentos e cosmética (DE SMET, 1997; SIMÕES et al., 2000).

Muitos dos fármacos atuais são derivados, direta ou indiretamente de constituintes químicos de plantas superiores. Entretanto, muitas drogas vegetais foram substituídas pelos fármacos sintéticos, outras ganharam um novo espaço na pesquisa e na terapêutica, nos últimos anos. Além dos fármacos derivados de plantas, os fitoterápicos e as drogas vegetais têm um mercado em crescente expansão. A pesquisa em produtos naturais é freqüentemente guiada pelo conhecimento etnobotânico e pode contribuir de forma substancial para a inovação farmacêutica, provendo novas estruturas químicas e/ou mecanismos de ação (DE SMET, 1997)

São ainda relativamente escassos os estudos científicos sobre plantas medicinais, mas a informação etnomédica, quando se começa um processo de pesquisa na busca de novos princípios ativos, é importante. Nos últimos anos, graças ao renascimento do interesse pelas plantas medicinais, internacionalmente, estão sendo realizados esforços importantes para validar cientificamente o uso tradicional de plantas. A pesquisa sobre plantas medicinais é atraente, uma vez que o saber popular contribui para maior probabilidade de sucesso no desenvolvimento de fitoterápicos e de moléculas com atividade terapêutica, diminuindo, assim, os custos de P&D (FARNWORTH, 1996; SIMÕES et al., 2000; YUNES, PEDROSA & CECHINEL FILHO, 2001).

As plantas medicinais poderiam contribuir para o desenvolvimento científico e tecnológico da América Central e do Sul por meio de estudos multidisciplinares e sistemáticos da biodiversidade, incluindo o desenvolvimento de produtos fitoterápicos, que constitui uma linha de pesquisa importante. No momento, estão

disponíveis na literatura científica internacional resultados de pesquisas agrônômicas, botânicas, farmacognósticas, farmacológicas, químicas e tecnológicas de um número reduzido de espécies vegetais, se comparado com a biodiversidade existente. Além disso, ainda é bastante incompleto o conhecimento científico sobre aquelas plantas medicinais que vêm sendo estudadas.

Os extratos obtidos industrialmente devem ser elaborados a partir de material vegetal de qualidade garantida, mediante um processo em que estejam padronizados, pelo menos, os solventes e os métodos de extração, além das etapas de concentração, secagem e homogeneização, quando for o caso. Os métodos selecionados devem permitir a obtenção de um extrato com composição uniforme entre lotes (BONATI, 1991; SHARAPIN, 2000).

É reduzido o número de monografias de plantas medicinais latinoamericanas, o que torna de especial interesse a pesquisa neste campo. Uma vez que os estudos farmacológicos e fitoquímicos de *C. glaziovii* estão bastante avançados, escolheu-se esta espécie para realizar uma caracterização fitoquímica que contribua para a elaboração de monografias farmacopéicas e para o desenvolvimento de uma metodologia de obtenção de um extrato padronizado, enriquecido em flavonóides e proantocianidinas, classes de compostos envolvidos na atividade anti-hipertensiva atribuída popularmente e comprovada mediante estudos *in vitro*, em animais de laboratório *in vivo*, e em humanos (NICOLAU, et al., 1988; MORGES, et al. 1990; FRANCK, et al. 1996; FRANCK, 1998; LAPA et al., 1999; MATOS, 2000; LACAILLLE-DUBOIS et al., 2001; ROCHA, et al., 2002). Este extrato padronizado seria importante, tanto para pesquisas farmacológicas posteriores como para o desenvolvimento futuro de um fitoterápico.

Com este objetivo foram realizados, com folhas de *C. glaziovii*, ensaios farmacognósticos gerais, estudos de variação sazonal para detectar a variabilidade nos teores de flavonóides e proantocianidinas e a melhor época de colheita, perfis cromatográficos por HPLC e quantificação de três metabólitos por

HPLC. Realizaram-se, também, ensaios dirigidos à obtenção de extratos e frações de folhas de *C. glaziovii* enriquecidos em flavonóides e proantocianidinas, para os quais foi avaliada a atividade vasodilatadora em anéis de aorta de ratos.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a variabilidade no teor de flavonóides e proantocianidinas entre amostras de folhas de *Cecropia glaziovii* Snethl. provenientes de espécimens nativos e cultivados, coletadas nas épocas seca e chuvosa; identificar e quantificar alguns metabólitos secundários por HPLC; contribuir para a padronização de uma metodologia para a obtenção de um extrato enriquecido em flavonóides e proantocianidinas, a partir de lâminas foliares de *C. glaziovii* e avaliar o efeito vasorelaxante de diferentes extratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Determinar qualitativamente as classes de metabólitos secundários presentes em folhas de *C. glaziovii*.

2.2.2. Quantificar, por espectrofotometria no UV-VIS, o teor de polifenóis totais, taninos, proantocianidinas e flavonóides em lâminas foliares de folhas novas e maduras de *C. glaziovii*, provenientes de espécimens nativos e cultivados, coletadas nas épocas seca e chuvosa e avaliar a variação sazonal e intra-específica.

2.2.3. Avaliar a atividade vasorelaxante em anéis de aorta de ratos, previamente contraídos com extratos e frações de *C. glaziovii*, e a correlação desta com os teores de flavonóides e de proantocianidinas presentes.

2.2.4. Avaliar a influência do solvente e da metodologia de extração no teor de flavonóides e proantocianidinas em extratos de folhas de *C. glaziovii*.

2.2.5. Estabelecer e padronizar uma metodologia analítica para a identificação e quantificação por HPLC de alguns flavonóides presentes em *C. glaziovii*.

2.2.6. Determinar, por HPLC, o teor de alguns flavonóides em lâminas foliares de folhas novas e maduras de *C. glaziovii*, provenientes de espécimens nativos e cultivados, coletadas nas épocas seca e chuvosa.

2.2.7. Determinar os perfis por HPLC de extratos brutos, extratos semipurificados e frações oriundas de extratos brutos de *C. glaziovii*, identificando marcadores químicos e/ou farmacológicos.

CAPÍTULO 3

REVISÃO DA LITERATURA

3.1. IMPORTÂNCIA DOS FITOTERÁPICOS NOS DIAS ATUAIS

A OMS define os medicamentos fitoterápicos como produtos medicinais acabados e etiquetados cujos ingredientes ativos são constituídos por partes aéreas ou subterrâneas de plantas ou outros materiais vegetais e combinações destes, em estado bruto ou na forma de preparações fitoterapêuticas (pó de planta, extratos, tinturas, óleos, etc.), entendendo-se por material vegetal os sucos, resinas, óleos graxos, óleos essenciais, ou qualquer outro material desta natureza. Os medicamentos fitoterápicos podem conter adjuvantes de formulação, além dos princípios ativos. Não se consideram medicamentos fitoterápicos aqueles que contêm o material vegetal combinado com substâncias ativas, quimicamente definidas, inclusive componentes isolados de plantas. Excepcionalmente, em alguns países, os fitoterápicos podem conter, conforme a tradição, ingredientes ativos naturais, orgânicos ou inorgânicos que não sejam de origem vegetal (WHO, 2002a).

As drogas de origem vegetal são um sistema multicomponente constituído, basicamente, por três tipos de substâncias: os compostos ativos, os compostos auxiliares e os compostos neutros. Entre os compostos ativos podem se diferenciar dois tipos, aqueles com atividade terapêutica conhecida e aqueles que são farmacologicamente relevantes, mas que não justificam a eficácia da preparação. Os compostos auxiliares não apresentam atividade terapêutica como tal, mas facilitam a biodisponibilidade dos princípios ativos. Assim, por exemplo, as saponinas podem modificar a tensão superficial no estômago, as substâncias amargas podem aumentar o peristaltismo e os taninos podem complexar os princípios ativos, que podem, posteriormente, ser liberados gradualmente (HARNISCHFEGGER, 1997; BUSSE, 2000; SHARAPIN, 2000).

Os fitomedicamentos são usados na terapia de uma variedade de doenças na prática médica. No entanto, uma limitação no emprego de fitoterápicos é o tratamento de doenças agudas ou severas, predominantemente tratadas no hospital, uma vez que, normalmente, não possuem uma ação farmacológica imediata ou marcante. Por isso, a maior parte das prescrições de fitoterápicos é

para o tratamento de doenças crônicas e para distúrbios da saúde de gravidade média (CALIXTO, 2000; REUTER, 1991).

Os fitoterápicos são comercializados, normalmente, como preparações padronizadas em formas líquidas, sólidas ou heterodispersas. As metodologias mais difundidas para a obtenção de extratos são a maceração, a percolação e, no caso de óleos voláteis, a hidrodestilação. Os solventes de eleição, particularmente para a produção de extratos fluidos, são etanol, água e misturas destes. Os extratos secos, muito difundidos, por apresentarem maior estabilidade e facilidade de armazenamento e transporte, são obtidos a partir dos extratos fluidos, por eliminação dos solventes empregados no processo de extração da droga vegetal. Os extratos secos podem conter adjuvantes. Alguns extratos são muito concentrados com o objetivo de garantir sua eficácia terapêutica. Por exemplo, o extrato seco padronizado de *Ginkgo biloba* (50:1), indica que 50 partes de material vegetal foram processados para obter uma parte do extrato seco padronizado. Neste processo, é possível remover, quando necessário, alguns metabólitos secundários presentes nas plantas, que possam produzir efeitos secundários indesejados (CALIXTO, 2000; SCHULZ, HÄNSEL & TYLER, 2002).

Comparados com os medicamentos preparados com fármacos sintéticos, os fitoterápicos apresentam marcadas diferenças, entre as quais citam-se:

- os princípios ativos são freqüentemente desconhecidos;
- os processos de padronização, estabilização e controle de qualidade são viáveis, mas nem sempre fáceis de serem executados;
- a disponibilidade e a qualidade da matéria prima são, freqüentemente, problemáticas;
- são escassos os estudos toxicológicos e clínicos duplo cego, rigorosamente controlados, que permitam provar sua eficácia e segurança;
- em geral, têm ampla variedade de usos terapêuticos e são adequados para tratamentos crônicos;

- a frequência de efeitos secundários indesejados parece ser menor com fitoterápicos, mas estudos clínicos aleatorizados e controlados tem revelado que estes podem existir;
- usualmente têm preços menores que os medicamentos a base de fármacos sintéticos (CALIXTO,2000).

A análise da literatura especializada revela que, com fitoterápicos, poucos estudos clínicos duplo cego, controlados, têm sido realizados. A falta de padronização e controle de qualidade dos fitoterápicos usados em ensaios clínicos é um dos fatores que poderiam explicar este fato (CALIXTO, 2000).

3.2. O MERCADO DOS PRODUTOS FITOTERÁPICOS

A produção e emprego de fitoterápicos não são um modismo dos últimos anos, como é demonstrado pelas cifras de exportação e consumo interno, e ainda pelo incremento notável no número de monografias farmacopêicas publicadas nas últimas edições das Farmacopéias oficiais (Brasileira, Britânica, Européia, Internacional, dos Estados Unidos, etc.), além da publicação da *British Herbal Pharmacopoeia* (HARNISCHFEGER, 1997; SHARAPIN, 1999) e das monografias da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1999 e 2002b).

A maioria das companhias líderes, especializadas em fitoterápicos, estão localizadas na Alemanha, França, Itália e Suíça. Algumas delas têm mais de 100 anos de funcionamento. Um grupo de companhias farmacêuticas multinacionais comercializa fitoterápicos em vários países, os quais são produzidos por companhias pequenas, especializadas em fitoterápicos (GRÜNWALD, 1995).

Tanto em países industrializados, como naqueles em desenvolvimento, o emprego das plantas medicinais e de produtos a base destas, mantém-se em crescimento nos últimos anos. Desde 1985 o mercado mundial dos fitoterápicos tem tido um crescimento, que varia de 5% a 18% por ano. Este fato tem incrementado, significativamente, o mercado internacional de ervas medicinais e

tem atraído a maioria das indústrias farmacêuticas, incluindo as multinacionais. Até poucos anos atrás, somente algumas companhias tinham interesse no mercado de plantas medicinais. Atualmente, as maiores companhias multinacionais estão interessadas em comercializar fitoterápicos levando à aquisição de pequenas companhias especializadas em produtos fitoterapêuticos (GRÜNWALD, 1995; CALIXTO, 2000).

O mercado anual de medicamentos fitoterápicos, no mundo, ultrapassa US\$ 20 bilhões. Europa Ocidental, América do Norte, Japão e China utilizam aproximadamente 400 plantas medicinais, que constituem cerca do 90% do mercado mundial. A Alemanha é responsável por cerca de 50% do mercado da União Européia, ultrapassando US\$ 3,5 bilhões de vendas anuais. Em segundo lugar está a França, com US\$ 1,8 bilhões e mais de 25% do mercado da UE, seguido de Itália, Espanha, Holanda e Bélgica (GRÜNWALD, 1995; SHARAPIN, 1999; CALIXTO, 2000). O mercado forte na Europa se explica pela aceitação histórica, uma vez que a prescrição e o emprego de produtos fitoterápicos faz parte da cultura européia, unido ao alto percentual de reembolso concedido aos fitoterápicos pelas companhias de seguros de saúde. Enquanto na Alemanha e na França, 40% de todos os fitoterápicos são reembolsados, no Reino Unido, EUA e Canadá só alguns laxantes, com base em plantas, são reembolsados (DE SMET et al., 2000; GRÜNWALD, 1995).

Várias companhias farmacêuticas européias, produtoras de fitoterápicos, localizadas na Suíça, Alemanha, Itália, Reino Unido, França, Israel e Estados Unidos constituíram a Coalizão de Fitoterápicos Européia-Americana (EAPC), com o objetivo de negociar, em conjunto, a entrada e permanência no mercado dos fitoterápicos nos EUA (BLUMENTHAL, 1993; GRÜNWALD, 1995).

Na Ásia, as vendas de plantas medicinais e fitoterápicos ultrapassaram US\$ 4,5 bilhões de dólares anuais, sendo que cerca de US\$ 2 bilhões correspondem ao Japão. É bom lembrar que neste continente se praticam, em paralelo, as terapêuticas convencionais e as complementares (GRÜNWALD, 1995).

Nos EUA, o mercado dos fitoterápicos se dá, principalmente com a denominação de suplementos alimentares, e corresponde a cerca de US\$ 5 bilhões anuais (CALIXTO, 2000).

Com relação à comercialização de fitoterápicos na América Latina, não se dispõe de estatísticas de vendas. Muitos dos produtos comercializados são estrangeiros e boa parte destes entram de forma ilegal, não sendo contabilizados oficialmente. Além dos fitoterápicos produzidos por laboratórios registrados, existe a fabricação e comercialização de produtos sem licenciamento, muitas vezes sem a qualidade própria de um medicamento (GARCIA et al., 1994; DIAZ, 2003).

Em nosso meio, o setor médico tem ainda receio de prescrever fitoterápicos. Além disso, a difusão destes produtos em vademécuns é quase nula, apesar de existir um bom número de produtos registrados. Poucos fitoterápicos são prescritos pelos médicos devido a pouca confiança na qualidade, eficácia e segurança desta classe de medicamentos. Além disso, os cursos de medicina, na sua maioria, ainda oferecem pouca informação sobre fitoterapia. Cabe ressaltar que a maioria das preparações fitoterapêuticas registradas na América Latina, correspondem a plantas exóticas.

3.3. ASPECTOS REGULATÓRIOS E DE REGISTRO DE FITOTERÁPICOS

O processo legal de regulação e legislação de fitoterápicos muda de país para país. A regulação de fitoterápicos está caracterizada por grandes diferenças, dependendo das experiências etnobotânica, médica e histórica de cada país, sendo influenciada por aspectos culturais e pelo fato de que poucas preparações fitoterápicas têm estudos científicos para avaliação da sua segurança e eficácia (BENZI & CECI, 1997; CALIXTO, 2000).

Existem diversos modelos regulatórios para fitoterápicos, incluindo medicamentos para prescrição, produtos OTC (*over the counter*), medicações tradicionais e suplementos dietéticos. Por isso, é preciso estabelecer mecanismos legais, regionais ou globais, para a regulamentação desta classe de produtos. É desejável, e necessário, melhorar os processos regulatórios e uma harmonização global. Uma tendência geral é ter como base a experiência da Alemanha e da sua Comissão E, que combina dados científicos e conhecimento tradicional, em suas monografias (WHO, 1998a; CALIXTO, 2000).

A OMS tem publicado guias para o estudo de plantas medicinais, buscando apoiar os organismos regulatórios nacionais, as instituições científicas e os fabricantes de fitoterápicos. O guia da OMS para a avaliação de fitoterápicos, adotado pela Conferência das Autoridades Regulatórias de Drogas (Ottawa, 1991), contém os elementos legislativos básicos para apoiar os países interessados em desenvolver uma legislação e um processo de registro apropriados para os fitoterápicos (BENZI & CECI, 1997; CALIXTO, 2000). Além disso, a OMS publicou um conjunto de monografias de plantas medicinais (WHO, 1999 e 2002b).

Na União Européia está sendo conduzido um processo de harmonização da legislação de fitoterápicos, sendo as principais dificuldades as diferenças encontradas na classificação como medicamento ou como suplemento dietético, as indicações terapêuticas e as doses utilizadas nos diferentes países. O processo de harmonização busca, além de uniformizar indicações, doses e formas de uso, estabelecer requisitos comuns para o registro deste tipo de medicamentos, de tal forma que se possa garantir segurança, eficácia e qualidade. Dentro deste processo, tem se desenvolvido e harmonizado monografias das plantas medicinais empregadas na Europa. Paralelamente, está ocorrendo um processo de harmonização entre a União Européia, o Japão e os EUA (WHO, 1998a).

Na América Latina, estabeleceram-se legislações que se adaptam tanto às condições de cada país como às exigências de eficácia, segurança e qualidade. Na maioria dos países, as novas legislações definem os fitoterápicos como

medicamentos, exigindo para o registro, basicamente, os mesmos parâmetros que para um medicamento à base de fármacos sintéticos (WHO, 1998a).

No Brasil, têm sido realizados esforços para estabelecer critérios de qualidade, segurança e eficácia destes produtos. Em 1994, o Ministério da Saúde criou uma comissão para avaliar a situação dos produtos fitoterápicos no Brasil. Esta comissão propôs uma diretriz baseada, principalmente, nas legislações alemã e francesa e no guia da OMS para fitoterápicos. Em 1995, a Portaria SVS Nº 6 estabeleceu os requisitos legais para medicamentos à base de plantas e definiu como produto fitoterápico todo medicamento processado contendo, como princípio ativo, exclusivamente material vegetal e/ou preparações a base de plantas. Estas preparações têm o objetivo de tratar, curar, aliviar, prevenir ou diagnosticar doenças. Os requisitos legais para o registro de fitoterápicos no Brasil requerem completa documentação que sustente sua eficácia, segurança e controle de qualidade bem definidos. Para fitoterápicos já registrados, a lei estabeleceu um prazo de 5 a 10 anos para a comprovação de sua segurança e eficácia, respectivamente (CALIXTO, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

A Resolução da Diretoria Colegiada RDC ANVISA Nº 17 de 2000, que revogou a Portaria SVS Nº 6 de 1995, redefiniu esta classe de medicamentos como “medicamento fitoterápico”, em lugar de “produto fitoterápico”, além disso, estabeleceu uma classificação em categorias com diferentes critérios de registro: medicamento fitoterápico novo, medicamento fitoterápico de referência, medicamento fitoterápico similar e medicamento fitoterápico tradicional (SIMÕES, et. al., 2001).

A Resolução anterior foi revogada pela Resolução RDC ANVISA Nº 48 de 2004 que esclarece que as plantas medicinais ou suas partes não são objeto de registro ou cadastro; exclui algumas definições como medicamento fitoterápico novo, medicamento fitoterápico tradicional, medicamento fitoterápico similar e inclui definições como fórmula fitoterápica, fórmula mestra, medicamento, nomenclatura botânica oficial completa. O fitoterápico é definido como: “Medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso,

assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações técnico-científicas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais.” Esta Resolução exige, para o registro, um relatório com informações técnicas, contendo, dentre outros, relatórios completos de produção, controle de qualidade para droga vegetal, derivado de droga vegetal e produto acabado; bula, modelo de rótulo e embalagem, prazo de validade, de acordo com os estudos de estabilidade, além do certificado de Boas Práticas de Fabricação e Controle. A segurança de uso e as indicações terapêuticas podem ser validadas por meio de três opções diferentes que incluem informação bibliográfica ou estudos toxicológicos e farmacológicos. Pode-se solicitar um registro simplificado, se o fitoterápico está na lista estabelecida para tal fim e cumpre as especificações citadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE & ANVISA, 2004).

3.4. CONTROLE DE QUALIDADE E MONOGRAFIAS FARMACOPÉICAS

Os produtos de origem vegetal utilizados como medicamentos necessitam do controle de qualidade tanto de suas matérias primas (plantas), quanto do produto tecnologicamente acabado (fitoterápico). Garantir a qualidade dos fitoterápicos, além de contribuir para a eficácia e segurança do produto, resulta na melhor aceitação deste tipo de medicamento pela classe médica que os prescreve, e propicia confiabilidade naqueles que os venham a consumir (BUSSE, 2000; HARNISCHFEGER, 1997; SHARAPIN, 1999; BIODIVERSITY ... , 2000).

Paralelamente ao desenvolvimento, otimização e padronização de metodologias extrativas e de semipurificação devem ser desenvolvidos métodos de controle de qualidade, tanto para o material vegetal como para o extrato (HARNISCHFEGER, 1997; SHARAPIN, 2000; BIODIVERSITY ... , 2000).

Para o desenvolvimento de monografias farmacopéicas é necessário compilar dados de caracterização qualitativa e quantitativa, que permitam estabelecer os ensaios a serem realizados e seus limites de aceitação. As monografias farmacopéicas de drogas vegetais (Brasileira, 4.ed., Britânica,1993; Britânica Herbal, 1996; Européia 3. ed.; Francesa, 10. ed.; Japonesa, 12. ed.; Internacional 3. ed. e U.S.P. 27) estão divididas, de forma geral, em descrição, testes de identificação, testes de pureza, ensaios de quantificação e condições de armazenamento. Em alguns casos descrevem-se os usos aceitos.

A descrição da droga é feita mediante:

- nome farmacopéico,
- o nome em latim, em algumas Farmacopéias (Brasileira, Britânica Herbal, Francesa, Internacional, Japonesa e Européia),
- nomes comuns em algumas Farmacopéias (Britânica Herbal),
- a definição do que é considerado a droga correspondente, incluindo o nome da(s) espécie(s) que podem ser empregadas e, às vezes, a família botânica à qual pertence a espécie, a(s) parte(s) da planta utilizadas e, em alguns casos, o teor do(s) marcador(es) ou princípio(s) ativo(s) e informações sobre colheita ou fontes geográficas.

Os itens relacionados à identidade incluem:

- as características organolépticas, tanto macroscópicas quanto microscópicas do material inteiro e do pó,
- testes, em tubo de ensaio e/ou por CCD, para as classes de compostos presentes.

Os testes de pureza exigidos variam de droga para droga, sendo os mais comuns os seguintes:

- material estranho,
- perda por secagem ou teor de água,
- teor de cinzas totais,
- teor de cinzas insolúveis em ácido,
- contaminação microbiana,

- resíduos de elementos potencialmente tóxicos: metais pesados, pesticidas, micotoxinas e resíduos radioativos, principalmente.

Os ensaios de quantificação se referem à determinação de classes de substâncias responsáveis pelo efeito terapêutico (ex. alcalóides totais, óleos essenciais, etc.), marcador(es) ou substância(s) ativa(s), quando conhecidos; quando não conhecidos determinam-se teores de extrativos por diferentes solventes, índice de amargor, etc.

Quando uma monografia oficial não é disponível para uma planta de interesse, esta deve ser desenvolvida com base em informação científica e seguindo, como padrão, o formato das monografias existentes.

A OMS propõe um guia para o controle de qualidade do material vegetal, o qual, além de citar os ensaios recomendados, indica uma metodologia para sua realização. Cada país tem a liberdade de adotá-la na sua legislação, de acordo com suas perspectivas e necessidades (WHO, 1998b).

A Portaria Nº 6 de 31 de janeiro de 1995, do Ministério da Saúde, nos itens correspondentes à avaliação da matéria prima vegetal, menciona os seguintes ensaios:

- Testes de autenticidade: caracterização organoléptica, identificação macroscópica e microscópica.
- Testes de pureza e integridade: cinzas, cinzas insolúveis em ácido, umidade, pesquisa de matérias estranhas, pesquisa de contaminantes microbiológicos e metais pesados, de acordo com a Farmacopéia Brasileira ou com as recomendações da Organização Mundial da Saúde.
- Análise qualitativa e quantitativa de princípios ativos, quando conhecidos
- Análise fitoquímica qualitativa dos constituintes característicos da espécie.

A Resolução RCD Nº 17 de 24 de fevereiro de 2000 exige os mesmos ensaios de controle de qualidade de matéria-prima, anteriormente descritos, excetuando a análise fitoquímica qualitativa dos constituintes característicos da espécie.

Para os ensaios de controle de qualidade para a droga vegetal, a Resolução RDC Nº 48 de 16 de março de 2004 do Ministério da Saúde remete às Farmacopéias reconhecidas pela ANVISA, podendo empregar-se, também, outras metodologias se estas estão adequadamente descritas e validadas. Nesta Resolução, se mencionam os seguintes ensaios:

- Testes de autenticidade: caracterização organoléptica, identificação macroscópica e microscópica.
- Testes de pureza e integridade: cinzas, cinzas insolúveis em ácido clorídrico, umidade, pesquisa de matérias estranhas, pesquisa de contaminantes microbiológicos e de metais pesados.
- Análise qualitativa e quantitativa de princípios ativos e/ou marcadores, quando conhecidos, ou classes de compostos químicos característicos da espécie.

Para o produto acabado, da mesma forma que as legislações anteriores, a Resolução RDC Nº 48/2004, exige o relatório descritivo de fabricação e controle de qualidade e solicita, adicionalmente, a apresentação de resultados de prospecção fitoquímica ou perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia gasosa, quando cabível.

3.5. AS PLANTAS MEDICINAIS COMO MATÉRIA-PRIMA PARA A ELABORAÇÃO DE FITOTERÁPICOS

Uma planta pode conter centenas ou milhares de constituintes, alguns presentes em concentrações muito baixas. Mesmo com a disponibilidade das técnicas analíticas modernas, é muito raro que uma pesquisa fitoquímica pretenda o isolamento e caracterização de todos os metabólitos secundários presentes em um extrato vegetal (CALIXTO, 2000). Além disso, os constituintes químicos das plantas variam consideravelmente, dependendo de fatores genéticos, climáticos e edáficos, técnicas de cultivo, condições de colheita e de manejo pós-colheita, o

que reduz a qualidade dos agentes fitoterápicos (BAUER, 1998; CALIXTO, 2000; SHARAPIN, 2000; ELDIN & DUNFORD, 2001).

O controle de qualidade e a padronização de fitoterápicos envolvem algumas etapas. No entanto, a origem e a qualidade das matérias primas desempenham um papel preponderante na qualidade e estabilidade dos fitoterápicos (BAUER, 1998; CALIXTO, 2000). A composição química quali- e quantitativa pode variar de uma colheita para outra e, conseqüentemente, a qualidade e o valor terapêutico do fitoterápico. Algumas das variáveis que influenciam na composição e quantidade de metabólitos secundários disponíveis em uma matéria-prima vegetal são: clima (temperatura, regime de chuvas, fotoperíodo, intensidade de luz etc.), altitude, disponibilidade de água, nutrientes, idade da planta, exposição à microflora, insetos ou poluentes, época e hora da colheita, método de colheita, secagem, empacotamento, armazenagem. Outros fatores ainda devem ser considerados, tais como o emprego de planta fresca ou seca, transporte da matéria-prima vegetal, parte da planta coletada, etc., (BONATI, 1991; BRAGA, 1997; BRAGA et al., 1997; CALIXTO, 2000, FETROW & AVILA, 2000; MARTINS et al., 2000; SHARAPIN, 2000; ELDIN & DUNFORD, 2001; LEITE, 2002).

Algumas plantas contêm constituintes termolábeis. Este tipo de material vegetal deve secar-se a baixas temperaturas. Também, algumas substâncias ativas são destruídas por processos enzimáticos que continuam por algum tempo depois da colheita da planta. Este é mais um fator que explica porque, freqüentemente, a composição de fitoterápicos pode ser bastante variável (CALIXTO, 2000).

Pelo anteriormente exposto, fica evidente que uma adequada padronização e controle de qualidade da matéria prima vegetal e dos fitoterápicos deve ser levada a cabo continuamente. No caso em que as substâncias ativas não são conhecidas, podem estabelecer-se substâncias marcadoras, os marcadores químicos, para fins analíticos. No entanto, na maioria das vezes, não se avalia a contribuição destes para a atividade terapêutica atribuída ao fitoterápico (BUSSE, 2000; CALIXTO, 2000).

De acordo com a OMS, 70 a 90% das plantas utilizadas medicinalmente, seja como tal ou como matéria-prima para a elaboração de fitoterápicos, são coletadas em seu habitat natural. O extrativismo pode levar a uma superexploração de espécies endêmicas, com uma conseqüente redução ou eliminação de populações locais e diminuição da variabilidade genética, destruição desnecessária de plantas durante a colheita, coleta de uma espécie vegetal diferente daquela desejada, mistura com material vegetal estranho, etc. A matéria prima vegetal que provém de extrativismo apresenta alta variabilidade em relação ao conteúdo dos compostos ativos e secundários. Para manter constante a composição de um fitoterápico é necessário dispor de plantas coletadas em diferentes áreas que são misturadas para, assim, garantir a homogeneidade da matéria-prima. Usualmente as plantas nativas distribuem-se de forma dispersa, e, às vezes, crescem em lugares de difícil acesso. Pelos motivos antes expostos, é conveniente obter-se a matéria-prima para os produtos fitoterápicos de cultivos que certifiquem a qualidade do material vegetal (SHARAPIN, 2000).

Têm-se dado muita ênfase na domesticação, produção, estudos biotecnológicos e melhoramento genético de plantas medicinais. A tendência à domesticação e cultivo de plantas medicinais, para substituir plantas nativas, está relacionada com as vantagens do cultivo, entre estas a possibilidade de prover matéria-prima vegetal mais uniforme e de melhor qualidade. A maior uniformidade da matéria-prima vegetal proveniente de cultivo, unida à segurança na identidade da planta e ao baixo risco de adulteração e contaminação contribui para o desenvolvimento de fitoterápicos de qualidade uniforme. Além disso, o cultivo permite melhorar a qualidade da matéria-prima vegetal, uma vez que pode levar-se a cabo seleção genética e produzir plantas medicinais resistentes a doenças, livres de metabólitos indesejados ou ricas nos constituintes bioativos (CALIXTO, 2000).

As companhias farmacêuticas preferem empregar plantas cultivadas em vez de plantas nativas, uma vez que as cultivadas apresentam menores variações em seus constituintes. Adicionalmente, quando as plantas medicinais são produzidas

por cultivo podem monitorar-se os principais metabólitos secundários, o que permite a definição da melhor época para a colheita (CALIXTO, 2000).

Além dos fatores que influenciam na composição do material vegetal, outros, tais como o método de extração e a contaminação com microorganismos, pesticidas, metais pesados, etc., podem interferir na qualidade, eficácia e segurança dos fitoterápicos (BAUER, 1998; CALIXTO, 2000).

Os recentes avanços nos processos de isolamento, purificação e elucidação estrutural de substâncias de origem natural têm permitido estabelecer metodologias apropriadas para a análise da qualidade e para o processo de padronização visando manter, na medida do possível, a homogeneidade dos extratos vegetais e dos fitoterápicos. Técnicas como cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), as espectrometrias de massas, no infravermelho, no ultravioleta-visível e ressonância magnética nuclear, empregadas isoladamente ou em combinação, podem ser úteis tanto para a padronização quanto para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal, dos extratos intermediários e do produto acabado (fitoterápico). O acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) a um detector ultravioleta com arranjo de diodos (LC-UV/DAD) ou a um espectrômetro de massas (LC-MS) resultou em equipamentos de alto poder analítico, indispensáveis, atualmente na análise de matrizes complexas como os extratos vegetais e os fitoterápicos. As técnicas acopladas, também chamadas de hífenadas, por causa do hífen entre as abreviaturas do nome de cada uma, representou um avanço na análise de extratos vegetais, uma vez que o espectrômetro de massas é um detector universal de alta sensibilidade e fornece a massa molecular de cada constituinte (HOSTETTMANN & WOLFENDER, 1997; RODRIGUES FILHO, 2000; LANÇAS, 2003).

LC-MS raramente é utilizada para caracterização estrutural o que é, no entanto, possível com técnicas especiais como, por exemplo, o acoplamento de HPLC com espectrometria de massa de ionização por “electrospray” (LC-MS/EI) que tem sido utilizada na análise de glicosídeos de flavonóides (CUYKENS & CLAEYS, 2004). Uma metodologia otimizada para detecção simultânea por

ultravioleta e massa (LC-MS/EI-UV/DAD) foi empregada com sucesso na análise de um extrato comercial de *Crataegus* conseguindo-se caracterizar os flavonóides presentes no extrato, para alguns dos quais não eram disponíveis amostras de referência (CUYCKENS & CLAEYS, 2002).

O acoplamento de HPLC com ressonância magnética nuclear (LC-NMR) constitui um dos métodos mais eficientes para a separação e elucidação estrutural de produtos naturais inéditos presentes em extratos, sem a necessidade do isolamento prévio (WOLFENDER, NDJOKO & HOSTETTMANN, 2001).

Estas metodologias permitem uma análise rigorosa de extratos vegetais e, portanto, viabilizam o desenvolvimento de fitoterápicos com garantia de qualidade.

3.6. EXTRAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS

Na preparação de um extrato vegetal se busca retirar, da forma mais seletiva e completa possível, as substâncias, ou fração ativa, contida no material vegetal, utilizando-se um solvente ou uma mistura de solventes. Apesar da ampla variedade de solventes conhecidos, são poucos os que podem ser utilizados na obtenção de extratos vegetais. Esta limitação de uso é devida a três aspectos principais: propriedades extrativas (eficiência e seletividade), adequação tecnológica (ponto de ebulição, formação de misturas azeotrópicas, inflamabilidade, corrosão, entre outros) e baixa toxicidade. Pelos fatores mencionados, os solventes usualmente empregados para a obtenção dos extratos brutos são misturas de água-etanol. Quando se empregam solventes potencialmente tóxicos, como metanol, deve certificar-se que o extrato seco cumpre com os limites de solvente residual permitidos (BAUER, 1998; SHARAPIN, 2000; SIMÕES et al., 2000).

Com uma escolha apropriada do solvente e processo extrativo é possível obter-se, desde o início, um extrato rico nas substâncias de interesse e com baixo

teor das não desejadas, o que se refletirá na atividade farmacológica do extrato obtido. Extratos com diferentes composições podem ser obtidos variando-se a polaridade do solvente e/ou a metodologia de extração (BAUER, 1998; SHARAPIN, 2000; SIMÕES et al., 2000; VIERLING et al., 2003; ENDALE, SCHMIDT & GEBRE-MARIAM, 2004).

Além da técnica extrativa e dos solventes a serem empregados, fatores como umidade residual e distribuição de tamanho de partículas do material vegetal, a temperatura durante a extração, a relação droga vegetal/solvente, o tempo de contato do material vegetal com o solvente e o procedimento empregado na concentração do extrato influenciam, de forma significativa, na composição qualitativa e quantitativa do extrato obtido. O solvente de extração determina a classe de compostos que serão extraídos; a temperatura influencia na solubilidade destes compostos; o tamanho de partícula do material vegetal modifica o contacto e, por isso, o tempo necessário para alcançar o equilíbrio, a umidade residual afeta o grau de diluição do solvente extrator e da relação droga/solvente depende o nível de saturação alcançado. A concentração do extrato deve ser feita por um método que não afete a estabilidade dos princípios ativos. Na otimização e padronização do processo extrativo é importante avaliar tanto o efeito de cada um destes fatores quanto a inter-relação entre os mesmos (BOTANICAL PATHWAYS, 1997; HARNISCHFEGER, 1997; SHARAPIN, 2000; ENDALE, SCHMIDT & GEBRE-MARIAM, 2004).

Os processos extrativos e de concentração devem permitir a obtenção de extratos com composição uniforme e com propriedades farmacotécnicas (forma e tamanho das partículas, densidade, propriedades de fluxo e de compactabilidade, higroscopicidade, etc.) adequadas aos produtos fitoterápicos em que serão utilizados. Podem se adicionar excipientes para aumentar a estabilidade do extrato, facilitar os processos farmacêuticos posteriores e/ou diluir o extrato até o teor de constituintes ativos desejado (BONATI, 1991; HARNISCHFEGER, 1997; SHARAPIN, 2000; ENDALE, SCHMIDT & GEBRE-MARIAM, 2004).

A escolha das metodologias a serem empregadas está intimamente relacionada com os equipamentos disponíveis, a matéria-prima vegetal, o solvente e o tipo de compostos a serem extraídos. Na medida do possível, os equipamentos selecionados devem ser versáteis e de fácil limpeza e manutenção. Uma vez definidos o solvente, a metodologia e os equipamentos mais adequados para a matéria-prima disponível e para o produto desejado o processo deve ser otimizado e, posteriormente, padronizado, para assim poder assegurar a uniformidade entre lotes (SHARAPIN, 2000; SIMÕES et al., 2000).

Há uma tendência mundial para a utilização de extratos padronizados, seja como fitoterápicos, seja como matéria prima para a elaboração deste tipo de medicamento. A padronização assegura a uniformidade na composição química do extrato e, conseqüentemente, a uniformidade na atividade de diferentes lotes. Em estudos farmacológicos, toxicológicos e clínicos com drogas vegetais ou seus derivados, a composição deve estar bem documentada para se obter resultados reprodutíveis. Os extratos padronizados são, portanto, necessários para a realização de ensaios clínicos confiáveis (BONATI, 1991; HARNISCHFEGGER, 1997; BOTANICAL PATHWAYS, 1997; BAUER, 1998; SHARAPIN, 1998; VIÉRLING et al., 2003).

Pela complexidade na composição das drogas vegetais, a padronização de um extrato envolve o conjunto de informações e controles que garantam a uniformidade na qualidade, em cada etapa, desde o crescimento da planta medicinal até a obtenção do extrato, e não só a garantia do conteúdo de um ou mais constituintes ativos ou marcadores (BONATI, 1991; BOTANICAL PATHWAYS, 1997; BAUER, 1998).

Como já foi considerado, diferentes processos de manufatura podem conduzir a extratos com diferente composição, o que pode repercutir na equivalência farmacêutica e farmacológica dos medicamentos fitoterápicos. A padronização do método de produção (tamanho de partícula do pó, relação planta / solvente, tipo de extração, solvente extrator, condições de concentração, processos de purificação, adição de excipientes, etc.) e das condições de armazenamento são

requisitos básicos para a garantia da reprodutibilidade e qualidade de preparações fitoterápicas. Ainda, fatores como origem, coleta, secagem e condições de armazenamento e transporte influenciam a qualidade da matéria-prima vegetal, por isso devem ser, também, padronizados para garantir uma matéria-prima de qualidade uniforme (BONATI, 1991; BOTANICAL PATHWAYS, 1997; BAUER, 1998; VIERLING et al., 2003).

Os extratos podem ser padronizados com relação a uma ou mais substâncias ativas ou a um grupo de substâncias reconhecidas como responsáveis pela ação terapêutica, como por exemplo, flavonóides. A concentração do composto, ou grupo de compostos, no extrato padronizado será específica para a ação terapêutica pretendida (BOTANICAL PATHWAYS, 1997; HARNISCHFEGGER, 1997; BAUER, 1998).

Dependendo do conhecimento disponível em relação aos constituintes ativos da planta, se aceitam dois critérios para a padronização dos extratos e preparações fitoterápicas, concentração de substância(s) ativa(s) ou concentração de marcadores químicos. Os extratos ou preparações nas quais os constituintes responsáveis pela atividade (substâncias ativas) são conhecidos e aceitos pode ser feita a normalização, ajustando-se a concentração das substâncias ativas, adicionando-se auxiliares de formulação ou misturando-se o lote obtido, com lotes mais diluídos ou mais concentrados nas substâncias ativas. Neste caso, os ensaios de estabilidade são obrigatórios e os testes de dissolução e de biodisponibilidade, são possíveis. Quando os compostos ativos ainda são desconhecidos, o extrato como um todo, deve ser considerado a “substância ativa” e marcadores químicos devem ser utilizados para o controle de qualidade. Estas preparações não podem ser normalizadas no marcador, uma vez que este pode não estar relacionado com a atividade terapêutica. O marcador é uma ferramenta analítica para o controle de qualidade e para provar consistência e reprodutibilidade entre lotes. Somente quando os marcadores tenham mostrado atividade farmacológica relevante se justifica a caracterização e inclusão desta informação na etiqueta do produto acabado. Nestes tipos de extratos os ensaios de estabilidade são difíceis de realizar, uma vez que não se conhecem as

substâncias ativas. A análise dos perfis cromatográficos é aceita como um método apropriado, mas pode não mostrar os princípios ativos. Os testes de dissolução *in vitro* têm significado questionável e os ensaios de biodisponibilidade não são razoáveis (BONATI, 1991; HARNISCHFEGER, 1997; BAUER, 1998).

A padronização de extratos apresenta uma série de vantagens, entre as quais estão:

- consistência na composição química e assim, reprodutibilidade do efeito terapêutico, maior grau de segurança e maior exatidão na prescrição;
- uniformidade de potência entre diferentes lotes, eliminando-se as variações que podem ocorrer por emprego de material vegetal de diferentes origens, período de colheita, manejo pós-colheita, entre outros;
- possibilidade de se empregar diferentes concentrações das substâncias ativas, tanto nos ensaios como nos produtos farmacêuticos, sem a necessidade de purificação dos mesmos;
- garantia de reprodutibilidade nos estudos farmacológicos e toxicológicos;
- os extratos padronizados são necessários para a realização de estudos clínicos confiáveis;
- o extrato mantém a complexidade típica de um produto natural, mas permite a garantia de teores de certos compostos importantes;
- tem-se relatado casos em que se observa maior atividade de um extrato que a quantidade equivalente da substância a qual se atribui a resposta terapêutica, o que se explica pelo sinergismo com outros metabólitos secundários presentes no extrato;
- o controle de qualidade extensivo assegura a qualidade e a segurança dos extratos padronizados;
- o emprego de extratos padronizados contribui para a equivalência farmacêutica e farmacológica dos medicamentos fitoterápicos (BOTANICAL PATHWAYS, 1997; HARNISCHFEGER, 1997; BAUER, 1998; SHARAPIN, 1998).

3.7. EXTRATOS SEMI-PURIFICADOS

Um extrato ativo, pode ser parcialmente purificado, visando aumentar sua concentração nas substâncias responsáveis pelo efeito terapêutico. Comparada com o isolamento das substâncias, a obtenção de um extrato semipurificado, enriquecido nas substâncias de interesse, e padronizado, é menos dispendiosa e pode ser usado com segurança e confiabilidade na preparação de produtos fitoterápicos e, desta forma, os recursos são otimizados (BONATI, 1991; HARNISCHFEGGER, 1997; PLANTAS... , 1999; SHARAPIN, 2000).

O principal objetivo de se dispor de um extrato enriquecido nos princípios ativos está na maior potência deste. Além disso, um extrato semipurificado apresenta menor teor dos constituintes não ativos, em relação ao extrato bruto, o que pode reduzir fatores de instabilidade tanto do extrato como da preparação farmacêutica que o contenha, além de facilitar as análises quali e quantitativas.

A obtenção de um extrato semi-purificado pode ser realizada de diversas formas, aproveitando-se as propriedades das substâncias ativas, tais como polaridade e solubilidade. As metodologias mais amplamente empregadas para a purificação são a partição entre solventes imiscíveis e as técnicas cromatográficas (HARBORNE, 1989).

A partição com solventes imiscíveis baseia-se nas diferenças em solubilidade (coeficientes de partição) dos compostos presentes no extrato bruto. Empregam-se partições consecutivas, com solventes de diferentes polaridades, de tal forma que cada fração vai conter, em princípio, diferentes classes de compostos. As frações de solventes de baixa polaridade, como *n*-hexano ou éter de petróleo, conterão os compostos menos polares, as frações aquosas os mais polares e as frações de solventes de polaridades intermediárias, como acetato de etila, metanol, etanol conterão os compostos de polaridade média (HARBORNE, 1989; HARBORNE, 1998; SIMÕES, et al., 2001).

A cromatografia em coluna é muito utilizada para a obtenção de extratos semipurificados. Neste tipo de cromatografia a fase estacionária é sólida. Dispõe-se de diversos materiais que podem ser empregados como fase estacionária: sílica gel, sílica de fase reversa, alumina, amberlite, celulose, poliamida, Sephadex G e Sephadex LH-20, entre outros. A seleção da fase estacionária vai depender do tipo de substâncias presentes no extrato, tanto aquelas a purificar, quanto àquelas que não são de interesse e da proporção entre elas. Por exemplo, a sílica gel não é recomendada para purificar compostos altamente polares, para os quais a poliamida e a celulose são recomendadas. A sílica de fase reversa e o Sephadex LH-20 são recomendados para purificações finais, enquanto a sílica gel, a celulose e a poliamida se empregam, com muita frequência, com extratos brutos. Algumas fases estacionárias podem ser empregadas com solventes de baixa polaridade e com solventes polares (Sephadex da série G, sílica gel, celulose, poliamida etc.), no entanto, com outras se trabalham unicamente solventes de polaridades média e alta (Sephadex LH-20) (MARKHAM, 1982; HARBORNE, 1989; DE YOUNG, 1994).

3.8. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS

Glicosídeos de flavonas e flavonóis são compostos geralmente estáveis que podem ser extraídos do material vegetal seco e moído com solventes, a frio ou a quente. Os solventes de escolha são misturas de água com metanol, etanol ou acetona (1:5 a 1:1) sendo requerida uma menor proporção de água, por exemplo 1:5, se o material é fresco. Flavonas e flavonóis livres (agliconas), por serem menos polares, podem ser extraídos com solventes de menor polaridade, como éter etílico, clorofórmio e diclorometano. Os lípidos e ceras, que são extraídas concomitantemente, podem ser separados por cromatografia (HARBORNE, 1989).

Dentre as fases estacionárias empregadas com maior frequência para a separação cromatográfica de flavonóides citam-se:

⇒ celulose – ideal para a separação de glicosídeos entre si (mono-di-tri-glicosídeos) e das agliconas;

⇒ sílica gel – conveniente para a separação de compostos de baixa polaridade, como as agliconas (isoflavonas, flavanonas, flavonas metiladas, flavonóis e flavanóis); adequada também para separar biflavonóides;

⇒ poliamida – adequada para separar compostos de variada polaridade, este adsorvente é recomendado para a separação de todos os tipos de flavonóides, inclusive biflavonóides, sendo ideal para glicosídeos;

⇒ Sephadex da série G – separa misturas predominantemente pelo tamanho molecular, útil para poliglicosídeos de diferentes massas moleculares; podem ser usados, como fase móvel, tanto solventes orgânicos como aquosos;

⇒ Sephadex LH-20 – adequado para a purificação final de agliconas e glicosídeos de flavonóides, biflavonóides e isoflavonóides. Também separa por volume molecular, sendo empregados solventes de polaridades médias e altas, como fase móvel;

⇒ sílica de fase reversa, por exemplo RP-8 e RP-18, são de alto custo, sendo utilizadas para purificar glicosídeos contaminados por polissacarídeos solúveis;

⇒ amberlite XAD-7, um adsorbente polimérico, apresenta polaridade intermédia e adsorve fenóis tanto de sistemas aquosos como de solventes apolares como *n*-hexano. É adequado para a separação de flavonóides de compostos não fenólicos (MARKHAM, 1983; HARBORNE, 1989; DE YOUNG, 1994).

HARBORNE (1989) fez as seguintes recomendações para extração e purificação de proantocianidinas: tanto os metabólitos do ácido gálico como as proantocianidinas são extraídas adequadamente mediante turbólise, empregando-se misturas acetona-água; a acetona podendo ser recuperada por destilação sob

vácuo, a baixas temperaturas. Durante a extração de todas as classes de taninos, deve-se minimizar a exposição à luz e ao calor.

Se o extrato aquoso resultante contém baixo teor de proantocianidinas poliméricas ou material oxidado, pode-se aplicar diretamente na coluna de Sephadex LH-20 eluindo-se, inicialmente, com água e, depois, com misturas água-metanol, incrementando-se a proporção de metanol até 100% de metanol. Pelo contrário, se o extrato aquoso contém proantocianidinas poliméricas ou metabólitos do ácido gálico de alto peso molecular, em proporções consideráveis, este pode se extrair com acetato de etila para remover os compostos fenólicos de baixo peso molecular e, posteriormente, realizar uma partição entre *n*-butanol e água de tal forma que os taninos hidrolisáveis monoméricos ou diméricos residuais ficarão na fase *n*-butanólica. Catequina, epicatequina e proantocianidinas diméricas são muito solúveis em acetato de etila, enquanto que as proantocianidinas oligoméricas, até tetrâmeros, são apenas ligeiramente solúveis neste solvente. Separação e purificação das proantocianidinas individuais podem ser feitas em Sephadex LH-20, seguida, em alguns casos, de cromatografia em celulose, gel de poliestireno de alta porosidade e sílica de fase reversa C8, C18 ou ciano (HARBORNE, 1989).

3.9. *CECROPIA GLAZIOVII* E OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO



Pedro Magalhães, CPQBA, Campinas, S.P.

LORENZI, 2000

FIGURA 1. *Cecropia glaziovii* Sneathl.

3.9.1. OCORRÊNCIA E USO MEDICINAL

O gênero *Cecropia*, família Moraceae ou Cecropiaceae, é nativo da América tropical e inclui cerca de 100 espécies distribuídas desde o México até o Brasil. São conhecidas por diversos nomes populares sendo os mais comuns, no Brasil, imbaúba, embaúba, umbaúba, árvore-da-preguiça, pau-de-lixia, caixeta, imbaíba, ambaíba, ambaitinga, ambaú, ambaí, baibeira e torém. Outros nomes populares de espécies desta família são: guarumo e yarumo na Colômbia e no Equador, yongol no Peru e yagrumo na Venezuela. (PIO CORRÊA & PENNA, 1969; BERG, 1978; CRUZ, 1985; BERG, 1996; PÉREZ-ARBELÁEZ, 1996; PANIZZA, 1997; JORGE, MARKMAN & FERRO, 1997/98; PLANTAS..., 1999; LORENZI, 2000; MATOS, 2000).

As espécies deste gênero são árvores de tronco reto e oco, que atingem de 4 a 30 metros de altura, dependendo da espécie; apresentam folhas grandes, simples, coriáceas, longamente pecioladas, palmadas, de cor verde escura na face superior e prateada, cinzenta ou esbranquiçada na face inferior (PIO CORRÊA & PENNA, 1969; PÉREZ-ARBELÁEZ, 1996; JORGE, MARKMAN & FERRO, 1997/98).

Várias espécies do gênero *Cecropia* são utilizadas na medicina popular da América Latina, com variações na indicação terapêutica dependendo do país e das espécies empregadas. São utilizadas para o tratamento de hepatite, diabetes, úlceras, inflamações do útero e ovários, leucorréia, gonorréia, disenteria, enfermidades das vias respiratórias (asma, bronquite, pneumonia e tosse) e como ativadoras das funções cardíaca e circulatória, cicatrizantes, anti-infecciosas, espasmolíticas, febrífugas e diuréticas (PANIZZA, 1997; FRANCK, 1998; PINHEIRO et al., 1998; XAVIER et al., 1998; PLANTAS ... , 1999). Usualmente se empregam as folhas e os brotos em pó, em diversos tipos de preparações, sendo as mais comuns infusão, decocção e extrato alcoólico (PANIZZA, 1997; PLANTAS ... , 1999) relatando-se, também, o emprego das raízes e das flores (FRANCK, 1998; PINHEIRO, 1998). Recomenda-se o torém, isto é *Cecropia adenopus* e outras espécies, como diurético e anti-hipertensivo,

na forma de cozimento preparado diariamente, na proporção de uma a duas folhas secas (ca. 20 g) em 0,5 L de água, na dose de uma xícara de chá três vezes ao dia (MATOS, 1994).

Cecropia glaziovii Snethl. é uma árvore de 8-16 m de altura, com copa ampla, bastante ramificada. Tem tronco reto, oco e esbranquiçado em cujo interior encontram-se formigas agressivas do gênero *Azteca*. Apresenta folhas longamente pecioladas, simples, grandes, palmadas (8-9 lobos), rugosas, verde escuras na fase superior e aspecto prateado na fase inferior. Apresenta brotos avermelhados. No Brasil, *C. glaziovii* é freqüente nas regiões centro e sul (LORENZI, 2000; LORENZI & MATOS, 2002).

C. glaziovii Snethl. (*C. glazioui*, *C. glaziovi*) é utilizada como hipotensora, cardiotônica, diurética e para o tratamento de asma e bronquite, sendo empregada nas formas de infusão, decocção, extrato fluido, tintura e xarope das folhas e brotos (ARAÚJO & LUCAS, 1930; LAPA et al., 1999; LORENZI & MATOS, 2002; PLANTAS ..., 1999; ROCHA et al., 2002). Foi uma das plantas incluídas no Programa Brasileiro de Pesquisa em Plantas Medicinais da Central de Medicamentos–CEME (HEBERLÉ et al., 1998; LAPA et al., 1999).

3.9.2. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

A atividade anti-hipertensiva do extrato aquoso de folhas de *C. glaziovii* e da fração butanólica correspondente foi demonstrada em órgãos isolados, animais e humanos (FRANCK, et al., 1996; FRANCK, 1998; LAPA et al., 1999; MATOS, 2000; ROCHA et al., 2002). Esta atividade está relacionada com o bloqueio dos canais de cálcio (LAPA et al., 1999; ROCHA et al., 2002). Flavonóides e proantocianidinas parecem estar envolvidas no efeito anti-hipertensivo de *C. glaziovii* (FRANCK et al., 1996; FRANCK, 1998; LACAILLE-DUBOIS et al., 2001). Diferentes autores, tais como BAHORUN et al., 1990; BENITO et al., 2002; CORTES, et al., 2002; GUERRERO et al., 2002; SHAHAT et al., 2002 e VIERLING

et al., 2003 relatam que flavonóides e proantocianidinas presentes em diferentes extratos de plantas diversas estão envolvidos em atividades anti-hipertensiva e antioxidante.

Adicionalmente, ensaios *in vivo* e/ou em órgãos isolados, demonstraram atividades ansiolítica/antidepressiva (LAPA et al., 1999; ROCHA et al., 2002), broncodilatadora (DELARCINA JUNIOR et al., 1996), redução da secreção ácida gástrica, além de aceleração do esvaziamento gástrico sem afetar a motilidade intestinal (CYSNEIROS et al., 1996 e 1998) para extratos da espécie.

Algumas espécies de *Cecropia*, entre as quais *C. glaziovii*, apresentaram efeitos que podem ser relacionados com a ação anti-hipertensiva, como vasorelaxação em anéis de aorta pré-contraídos com adrenalina, inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA) e efeito anti-oxidante. Ácido clorogênico e diferentes flavonóides e proantocianidinas, presentes em espécies de *Musanga*, *Crataegus* e *Cecropia*, foram testados quanto à inibição da ECA, na concentração de 0,33 mg/mL, observando-se que nenhum deles, por si só, é capaz de alcançar as porcentagens de inibição apresentadas pelas frações que os contém, o que evidencia um sinergismo. O ácido clorogênico não apresentou significativa inibição da ECA (4,2%). No entanto, os flavonóides e proantocianidinas demonstraram atividade inibitória similar, com valores entre 20,4% e 48,1%, o que sugere que, tanto flavonóides quanto proantocianidinas destas espécies de *Cecropia* estão envolvidos na inibição da ECA. No teste de inibição da ECA na concentração de 0,33 mg/mL, os extratos metanólicos de estípulas e das folhas de *C. glaziovii* causaram 50,1% e 91,1% de inibição, respectivamente. O conteúdo de proantocianidinas parece ser co-responsável pela intensidade da inibição da ECA, mas não explica por si só, as diferenças encontradas entre as respostas obtidas para os extratos metanólicos de espécies do gênero *Cecropia* (*C. hololeuca*, *C. pachystachya*) com teores de proantocianidinas totais próximos de 11% (32,7% e 42,4% de inibição, respectivamente) nem frente ao extrato de *Musanga cecropioides* que, com 13,5% de proantocianidinas totais, produz 100% de inibição. Observou-se que a inibição da ECA foi maior com frações contendo proantocianidinas oligoméricas e

menor para aquelas enriquecidas em proantocianidinas poliméricas (FRANCK, et al., 1996; FRANCK, 1998; LACAILLE-DUBOIS, FRANCK & WAGNER, 2001).

Demostrou-se o efeito de extratos etanólicos de diferentes espécies de *Musanga*, *Crataegus* e *Cecropia*, incluindo *C. glaziovii*, em anéis de aorta isolados, pré-contraídos com noradrenalina, sendo que, para o extrato etanólico de *C. glaziovii*, se observaram boas respostas vasorelaxantes, com 73,8% de relaxamento frente a 81,4% para o extrato de *Crataegus*, ambos ensaiados a 30 µg/mL. Uma fração de extrato de estípula de *C. glaziovii*, enriquecida em proantocianidinas, apresentou relaxamento em anéis de aorta pré-contraídos com noradrenalina, comparável àquele do extrato bruto, em uma concentração duas vezes menor que este, sugerindo novamente que as proantocianidinas participam da atividade anti-hipertensiva desta espécie (FRANCK, et al. 1996; FRANCK, 1998).

O extrato aquoso de folhas de *Musanga cecropioides*, contendo principalmente saponinas, flavonóides e proantocianidinas, apresentou atividade hipotensora em músculo liso vascular (*in vitro*) e no ensaio de determinação invasiva e direta da pressão arterial em ratos normotensos e hipertensos (*in vivo*). A atividade parece ser devida a um efeito vasodilatador e a efeito de bloqueio adrenérgico. Este extrato apresentou relaxamento do músculo liso vascular significativamente dependente de endotélio, explicado pela liberação de óxido nítrico e produziu significativa inibição da ECA (DONGMO et al., 2002).

A capacidade de neutralizar espécies oxigenadas ativas pode repercutir favoravelmente na prevenção da arteriosclerose e na proteção cardíaca (NIJVELDT et al., 2001). Os extratos de *M. cecropioides*, *C. pachystachya*, *C. glaziovii*, *C. hololueca* e *Crataegus*, avaliados por FRANCK (1998), apresentaram efeito antioxidante bom ou muito bom no teste da peroxidase lipídica, frente ao ácido araquidônico. Este efeito é atribuível, pelo menos parcialmente, ao conteúdo de proantocianidinas oligoméricas. Neste teste, *C. glaziovii* e *M. cecropioides* apresentaram as maiores atividades. De acordo com os testes de inibição da ciclooxigenase e da 5-lipoxigenase, o extrato metanólico de *C.*

glaziovii pode afetar a síntese de prostaglandinas, mediadores da inflamação, mas não inibe a formação de leucotrienos. Esta propriedade pode contribuir para minimizar doenças cardíacas associadas com inflamação arterial (FRANCK, 1998).

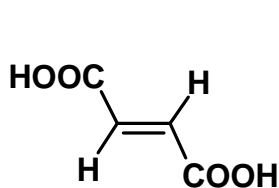
BAHORUN et al. (1990) relacionaram a atividade antioxidante de extratos de diferentes órgãos vegetativos e reprodutivos de *Crataegus monogyna* com o teor de fenóis totais, proantocianidinas, catequinas, flavonóides e ácidos fenólicos. Foram observadas melhores correlações com fenóis totais, no entanto, a atividade das folhas parecia ser influenciada pelo teor de flavonóides, e das flores e frutos, com o teor de catequinas e proantocianidinas.

Em relação à toxicidade de *C. glaziovii* descrevem-se resultados que evidenciam baixa toxicidade aguda e crônica (HERBERLÉ et al., 1998). Na maioria dos estudos farmacológicos registrados na literatura pesquisada foram empregados extratos aquosos, liofilizados em alguns casos, ou uma fração butanólica obtida a partir do extrato aquoso por partição com n-butanol.

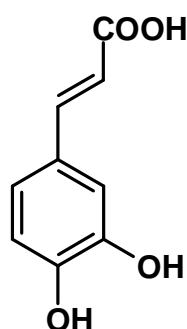
VIDRO et al., (1982) relataram a atividade hipotensora, em ratos Wistar anestesiados, do extrato etanólico de folhas de *C. obtusifolia* Bertol.. SALAS, BRENES & MORALES (1987) demonstraram, também em ratos, efeito anti-hipertensivo, do extrato aquoso liofilizado de folhas, sem mudanças na frequência cardíaca. ROMAN-RAMOS et al. (1991) descreveram uma evidente ação hipoglicemiante em coelhos. VARGAS-HOWELL & ULATE-MONTERO (1996) relataram um leve efeito diurético em ratos, do extrato aquoso de folhas. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi observada com extratos aquosos e etanólicos de cascas e folhas, além de atividades hiperlipidêmica, hipoglicêmica e anti-hipertensiva (270 PLANTAS ..., 1995). O efeito citostático de extratos de *C. peltata* frente ao fungo *Neurospora crassa* foi descrito por LÓPEZ-ABRAHAM, ROJAS-HERNÁNDEZ & JIMÉNEZ-MISAS (1979).

3.9.3. QUÍMICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO CECROPIA

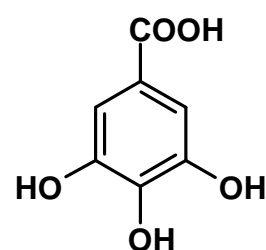
Em espécies de *Cecropia* já foram identificados ácidos fumárico (1), caféico(2), gálico(3), mirístico(4) e miricílico (melísico) (5), β -sitosterol(6), β -sitosterona(7), α -amirina(8), celobiose(9) e leucocianidina(10). Foram detectados açúcares, taninos, resinas, flavonóides, cumarinas, esteróides, triterpenos, proteínas, saponinas e aminoácidos. (PANIZZA, 1997; PLANTAS ..., 1999; LORENZI & MATOS, 2002).



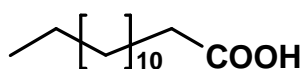
(1) Ácido fumárico



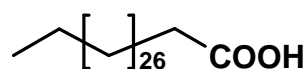
(2) Ácido cafeico



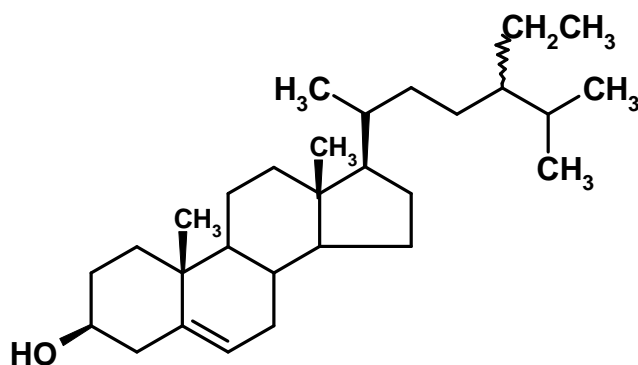
(3) Ácido gálico

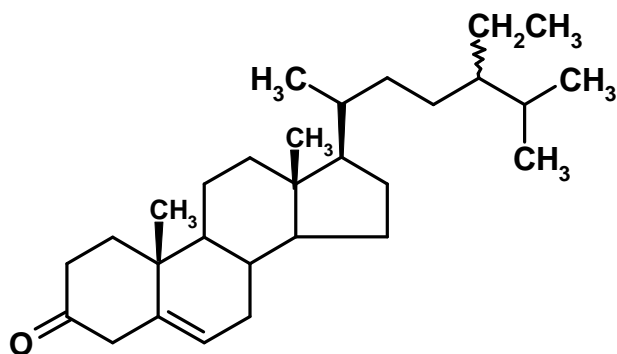
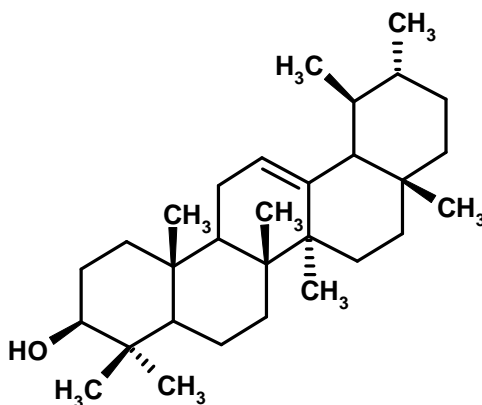
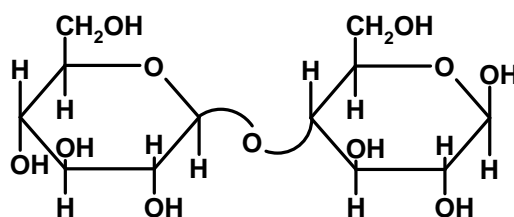


(4) Ácido mirístico

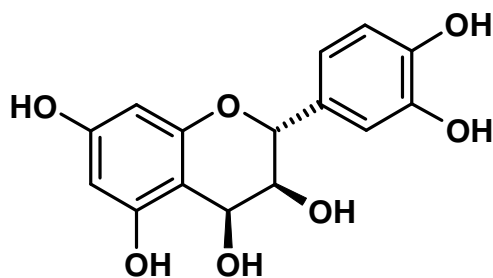


(5) Ácido miricílico

(6) β -Sitosterol

(7) β -Sitosterona(8) α -Amirina

(9) Celobiose

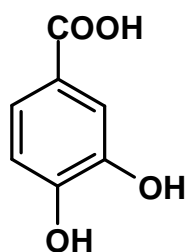


(10) Leucocianidina

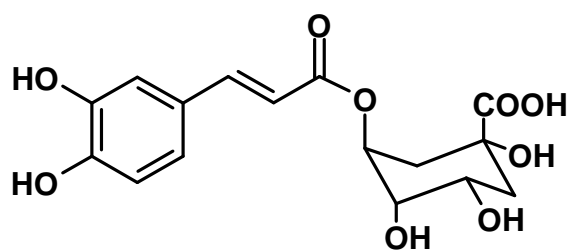
A prospecção fitoquímica realizada por FRANCK (1998), por cromatografia em camada delgada do extrato etanólico de folhas de *C. hololeuca* Miq. e dos extratos metanólicos de folhas de *C. pachystachya* Tréc. e *C. glaziovii* Snethl. indicou a presença de flavonóides e proantocianidinas e a ausência de heterosídeos antracênicos, heterosídeos cardiotônicos, saponinas e cumarinas. Nas folhas das três espécies de *Cecropia* estudadas, as seguintes substâncias foram identificadas: ácido protocatéquico (11), ácido clorogênico (12), (+)-catequina (13), (-)-epicatequina (14), procianidina B₂ (15), procianidina C₁ (16) orientina (17) e isorientina (18). A presença destes compostos, além de isoquercitrina (19) e isovitexina (20) nas estípulas de *C. glaziovii*, também foi observada.

Das espécies trabalhadas por FRANCK (1998) os perfis cromatográficos por HPLC de *C. glaziovii* e *C. hololeuca* são semelhantes, diferindo principalmente pela presença de orientina (13) e ausência de (+)-catequina (15) no extrato de *C. hololeuca*. Tanto FRANCK (1998) como XAVIER et al. (1998) indicam que os flavonóides presentes nas diversas espécies de *Cecropia* são principalmente C-glicosilflavonóides, sendo que estes últimos autores relatam a presença de vitexina (21) em *C. glaziovii*. MATOS (2000) indica que a isovitexina (20) foi isolada de uma fração de *C. glaziovii*, com atividade anti-hipertensiva.

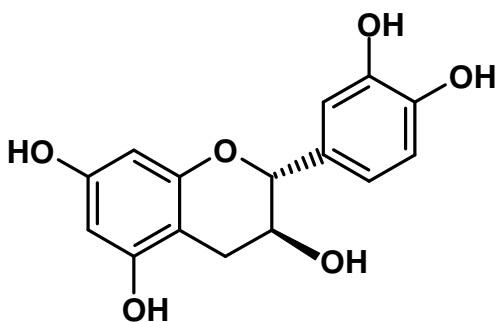
XAVIER et al. (1998) analisaram, por CCD, frações do extrato metanólico de folhas de *C. adenopus* Mart. (*C. peltata* Vell.), identificando ácido clorogênico (12), orientina (13), isorientina (14) e dois outros C-glicosilflavonóides mais polares, derivados de apigenina e luteolina, para os quais não foram definidas as estruturas.



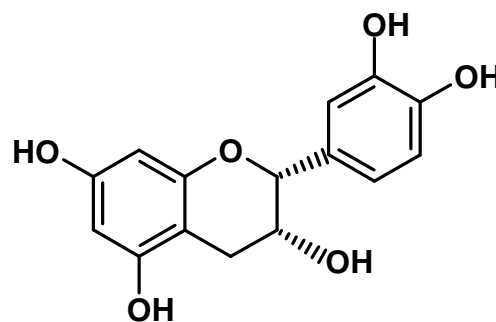
(11) Ácido protocatéquico



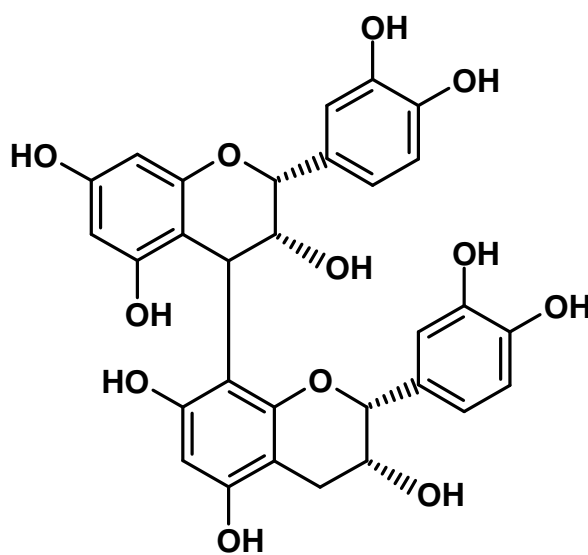
(12) Ácido clorogênico



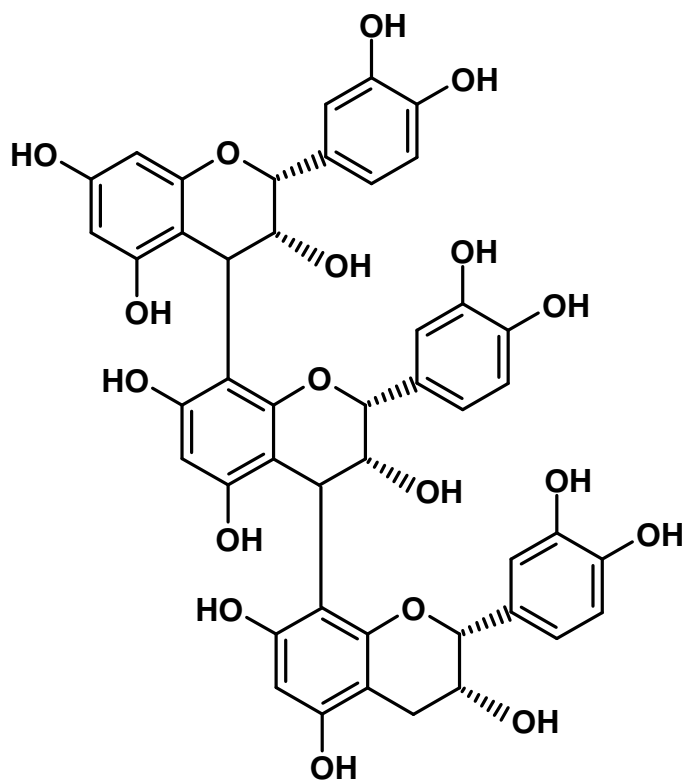
(13) (+)-Catequina



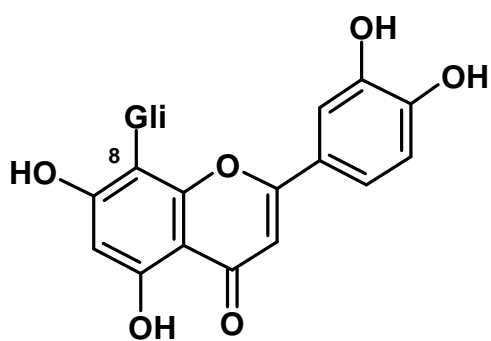
(14) (-)-Epicatequina



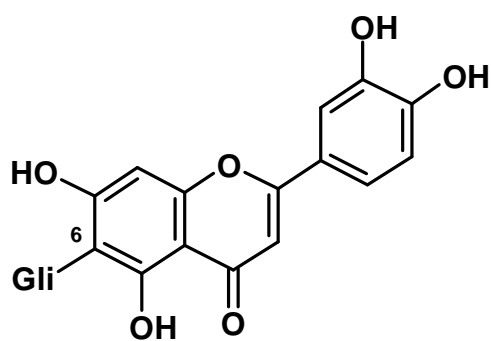
(15) Procianidina B₂



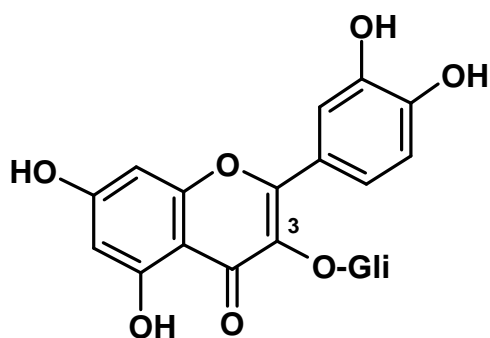
(16) Procianidina C₁



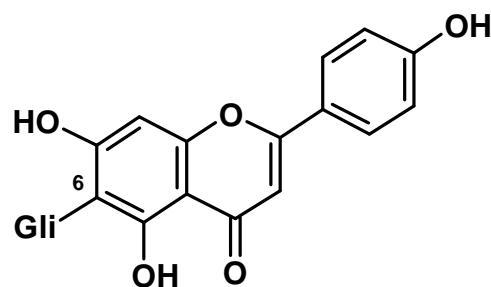
(17) Orientina



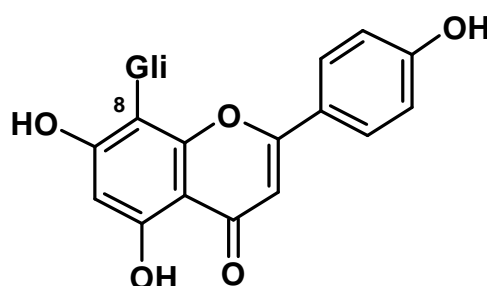
(18) Isoorientina



(19) Isoquercitrina



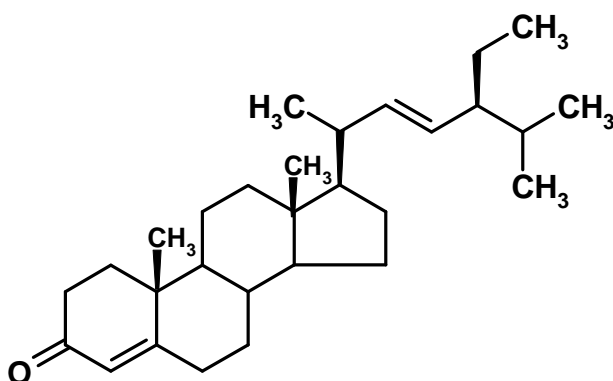
(20) Isovitexina



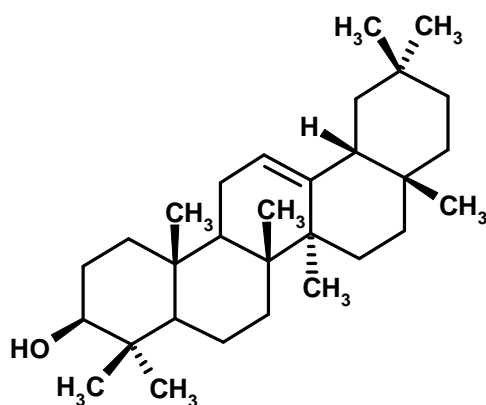
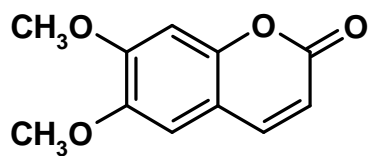
(21) Vitexina

A casca de *C. pachystachya* (sinonímia: *C. adenopus* Mart.; *C. peltata* Vell.) contém cecropina e ácido tânico e para as folhas foram descritos ambainina, ambainina, cecropina, cecropinina, β -sitosterol (6), estigmast-4-en-3-ona (22), α -amirina (8) e β -amirina (23) e vários ácidos graxos (270 PLANTAS ..., 1995).

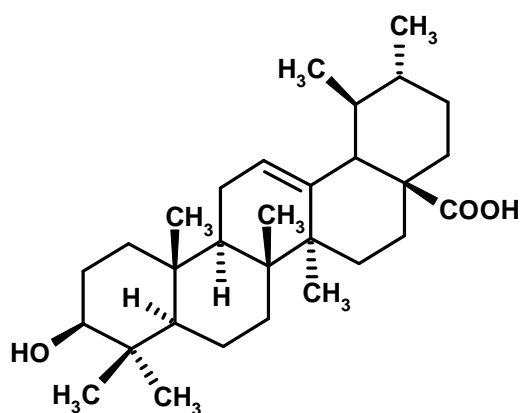
Do extrato diclorometânico de folhas de *C. palmata*, PINHEIRO et al. (1998) isolaram escoparona (24), ácido ursólico (25) e um álcool isoprênico, o (E)-3,7,11,15, 19,23-hexametil-tetracos-2-en-1-ol (26). Segundo os autores, esta foi a primeira vez que se isolou uma cumarina neste gênero.



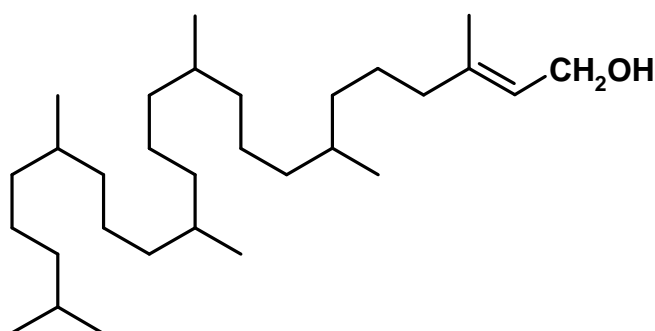
(22) Estigmast-4-en-3-ona

(23) β -Amirina

(24) Escoparona



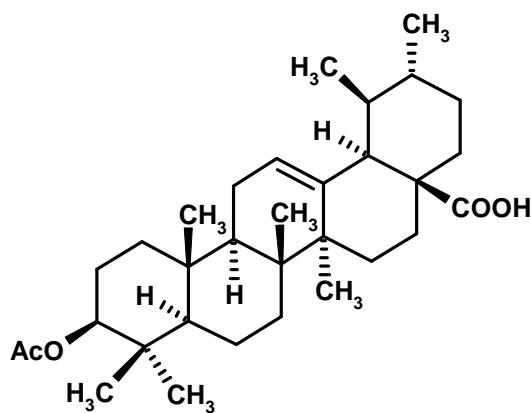
(25) Ácido ursólico



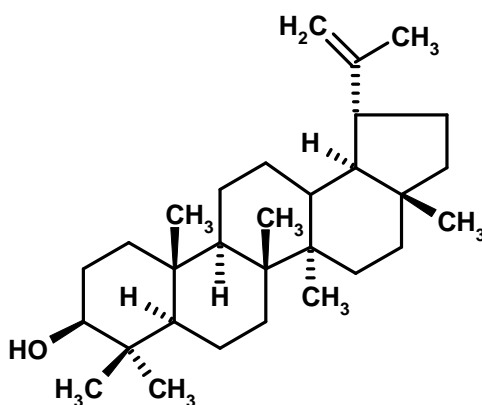
(26) (E)-3,7,11,15,19,23-hexametil-tetracos-2-en-1-ol

De *C. catharinensis* foram isolados os seguintes triterpenos: ácido O-acetilursólico (27), lupeol (28), ácido oleanólico (29), ácido 2 α -acetóxi-3 β ,19 α -diidroxí-urs-12-eno-28-óico (30); ácido 2 α ,3 β ,19 α -triidroxí-urs-12-eno-28-óico (31); ácido 2 α -acetoxi,3 β ,19 α -diidroxí-urs-12-eno-28-óico (32); ácido 2 α ,3 α ,19 α -triidroxí-urs-12-eno-28-óico (33) e duas lactonas triterpênicas, 2 α -acetoxi,3 α ,19 α -diidroxí-11,12-epoxi-13,16-ursanolactona (34) e 3 α -acetóxi,2 α ,19 α -diidróxi,11,12-epoxi-13,16-ursanolactona (35) (MACHADO et al.,1996).

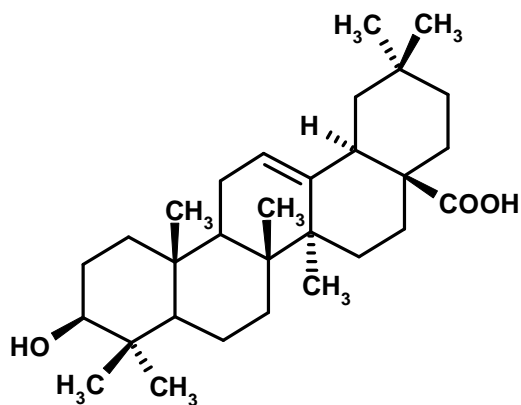
Isoorientina e ácido clorogênico foram isolados de folhas de *Cecropia obtusifolia* (ANDRADE-CETTO & WIEDENFELD, 2001) e de folhas de *C. lyratiloba* OLIVEIRA et al., (2003) isolaram orientina e isovitexina.



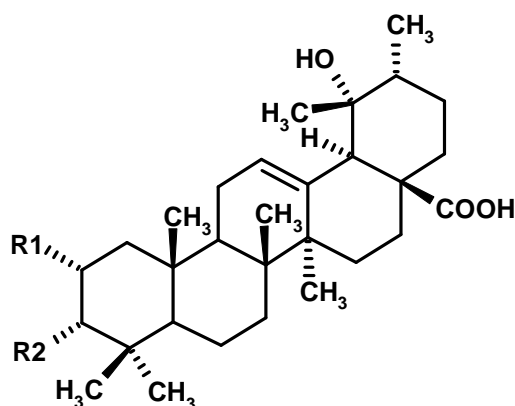
(27) Ácido O-acetilursólico



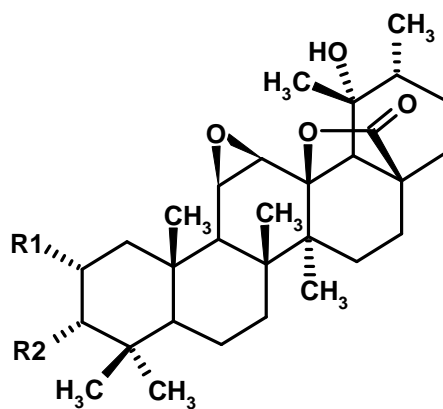
(28) Lupeol



(29) Ácido oleanólico



	R1	R2	
(30)	α -OAc	β -OH	Ácido 2 α -acetóxi-3 β ,19 α -diidroxi-urs-12-eno-28-óico
(31)	α -OH	β -OH	Ácido 2 α ,3 β ,19 α -triidroxi-urs-12-eno-28-óico
(32)	α -OAc	α -OH	Ácido 2 α -acetoxi,3 β ,19 α -diidroxi-urs-12-eno-28-óico
(33)	α -OH	α -OH	Ácido 2 α ,3 α ,19 α -triidroxi-urs-12-eno-28-óico



	R1	R2	
(34)	α -OAc	α -OH	2 α -acetoxi,3 α ,19 α -diidroxi-11,12-epoxi-13,16-ursanolactona
(35)	α -OH	α -OAc	3 α -acetóxi,2 α ,19 α -diidroxi,11,12-epoxi-13,16-ursanolactona

3.9.4. EXPERIÊNCIAS TECNOLÓGICAS

HERBERLÉ et al. (1998) realizaram alguns ensaios de extração e secagem por nebulização a partir de folhas de *C. glaziovii*, encontrando dificuldades tecnológicas, principalmente na etapa de filtração dos extratos aquosos, pela viscosidade dos mesmos.

3.10. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO DE PRODUTOS NATURAIS

Visando a disponibilidade de um maior número de opções no tratamento da hipertensão tem-se realizado o estudo de plantas medicinais avaliando o efeito farmacológico mediante testes *in vivo* e *in vitro*. Nos ensaios *in vivo*, se mede a hipotensão produzida em animais normotensos e/ou hipertensos. Os ensaios *in vitro* se baseiam na inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) ou na vasodilatação de anéis de aorta de ratos previamente contraídos com fenilefrina, noradrenalina ou cloreto de potássio (RIBEIRO et al., 1986; WAGNER et al., 1991; HANSEN et al., 1995; FRANCK et al. 1996; FRANCK, 1998; NYMAN et al., 1998; LAPA et al., 1999; SOMANADHAN et al., 1999; BRAGA et al., 2000; LACAILLE-DUBUIS, FRANCK & WAGNER, 2001; CÔRTEZ et al., 2002; GUERRERO et al, 2002; VALADARES et al., 2003).

Os metabólitos de plantas, freqüentemente associados à inibição *in vitro* da ECA são flavonóides, proantocianidinas e peptídeos (WAGNER, 1998), mas já foi relatada atividade inibitória da ECA para ácidos fenólicos, taninos hidrolisáveis e xantonas (UENO, et al., 1988; CHEN & LIN, 1992). Foi sugerido que o mecanismo de inibição da ECA por flavonóides e proantocianidinas poderia ser pela formação de quelato entre o oxigênio heterocíclico e o grupo hidroxila, presentes em suas estruturas, com o átomo de zinco da ECA, no centro ativo da enzima (WAGNER et al., 1991). FRANCK (1998) observou uma correlação entre

a atividade inibitória da ECA, *in vitro*, e a vasodilatação produzida em anéis de aorta de ratos pré-contraídos com noradrenalina.

A literatura registra diversos artigos sobre a avaliação da atividade vasodilatadora de extratos, frações e compostos isolados de plantas. Como exemplos, podem-se citar os trabalhos de DUARTE et al., 1993; FRANCK et al., 1996; FREITAS et al., 1996; HERRERA et al., 1996; ANDRIAMBELOSON et al., 1998; HOLLMAN & KATAN, 1999; LAPA et al., 1999; LEMOS et al., 1999; SLISH et al., 1999; YU et al., 1999; CÔRTEZ et al., 2002; DONGMO et al., 2002; GUERRERO et al., 2002; VALADARES et al., 2003; ROGHANI et al., 2004; CALDERONE et al., 2004; FU et al., 2005. Estes trabalhos citam flavonóides, proantocianidinas e alcalóides como as classes de metabólitos responsáveis pela atividade vasorelaxante observada. As proantocianidinas estão entre compostos muito ativos, com CI_{50} entre 1 e 10 μM . Já, para os flavonóides relatam-se CI_{50} entre 1 μM e 100 μM (HERRERA, et al., 1996; ANDRIAMBELOSON et al., 1998; HOLLMAN & KATAN, 1999; LEMOS et al., 1999). Frações enriquecidas em proantocianidinas do vinho tinto apresentaram CI_{50} 300 μM (ANDRIAMBELOSON et al., 1998), de *Crataegus*, CI_{50} 0,4 $\mu g/mL$, de *Cecropia glaziovii*, CI_{50} 1,0 $\mu g/mL$, de *C. hololeuca* CI_{50} 2,0 $\mu g/mL$ (FRANCK et al., 1996; FRANCK, 1998) e de *Ouratea semiserrata*, CI_{50} 3,5 $\mu g/mL$ (CÔRTEZ et al., 2002).

Os ensaios de vasorelaxação se fundamentam na atividade vasodilatadora produzida por extratos, frações e substâncias isoladas em anéis de aorta previamente contraídos. Para a contração dos tecidos dos anéis se emprega um agonista, por exemplo, fenilefrina, um agonista seletivo dos receptores α_1 adrenérgicos, que atuam na contração da musculatura lisa. O ensaio pode ser realizado empregando-se anéis de aorta com ou sem o endotélio. Para estabelecer a funcionalidade do endotélio utiliza-se, usualmente acetilcolina, um neurotransmissor colinérgico, com ação vasodilatadora dependente do endotélio, que na concentração de 1 mM deve produzir, no mínimo, 50% de vasodilatação, se o endotélio está íntegro. A FIGURA 2 mostra um traçado representativo dos efeitos contátil e vasodilatador.

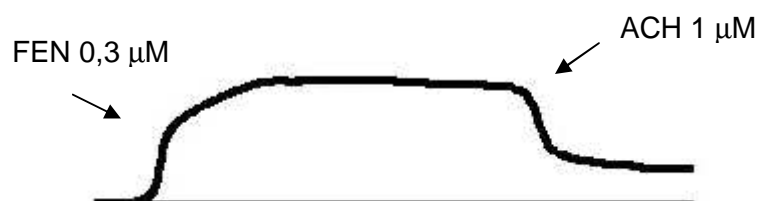


FIGURA 2. Traçado representativo do efeito contrátil induzidos por fenilefrina (FEN) 0,3 μM e do efeito vasoconstrictor de acetilcolina (ACH) 1 μM.

CAPÍTULO 4

PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAL E EQUIPAMENTO

4.1.1. EQUIPAMENTOS

Agitador mecânico New Brunswick Scientific, modelo Innova 2100

Aparelho de ponto de fusão MQAPF-301, Microquímica

Balança analítica Sartorius, modelo B 210 D, precisão de 0,01 mg

Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB 204, precisão de 0,1 mg

Balança analítica Ohaus, modelo AS 120, precisão de 0,1 mg

Balança de prato externo, Micronal, modelo B-160, precisão de 1 mg

Balança de prato externo, Nucleo, modelo PR1000, precisão de 10 mg

Banho de ultra-som Thornton, modelo T 14

Banho de ultra-som Thornton, modelo T 50

Banho de ultra-som Unique, modelo USC 1400

Banho-maria Procimed, modelo 120/4

Centrífuga Fanem, modelo Excelsa 2

Chapa de aquecimento e agitação magnética Corning

Cromatografo analítico Merck-Hitachi, provido de bomba L-6200 A, injetor automático AS-2000 A, detector UV-VIS L-4250, integrador D-2500, forno T-6300, coluna RP-18 de 125 x 4 mm d.i. com partículas de 5 µm e pré-coluna RP-18

Espectrofotômetro UV-VIS, Shimadzu, modelo UV-160A

Espectrofotômetro UV-VIS, Perkin Elmer, modelo Lambda 20

Estufa com circulação de ar Fanem

Estufa Fanem, modelo Orion 515

Lâmpada de luz ultravioleta Spectroline, modelo ENF-240 C

Mufla Elektro

Moinho Marconi

Moinho Toastmaster Coffee Grinder, modelo 1112

Rotavapor Büchi, modelo R114, com banho de água modelo B-480

Transdutor isométrico World Precision

Fisiógrafo World Precision

4.1.2. SOLVENTES

Água destilada e água deionizada em equipamento Milli-Q.

Solventes P.A.: acetato de etila, acetona, clorofórmio, etanol 95%, éter etílico, éter de petróleo 60-80 °C, diclorometano, n-hexano, n-butanol, tetracloreto de carbono, tolueno. Marcas Merck, Quimex, Q.M. e Reagen.

Solventes grau HPLC: metanol, acetonitrila. Marca EMD (Merck).

4.1.3. REAGENTES P.A.

Ácido acético glacial, ácido clorídrico concentrado, ácido 3,5-dinitrobenzóico, ácido fórmico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, anidrido acético, anisaldeído, carbonato de sódio, cloreto de sódio, cloreto férrico, cloreto de alumínio, ferricianeto de potássio, hidróxido de potássio, hidróxido de sódio, iodeto de potássio, piridina, pirogalol, pó de pele fracamente cromado, sílica-gel 60 G, subnitrito de bismuto, sulfato de sódio anidro, tungstato de sódio. Marcas Merck, Sigma e Aldrich.

4.1.4. MATERIAL PARA CROMATOGRAFIA

Sílica gel 60 G, Cromatofolhas de sílica gel 60 em alumínio, Marca Merck

Sephadex LH-20, marca Pharmacia

Poliâmida SC6, marca Machere Naneg

4.1.5. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Os padrões de ácido clorogênico, ácido protocatéquico, catequina e epicatequina foram da marca Sigma. Orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e isoquercetrina foram da marca Extrasynthèse.

A rutina foi obtida a partir de frutos de *Dimorphandra mollis* Benth. (fava d'anta), recristalizada em metanol, verificando-se sua pureza por CCD e HPLC.

4.2. MATERIAL VEGETAL

4.2.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado em duas épocas do ano, no final da época chuvosa (março-abril) e no final da época seca (setembro-outubro). Foram coletadas folhas novas e maduras. Os dados correspondentes a local da coleta, período do ano, número de espécimes, tipo de folhas, código da amostra e número das exsicatas estão resumidos na TABELA 1.

4.2.1.1. ESPÉCIMENS NATIVOS

O material vegetal nativo foi coletado e identificado pelo professor Júlio Antônio Lombardi do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB). As coletas foram realizadas em três locais diferentes de Minas Gerais: Parque Estadual do Rio Doce, Campus da UFMG, e Base da Serra da Piedade. As exsicatas estão depositadas no Herbário BHCB do ICB, UFMG.

4.2.1.2. ESPÉCIMENS CULTIVADOS

Do cultivo experimental do CPQBA, em Campinas, SP, coletaram-se amostras de cinco árvores femininas, cinco masculinas e cinco das árvores clones. As árvores clone não foram submetidas a nenhuma modificação genética.

Realizaram-se duas coletas dos mesmos indivíduos, a primeira, de folhas maduras, em abril de 2001 (época chuvosa), e a segunda, de folhas novas e maduras, em setembro de 2001 (época seca). Estas amostras foram fornecidas pelo professor Pedro Melilo de Magalhães, Divisão de Agrotecnologia da Universidade Estadual de Campinas.

TABELA 1. AMOSTRAS DE MATERIAL VEGETAL

	LUGAR DA COLETA	PERÍODO DA COLETA	Nº DE ESPÉCIMES	TIPO DE FOLHAS	CÓDIGO DAS AMOSTRAS	Nº DA EXSICATA	
ÁRVORES NATIVAS	PERD, Caratinga (MG)	CHUVOSA 09 mar. 2000	01	Novas Maduras	RD-C-N RD-C-M	BHCB50781	
	UFMG, Belo Horizonte (MG)	CHUVOSA 15 mar. 2002	01 ^a	Novas Maduras	UFMG-C-N UFMG-C-M	BCHB53578	
		SECA 07 set. 2000	01 ^a	Novas Maduras	UFMG-S-N UFMG-S-M		
	Serra da Piedade, Caeté (MG)	CHUVOSA 06 mar. 2002	05	Novas Maduras	SP-C-N SP-C-M	BCHB53726	
		SECA 07 out. 2000	03	Novas Maduras	SP-S-N SP-S-M		
			04	Novas Maduras	SP-S-N SP-S-M		
			01	Novas Maduras	SP-S-N SP-S-M		
		SECA 20 jun. 2002	01	Novas Maduras	SP-Jun-N SP-Jun-M		
	ÁRVORES CULTIVADAS	CPQBA, Campinas (SP)	CHUVOSA 18 abr. 2000	05 F ^b	Maduras	CT-F-C-M	CPQBA78
				05 Ma ^c	Maduras	CT-MA-C-M	
SECA 07 set. 2000			05 F ^b	Novas Maduras	CT-F-S-N CT-F-S-M		
			05 Ma ^c	Novas Maduras	CT-M-S-N CT-M-S-M		
ÁRVORES CLONE	CPQBA, Campinas (SP)	CHUVOSA 18 abr. 2000	05 ^d	Maduras	CL-C-M	CPQBA78	
		SECA 07 set. 2000	05 ^d	Novas Maduras	CL-S-N CL-S-M		

PERD: Parque Estadual de Rio Doce; MG: Estado de Minas Gerais; UFMG: Campus da Universidade Federal de Minas Gerais; CPQBA: Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônômicas; SP: Estado de São Paulo; C: Época chuvosa; S: Época seca; CT: Árvores cultivadas; F: Árvores femininas; MA: Árvores masculinas; CL: Árvores clones; a, b, c, d : Mesmos espécimes; N: Folhas novas; M: Folhas maduras.

4.2.2. ACONDICIONAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

Separaram-se os pecíolos das lâminas foliares; no caso das folhas novas também foram separadas as estípulas. Procedeu-se a uma observação geral do material vegetal, retirando-se o material estranho presente, constituído, basicamente, por areia, teias de aranhas e insetos, como larvas, pupas e adultos.

O material vegetal foi submetido a secagem, em estufa com circulação de ar, mantendo-se a temperatura entre 35 e 40 °C, até alcançar uma perda por secagem inferior a 10%. Durante a secagem, tomou-se o cuidado de não se misturar as folhas novas com as maduras, nem os vários indivíduos, quando era o caso.

A moagem foi feita em moinho de facas, para folhas novas, folhas maduras, pecíolos, lâminas foliares e estípulas, separadamente. Completou-se a pulverização do material retido pelo tamis no moinho Toastmaster. O material moído foi guardado em frascos de vidro.

4.3. MÉTODOS

4.3.1. ENSAIOS FARMACOGNÓSTICOS GERAIS

A prospecção fitoquímica e a perda por dessecação foram realizadas com folhas dos espécimes: RD-C, UFMG-S e SP-S-8; para os demais testes empregaram-se folhas de RD-C. Os testes farmacognósticos e a prospecção fitoquímica só foram realizados com as folhas maduras por se dispor de pequena quantidade de material correspondente a folhas novas, reservando-se este para os testes fitoquímicos quantitativos.

4.3.1.1. PERDA POR DESSECAÇÃO (WHO, 1998 b; FARMACOPÉIA ..., 2000)

Pesaram-se cerca de 2 g, com precisão de 0,1 mg, do pó do material vegetal, em cápsula de porcelana seca e previamente tarada. Secou-se a amostra em estufa, a 100 ± 5 °C, até massa constante, por um tempo mínimo de 5 horas. Calculou-se a perda, como porcentagem da massa inicial, de acordo com a seguinte expressão:

$$\% \text{ perda por dessecação} = \frac{\text{massa inicial} - \text{massa final}}{\text{massa inicial}} \times 100$$

4.3.1.2. CINZAS TOTAIS (WHO, 1998 b; FARMACOPÉIA ..., 2000)

Pesaram-se, com precisão de 0,1mg, cerca de 2 g do pó do material vegetal, em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Calcinou-se o material em chapa quente e posteriormente incinerou-se em mufla, aumentando-se lentamente a temperatura, até alcançar 500 a 600 °C. A incineração foi feita até eliminação de todo o carvão. Nos casos em que não se conseguiu a eliminação total do carvão, deixou-se resfriar o cadinho e umedeceu-se com 2 mL de água destilada; evaporou-se até secura, em banho-maria, e incinerou-se até massa constante. Os cadinhos com os resíduos foram exatamente pesados depois de resfriados, em dessecador. Calculou-se o teor de cinzas totais, em relação à droga seca ao ar, de acordo com a seguinte expressão:

$$\% \text{ cinzas totais} = \frac{\text{massa do resíduo}}{\text{massa inicial da amostra}} \times 100$$

4.3.1.3. CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO (WHO, 1998 b; FARMACOPÉIA ..., 2000)

O resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi fervido, durante cinco minutos, com 25 mL de ácido clorídrico 2 M, em cadinho coberto com vidro de relógio. Lavou-se o vidro de relógio com 5 mL de água quente, juntando-se esta

água ao cadinho. Recolheu-se o resíduo insolúvel em ácido sobre papel de filtro isento de cinza que foi lavado com água quente até que o filtrado mostrou-se neutro. Transferiu-se o papel de filtro contendo o resíduo para o cadinho original, secou-se sobre chapa quente e incinerou-se a cerca de 500 °C, até massa constante. Calculou-se a porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca ao ar, de acordo com a seguinte expressão:

$$\% \text{ cinzas insolúveis em ácido} = \frac{m_{\text{resíduo}}}{m_{\text{inicial}}} \times 100$$

Onde $m_{\text{resíduo}}$: massa do resíduo final
 m_{inicial} : massa inicial da amostra de cinzas totais

4.3.1.4. ÍNDICE DE INTUMESCÊNCIA (WHO, 1998 b; FARMACOPÉIA..., 2000)

Pesou-se 1 g de pó de material vegetal, com precisão de 0,01 g e colocou-se em proveta de 25 mL. Foram adicionados 25 mL de água e o material foi agitado manualmente, com bastão de vidro, por uma hora, a intervalos de 10 minutos. A proveta foi deixada em repouso, por três horas, à temperatura ambiente. Mediu-se, em mililitros com precisão de 0,2 mL, o volume ocupado pelo material vegetal. O volume, em mililitros, corresponde ao índice de intumescimento.

4.3.1.5. ÍNDICE DE ESPUMA (WHO, 1998 b; FARMACOPÉIA..., 2000)

Pesou-se 1 g do pó do material vegetal, com precisão de 0,01 g, transferiu-se para um Erlenmeyer contendo 100 mL de água, à ebulição. Manteve-se ebulição moderada por 30 minutos. Resfriou-se e filtrou-se recolhendo-se o filtrado em balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água. Porções sucessivas de 1, 2, 3 até 10 mL desta solução foram colocadas em tubos de ensaio com tampa e completou-se o volume de líquido em cada tubo, para 10 mL com água. Os tubos foram tampados e agitados longitudinalmente por 15 segundos a duas freqüências por segundo e deixados em repouso por 15

minutos. Após este tempo foi medida a altura da coluna de espuma. O resultado foi interpretado segundo as seguintes considerações:

- Se a altura da coluna de espuma, em todos os tubos, for menor que 1 cm, o índice de espuma é menor que 100.
- Se, em algum tubo, a altura da coluna de espuma for de 1 cm, a diluição do material vegetal neste tubo é o índice procurado (ver exemplo do cálculo). Se este tubo é o primeiro ou o segundo da série, faz-se uma diluição intermediária, preparada de forma similar, para se obter maior precisão.

Ex. do cálculo: se o tubo 4 apresenta 1 cm de espuma

O tubo 4 tem 4 mL de solução a 1% diluídos a 10 mL

$$\text{Concentração no tubo 4} = \frac{4 \text{ mL} \times 1\%}{10 \text{ mL}}$$

$$\text{Concentração no tubo 4} = 0,4 \% = \frac{0,4 \text{ g}}{100 \text{ mL}} = 0,004 \text{ g / mL}$$

$$\text{IE} = \frac{1}{0,004} = 250$$

- Se a altura da coluna de espuma for maior que 1 cm em todos os tubos, o índice de espuma é maior que 1000; neste caso a determinação deverá ser feita sobre uma nova série de diluições da decocção.

4.3.1.6. TEOR DE EXTRATIVOS EM DIFERENTES SOLVENTES (WHO,1998b)

Pesaram-se, com precisão de 1 mg, cerca de 4 g de pó do material vegetal e transferiu-se o total para um Erlenmeyer com tampa. Adicionaram-se 100 mL do solvente e deixou-se em maceração, com agitação freqüente, por 6 horas. Deixou-se em repouso por cerca de 18 horas e filtrou-se. Uma alíquota do filtrado (25,0 mL) foi evaporada até secura, em rotavapor, em balão de 50 mL, previamente seco e tarado. O balão com o resíduo foi seco a 100 ± 5 °C, por 6 horas, resfriado em dessecador por 30 minutos e pesado, rapidamente, com precisão de 0,1 mg. Os solventes empregados foram *n*-hexano, diclorometano,

etanol 95% e água. O teor de extrativos foi expresso em mg/g de material vegetal seco ao ar. Empregou-se para o cálculo a seguinte expressão:

$$\text{Extrativos (mg/g)} = \frac{\text{massa do resíduo (mg)}}{\text{massa do material vegetal (g)}} \times 4$$

4.3.1.7. GRANULOMETRIA DO PÓ (WHO, 1998 b; FARMACOPÉIA..., 2000)

Para determinar o tipo de pó utilizou-se, inicialmente, uma bateria de tamises com as seguintes aberturas nominais de malha (μm): 2000, 1700, 1400, 1180, 1000, 840, 500, 150 e 100. Posteriormente foram selecionados os tamises de abertura de malha 840 μm e 150 μm os quais permitem a classificação como pó moderadamente grosso.

Cerca de 100 g do pó do material vegetal, ou a totalidade do material disponível nos casos da massa ser inferior a 100 g, foram colocados sobre o primeiro tamis da bateria. Tampou-se e agitou-se, manualmente, com movimentos horizontais rotativos e movimentos verticais, por 20 min no mínimo, até completar a operação. Empregou-se um pincel para retirar o pó fino aderido às paredes do tamis, passando-se ao tamis seguinte e para desfazer os aglomerados de fibras remanescentes após a agitação, para que ocorresse o devido peneiramento. Pesou-se, cuidadosamente, com precisão de 0,1 g o material remanescente em cada tamis e expressou-se como percentagem da quantidade total.

4.3.2. PROSPEÇÃO FITOQUÍMICA POR CCD

Empregou-se o procedimento descrito na apostila intitulada "Triagem química de plantas por cromatografia em camada delgada (CCD)", elaborada por ABREU, M., do Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto. Submeteu-se o material vegetal

a extrações sucessivas com solventes de polaridades crescentes: clorofórmio/ácido acético (99:1), metanol/clorofórmio/ácido acético (49,5:49,5:1), metanol/água (1:1), além de uma extração independente com ácido sulfúrico 0,1 N para extrair os possíveis alcalóides presentes. Empregaram-se placas de sílica gel 60 G de 0,25 mm de espessura e as fases móveis indicadas na TABELA 2. Detectou-se a presença ou ausência de cada classe de compostos frente aos reveladores indicados na TABELA 3.

A presença de proantocianidinas foi indicada pela reação com n-butanol-HCl. Para isso, extraiu-se 0,5 g de pó do material vegetal com acetona-água (7:3). Evaporou-se o solvente e adicionou-se ao extrato seco cerca de 5 mL de n-butanol - HCl (95:5) e aqueceu-se em banho de óleo. O desenvolvimento de uma cor vermelha ou vinho tinto indicou a conversão de proantocianidinas em cianidinas (HIERMANN, KARTNIG & AZZAM, 1986). Empregou-se, como referência, pó de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss (espinaheira-santa).

TABELA 2. FASES ESTACIONÁRIAS E MÓVEIS EMPREGADAS NA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CCD

CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	FASE ESTACIONÁRIA	FASE MÓVEL
Polifenóis Esteróides Triterpenos	Silica gel 60 G	Hexano / AcOEt (1:1)
Agliconas antraquinônicas Agliconas de flavonóides	Silica gel 60 G	Tolueno / Me ₂ CO / CHCl ₃ (40:25:35)
Cumarinas	Silica gel 60 G	Tolueno / Eter etílico(1:1) saturado com AcOH a 10% - fase superior
Heterosídeos de flavonóides Heterosídeos antracênicos Heterosídeos cardiotônicos Alcalóides terciários	Silica gel 60 G	AcOEt / MeOH / H ₂ O (100:13,5:10) ≈ (81:11:8)
Saponinas	Silica gel 60 G	CHCl ₃ / MeOH / H ₂ O (64:50:10)
Taninos	Silica gel 60 G	Tolueno / BuOH / AcOH / H ₂ O (50:25:25:5)
Alcalóides quaternários	Celulose (papel)	BuOH / AcOH / H ₂ O (4:1:5) – fase superior
AcOEt = Acetato de etila; AcOH = Ácido acético; CHCl ₃ = Clorofórmio; BuOH = n-Butanol; H ₂ O = Água destilada; Me ₂ CO = Acetona; MeOH = Metanol		

TABELA 3. REVELADORES EMPREGADOS NA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CCD

CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	REFERÊNCIA	REVELADOR
Antraquinonas e cumarinas	Extrato metanólico de Sene 8-metoxipsoraleno	a) Irradiação com UV (366nm) sem tratamento químico b) KOH a 5% em metanol, e irradiação com UV (366nm)
Polifenóis e taninos	Ácido tânico e/ou Espinheira santa (<i>Maytenus ilicifolia</i>)	Ferricianeto de potássio a 1% / Cloreto férrico a 2%. Mistura 1:1
Esteróides e triterpenos	Ácido ursólico e/ou Ácido oleanólico	Reagente de Liebermann – Burchard
Flavonóides	Rutina (heterosídeo) Quercetina (aglicona)	a) Irradiação com UV (254nm, 366nm), sem tratamento químico b) AlCl ₃ a 5%, em etanol, e irradiação com UV (366nm)
Heterosídeos cardiotônicos (cardenolídeos)	Digoxina	Reagente de Kedde
Saponinas	Saponinas Riedel de Haën	Anisaldeído / Ácido sulfúrico
Alcalóides	Boldina (terciários) Extrato de <i>Berberis laurina</i> (quaternários)	Dragendorff / H ₂ SO ₄

A presença de saponinas foi avaliada pela hemólise de glóbulos vermelhos (SANABRIA, 1983). Para isso, 5 g de material vegetal previamente desengordurado com 25 mL de *n*-hexano, foram extraídos mediante ultra-som com duas porções de 25 mL de etanol-água (1:7). A 40 mL do extrato adicionaram-se 2 g de óxido de magnésio e aqueceu-se em banho maria até *secura*, com o objetivo de complexar os taninos. Adicionaram-se 15 mL de etanol 95% quente, misturou-se e filtrou-se, ainda quente, por papel. Concentrou-se o filtrado até obter 2-3 mL de extrato. Verificou-se a ausência de taninos neste extrato. A 1 mL do extrato livre de taninos adicionaram-se 5 mL de uma suspensão normalizada de glóbulos vermelhos. Misturou-se e deixou-se em repouso por 10 minutos. Preparou-se um branco adicionando a 1 mL de água destilada 5 mL da suspensão normalizada de glóbulos vermelhos. Como padrão

positivo utilizou-se uma solução de saponinas 1% em etanol-água (1:7). A prova de hemólise é considerada positiva se depois de 10 minutos, apenas o padrão e o problema apresentam hemólise, caracterizada pela transparência da solução resultante.

A suspensão normalizada de glóbulos vermelhos foi preparada suspendendo-se cerca de 10 mL de sangue humano em cerca de 100 mL de uma solução de cloreto de sódio 0,9%. A suspensão foi centrifugada a 1500-2000 rpm. Decantou-se o sobrenadante e resuspenderam-se os glóbulos vermelhos em solução salina e centrifugou-se novamente. Repetiu-se a re-suspensão e centrifugação uma vez mais. Finalmente re-suspenderam-se os glóbulos vermelhos em 400 mL de solução salina 0,9%.

5 mL do extrato em etanol-água 1:7 foram agitados vigorosamente, em um tubo de ensaio, durante 5 minutos. Observou-se se a espuma formada ocupava 1 cm ou mais e se era estável, pelo menos, por 30 minutos.

4.3.3. ENSAIOS DE QUANTIFICAÇÃO DE CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV-VIS.

4.3.3.1. ESTABELECIMENTO DAS QUANTIDADES DE AMOSTRA PARA OS TESTES QUANTITATIVOS.

Em todos os testes quantitativos realizaram-se ensaios preliminares que permitiram estabelecer as quantidades de material vegetal em pó e as diluições apropriadas a serem empregadas, posteriormente, para os testes definitivos.

4.3.3.2. QUANTIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE POLIFENÓIS TOTAIS E TANINOS (PHARMACOPÉE ..., 1986; BRITISH ..., 1993; FARMACOPEIA ..., 1996)

QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS E TANINOS EM MATERIAL VEGETAL

Para a determinação do teor de polifenóis totais e taninos seguiu-se a metodologia descrita para *Ratânia*, nas Farmacopéias Britânica e Francesa e aquela descrita para *Hamamelis* na Farmacopéia Brasileira, fazendo-se modificações na tomada de amostra e nas diluições de acordo com os ensaios preliminares.

PREPARO DA AMOSTRA

Determinou-se, num ensaio prévio, a tomada de amostra, para cada indivíduo, que permitisse obter valores de absorvância correspondentes aos polifenóis totais, entre 0,25 e 0,70.

Foram pesadas, com precisão de 1 mg, amostras entre 1,0 e 2,5 g do material moído segundo a quantidade de polifenóis totais presentes. Cada amostra foi transferida quantitativamente para um Erlenmeyer de 250 mL. Adicionaram-se 150 mL de água, aquecendo-se a mistura à ebulição em chapa quente, e manteve-se em banho-maria por 30 minutos. Resfriou-se em água corrente, transferiu-se para um balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume com água. Deixou-se em repouso para decantação e filtrou-se por papel de filtro qualitativo, de 12 cm de diâmetro, descartando-se, pelo menos, os primeiros 10 mL de filtrado. Empregou-se o filtrado restante para a quantificação.

Nos casos em que a quantidade de amostra total era pequena fez-se a diluição a 100,0 mL, fazendo-se uma tomada de amostra proporcionalmente menor e adicionando-se, inicialmente, 75 mL de água, isto é 0,4 a 0,6 g de material vegetal em pó.

QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS

Tomaram-se 10,0 mL do filtrado e diluiu-se quantitativamente, para 25,0 mL, com água. Transferiram-se 5,0 mL desta última diluição para um balão volumétrico de 50 mL, adicionaram-se 2,0 mL de solução de reagente de Folin-Denis, misturou-se e completou-se o volume com solução de carbonato de sódio a 15% p/v. Mediu-se a absorvância a 715 nm (A_1), exatamente, 2 minutos após a adição da solução de carbonato de sódio. Empregou-se água para ajustar o valor do branco.

QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS

A 20 mL do filtrado juntaram-se 0,20 g de pó de pele, agitou-se a mistura, em agitador mecânico, a 200 rpm, durante 60 minutos, e filtrou-se. Tomaram-se 10,0 mL deste último filtrado e diluiu-se quantitativamente com água para 25,0 mL. Transferiram-se 5,0 mL desta última diluição para um balão volumétrico de 50 mL, adicionaram-se 2,0 mL de solução de reagente de Folin-Denis, misturou-se e completou-se o volume com solução de carbonato de sódio a 15% p/v. Mediu-se a absorvância a 715 nm (A_2), exatamente, 2 minutos após a adição da solução de carbonato de sódio. Empregou-se água para ajustar o valor do branco.

ENSAIO PADRÃO (realizado ao abrigo da luz)

50,0 mg de pirogalol foram transferidos para um balão de 100 mL e dissolvidos em água, completando-se o volume com o mesmo solvente. 5,0 mL desta solução foram diluídos com água para 100 mL. Transferiram-se 5,0 mL desta última diluição para um balão volumétrico de 50 mL, adicionaram-se 2,0 mL de solução de reagente de Folin-Denis, misturou-se e completou-se o volume com solução de carbonato de sódio a 15% p/v. Mediu-se a absorvância a 715 nm (A_3), exatamente, 2 minutos após a adição da solução de carbonato de sódio e no prazo de, no máximo, 30 minutos a partir da dissolução do pirogalol. Empregou-se água para ajustar o valor do branco. O ensaio para o padrão foi feito em duplicata para cada grupo de amostras.

CÁLCULOS

Os teores de polifenóis totais e de taninos foram calculados pelas seguintes expressões:

Diluição de amostra a 250 mL

$$\% \text{ polifenóis totais} = \frac{(6,56 \times A_1)}{(A_3 \times m)}$$

$$\% \text{ taninos} = \frac{6,56 \times (A_1 - A_2)}{(A_3 \times m)}$$

Diluição de amostra a 100 mL

$$\% \text{ polifenóis totais} = \frac{(2,624 \times A_1)}{(A_3 \times m)}$$

$$\% \text{ taninos} = \frac{2,624 \times (A_1 - A_2)}{(A_3 \times m)}$$

onde

m = massa da amostra de material vegetal

A₁ = absorvância a 715 nm da amostra do ensaio sem o tratamento com o pó de pele

A₂ = absorvância a 715 nm da amostra do ensaio após o tratamento com o pó de pele

A₃ = média dos valores de absorvância a 715 nm das soluções do ensaio padrão

REAGENTES

Solução de carbonato de sódio 15% p/v: Dissolveram-se 150 g de carbonato de sódio P.A. em cerca de 800 mL de água destilada. Diluiu-se para 1000 mL com o mesmo solvente.

Reagente de Folin-Denis (solução de ácido fosfotúngstico): Misturaram-se em um balão de fundo plano, 10,0 g de tungstato de sódio P.A., 75 mL de água destilada e 8 mL de ácido fosfórico P.A. Aqueceu-se a mistura anterior sob refluxo durante 3 horas; deixou-se resfriar, transferiu-se a solução para um balão volumétrico e completou-se para 100,0 mL com água destilada (PHARMACOPÉE ... , 1986).

4.3.3.3. QUANTIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FLAVONÓIDES (RUSAK, ET AL., 1993)

O teor de flavonóides foi determinado segundo a técnica de RÖMISH (1960), descrita por RUSAK et al. (1993) com algumas modificações.

A. QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM MATERIAL VEGETAL

EXTRAÇÃO

Pesaram-se, com exatidão de 1 mg, amostras entre 0,5 e 2,0 g do material moído segundo a quantidade de flavonoides presentes, de tal forma que o valor de absorvancia final estivesse dentro da curva de calibração. Transferiu-se quantitativamente o pó de cada amostra para um balão de fundo plano de 250 mL. Adicionaram-se 25 mL de metanol e aqueceu-se esta mistura em banho-maria, sob refluxo, durante 30 minutos. O extrato obtido foi resfriado, deixado em repouso para que decantasse e filtrado através de algodão, recolhendo-se o filtrado, quantitativamente, em um balão volumétrico de 50 mL. Recolheu-se, no balão anterior, o algodão contendo parte do pó, acrescentando-se ao balão 20 mL de metanol. A mistura foi extraída nas mesmas condições descritas anteriormente e filtrada, ao final, através de algodão, recolhendo-se o filtrado, quantitativamente, no mesmo balão. Lavou-se o algodão com 5 mL de metanol e completou-se o volume com este mesmo solvente.

ELIMINAÇÃO DE CAROTENOIDES E CLOROFILAS

Em um tubo de ensaio foram misturados, na ordem indicada, 10 mL da solução metanólica obtida como descrito no item de extração, 4 mL de clorofórmio e 6 mL de água. A mistura foi homogeneizada, transferida para um tubo de centrífuga e centrifugada, por 20 minutos, a aproximadamente 3000 rpm, para completa separação das fases. A camada hidrometanólica (superior) foi retirada com ajuda de uma pipeta de Pasteur e colocada em um frasco com tampa.

REAÇÃO DE COLORAÇÃO

2,0 mL da solução hidrometanólica, obtida depois da eliminação de carotenóides e clorofilas, foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL; acrescentaram-se 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL de solução de piridina-água (20:80) e 2,5 mL de solução a 6,6% de cloreto de alumínio anidro em metanol e completou-se o volume com água. Agitou-se e deixou-se em repouso por 15 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos, a aproximadamente 3000 rpm. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo limpo e mediu-se a absorvância da solução a 420 nm, em cubetas de quartzo, empregando-se água como branco. Simultaneamente, repetiu-se o procedimento descrito com uma segunda alíquota de solução hidrometanólica e calculou-se a média dos dois valores obtidos (A_{amostra}).

Para cada solução elaborou-se um branco misturando-se 2,0 mL da solução hidrometanólica com 0,6 mL de ácido acético glacial e diluindo-se para 25,0 mL com água. Agitou-se e deixou-se em repouso por 15 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos, a aproximadamente 3000 rpm. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo limpo e mediu-se a absorvância da solução nas mesmas condições empregadas para a amostra (A_{branco}).

CURVA PADRÃO PARA FLAVONÓIDES

A solução estoque (0,5 mg/mL) foi preparada dissolvendo 25,0 mg de rutina, em metanol, em um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com o mesmo solvente. Empregaram-se alíquotas de 0,25 mL; 0,5 mL; 1,0 mL e 1,5 mL desta solução, correspondentes a 0,125 mg; 0,250 mg; 0,500 mg e 0,750 mg de rutina, respectivamente. Completou-se cada um destes volumes para 2,0 mL pela adição de metanol. Adicionou-se, a cada um, 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL de solução de piridina-água (20:80) e 2,5 mL de solução a 6,6% de cloreto de alumínio anidro em metanol e completou-se para 25,0 mL com água, obtendo-se soluções de concentração 5, 10, 20, 30 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Agitou-se e deixou-se em repouso por 15 minutos. Mediu-se a absorvância de cada solução a 420 nm, em cubetas de quartzo, frente a água. A partir das concentrações finais obtidas (0,005; 0,010; 0,020 e 0,030 mg/mL) e das respectivas leituras de absorvância foi construída a curva de calibração.

Para cada grupo de amostras elaborou-se uma curva de calibração, seguindo o procedimento previamente descrito. Mediante análise de ANOVA comprovou-se ausência de diferença estatística entre as curvas de calibração elaboradas e, por isso, todos os pares de dados foram reunidos obtendo-se uma única curva de calibração cuja equação da reta de melhor ajuste foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

CÁLCULOS

O teor de flavonóides foi calculado pelas seguintes expressões, uma vez que o intercepto não diferia estatisticamente de zero:

$$A_{\text{corrigida}} = A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}$$

$$\text{concentração (mg / mL)} = \frac{A_{\text{corrigida}}}{\text{inclinação da reta}}$$

$$\% \text{ flavonóides} = \text{concentração (mg / mL)} \times \frac{96,25}{\text{massa (g)}}$$

$$\% \text{ flavonóides} = \frac{A_{\text{corrigida}}}{\text{massa}} \times 3,1056$$

Onde A = absorvância a 420 nm
massa = massa do material vegetal (g)

B. QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM EXTRATOS E FRAÇÕES

EXTRAÇÃO

Pesaram-se, com exatidão de 1 mg, amostras entre 20 e 100 mg do extrato ou fração a avaliar, de tal forma que o valor de absorvância final estivesse dentro da curva de calibração. Transferiu-se quantitativamente o material pesado para um balão de fundo plano de 125 mL. Adicionaram-se 12 mL de metanol e aqueceu-se esta mistura em banho-maria, sob refluxo, durante 30 minutos. O extrato obtido foi resfriado, deixado em repouso para que decantasse e filtrado através de algodão, recolhendo-se o filtrado, quantitativamente, em um balão volumétrico de 25 mL. Recolheu-se, no balão anterior, o algodão e acrescentaram-se 10 mL de metanol. A mistura foi extraída nas mesmas condições descritas anteriormente e filtrada, ao final, através de algodão, recolhendo-se o filtrado, quantitativamente, no mesmo balão. Lavou-se o algodão com 3 mL de metanol e completou-se o volume com este mesmo solvente.

ELIMINAÇÃO DE CAROTENOIDES E CLOROFILAS

Em um tubo de ensaio foram misturados, na ordem indicada, 20 mL da solução metanólica obtida como descrito no item de extração, 8 mL de clorofórmio e 12 mL de água. A mistura foi homogeneizada, transferida para dois tubos de centrífuga e centrifugada, por 20 minutos, na intensidade 5 (aprox. 3000 rpm), para completa separação das fases. A camada hidrometanólica (superior) foi retirada com ajuda de uma pipeta de Pasteur e colocada em um frasco com tampa.

REAÇÃO DE COLORAÇÃO

5,0 mL da solução hidrometanólica, obtida depois da eliminação de carotenóides e clorofilas, foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL; acrescentaram-se 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL de solução de piridina-água (20:80) e 2,5 mL de solução a 6,6% de cloreto de alumínio anidro em metanol e completou-se o volume com água. Agitou-se e deixou-se em

repouso por 15 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos em escala 5 da centrífuga (aprox. 3000 rpm). Transferiu-se o sobrenadante a um tubo limpo e mediu-se a absorvância da solução a 420 nm, em cubetas de quartzo, empregando água como branco. Simultaneamente repetiu-se o procedimento descrito com uma segunda alíquota de solução hidrometanólica e calculou-se a média dos dois valores obtidos (A_{amostra}).

Para cada solução elaborou-se um branco misturando-se 5,0 mL da solução hidrometanólica com 0,6 mL de ácido acético glacial e diluindo para 25,0 mL com água. Agitou-se e deixou-se em repouso por 15 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos na escala 5 da centrífuga (aprox. 3000 rpm). Transferiu-se o sobrenadante para um tubo limpo e mediu-se a absorvância da solução nas mesmas condições empregadas para a amostra (A_{branco}).

CURVA PADRÃO PARA FLAVONÓIDES

Realizou-se da mesma forma que para o ensaio com material vegetal. Empregaram-se alíquotas de 0,25 mL; 0,5 mL; 1,0 mL e 1,5 mL da solução estoque (0,5 mg/mL), completando cada um destes volumes para 5 mL com metanol, em lugar de a 2 mL. Realizaram-se duas curvas de calibração nestas condições. Mediante um teste de ANOVA demonstrou-se que estas curvas não eram estatisticamente diferentes às elaboradas previamente, por isso se reuniram todos os dados para uma única curva de calibração.

CÁLCULOS

O teor de flavonóides foi calculado pelas seguintes expressões, uma vez que o intercepto não diferia estatisticamente de zero:

$$A_{\text{corrigida}} = A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}$$

$$\text{concentração (mg / mL)} = \frac{A_{\text{corrigida}}}{\text{inclinação da reta}}$$

$$\% \text{ flavonóides} = \text{concentração (mg / mL)} \times \frac{19,25}{\text{massa (g)}}$$

$$\% \text{ flavonóides} = \frac{A_{\text{corrigida}}}{\text{massa}} \times 0,6211$$

Onde A = absorvância a 420 nm
 massa = massa do extrato ou fração (g)

4.3.3.4. QUANTIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PROANTOCIANIDINAS (HIERMANN, KARTING & AZZAM, 1986)

A quantificação espectrofotométrica de proantocianidinas foi realizada segundo a técnica descrita por HIERMANN, KARTING e AZZAM (1986).

A. QUANTIFICAÇÃO DE PROANTOCIANIDINAS EM MATERIAL VEGETAL

EXTRAÇÃO

Pesaram-se, com precisão de 1 mg, 0,5 ou 1 g do material vegetal moído, segundo o teor de proantocianidinas presente, transferiu-se o mesmo para um Erlenmeyer de 50 mL e extraiu-se, por 4 vezes, com 15 mL de uma solução de acetona-água (70:30), empregando-se agitador mecânico a 200 rpm, durante 15 minutos em cada extração. Filtraram-se as suspensões por algodão, posteriormente extraiu-se o algodão e o resíduo tal como indicado. Reuniram-se os filtrados, quantitativamente, num balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com a solução de acetona-água (70:30).

REAÇÃO DE COLORAÇÃO

Transferiu-se uma alíquota de 10,0 mL da solução obtida (item extração) para um balão de 250 mL, evaporou-se completamente o solvente em rotavapor a uma temperatura abaixo de 60 °C. Adicionaram-se, ao balão com o resíduo, 90 mL de solução de n-butanol-HCl 37% (95:5), adaptou-se um condensador e aqueceu-se esta solução, em banho de óleo, sob refluxo, durante duas horas à aproximadamente 130 °C. Resfriou-se e transferiu-se a solução, quantitativamente, para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com a solução de n-butanol-HCl 37% (95:5). Mediu-se a absorvância da solução a 540 nm, empregando-se a solução de n-butanol-HCl 37% (95:5), como branco. Nos casos em que a absorvância foi maior a 0,8 fez-se uma diluição da amostra com n-butanol-HCl 37% (95:5), fazendo-se a devida correção nos cálculos.

CÁLCULOS

O teor de proantocianidinas, expresso como cloreto de cianidina, foi calculado pela seguinte expressão:

$$\% \text{ proantocianidinas} = \frac{A}{\text{massa (g)}} \times 4.115$$

onde A = absorvância a 540 nm

massa = massa da amostra de material vegetal

B. QUANTIFICAÇÃO DE PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS E FRAÇÕES

EXTRAÇÃO

Pesaram-se, com precisão de 1 mg, entre 15 e 70 mg do extrato ou fração, segundo o teor de proantocianidinas presente, transferiu-se o mesmo para um Erlenmeyer de 50 mL e extraiu-se, por 4 vezes, com 10 mL de uma solução de acetona-água (70:30), empregando-se agitador mecânico a 200 rpm, durante 15

minutos em cada extração. Filtraram-se as suspensões por algodão juntando, na seguinte extração, o pedaço de algodão utilizado, ao material vegetal. Reuniram-se os filtrados, quantitativamente, num balão volumétrico de 50 mL. Completou-se o volume com a solução de acetona-água (70:30).

REAÇÃO DE COLORAÇÃO

Transferiu-se uma alíquota de 20,0 mL da solução obtida (item extração) para um balão de 250 mL, evaporou-se completamente o solvente em rotavapor a uma temperatura menor a 60 °C. Adicionaram-se ao balão com o resíduo 40 mL de solução de n-butanol-HCl 37% (95:5), adaptou-se um condensador de refluxo e aqueceu-se esta solução, em banho de óleo, durante duas horas a aproximadamente 130 °C. Resfriou-se e transferiu-se a solução, quantitativamente, para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com a solução de n-butanol-HCl 37% (95:5). Mediu-se a absorvância da solução a 540 nm, empregando-se a solução de n-butanol-HCl 37% (95:5), como branco. Nos casos em que a absorvância foi maior que 0,8 fez-se uma diluição da amostra com n-butanol-HCl 37% (95:5), fazendo-se a devida correção nos cálculos.

CÁLCULOS

O teor de proantocianidinas, expresso como cloreto de cianidina, foi calculado pela seguinte expressão:

$$\% \text{ proantocianidinas} = \frac{A}{\text{massa (g)}} \times 1,02875$$

onde A = absorvância a 540 nm

massa = massa da amostra do extrato ou fração

4.3.4. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALGUNS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR HPLC

4.3.4.1. DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS DA METODOLOGIA

Na etapa de desenvolvimento e otimização da metodologia analítica por HPLC realizaram-se ensaios para estabelecer o comprimento de onda, a fase móvel, o programa de gradiente, a temperatura do forno, o fluxo do solvente e o tratamento da amostra, adequados para a elaboração dos perfis cromatográficos e dos ensaios quantitativos. Empregou-se água deionizada em equipamento Milli-Q. O ar dos solventes foi removido por sonicação e vácuo. De modo geral foi usada a atenuação 2⁶ e a velocidade do papel 2,5 mm/min. Avaliaram-se as seguintes condições cromatográficas:

SISTEMA 1:

Comprimento de onda: 210 nm

Coluna: RP-18 de 250 x 4,6 d.i. e partículas de 5 µm, pré-coluna RP-18

Temperatura: 40 °C

Fluxo: 1,0 mL/min

Volume de injeção: 20 µL

Fase móvel:

solvente A: água

solvente B: acetonitrila grau HPLC

Programa de gradiente:

Tempo (min)	0	60	65	70
% Solvente B	10	90	90	10

SISTEMA 2:

Comprimento de onda: 210 nm

Coluna: RP-18 de 250 x 4,6 d.i. e partículas de 5 µm, pré-coluna RP-18

Temperatura: 40 °C

Fluxo: 1,0 mL/min

Volume de injeção: 20 µL

Fase móvel:

solvente A: água + 0,05% H₃PO₄

solvente B: acetonitrila grau HPLC + 0,05% H₃PO₄

Programa de gradiente:

Tempo (min)	0	60	65	70
% Solvente B	10	90	90	10

SISTEMA 3:

Comprimento de onda: 210 nm e 254 nm

Coluna: RP-18 de 250 x 4,6 d.i. e partículas de 5 µm, pré-coluna RP-18

Temperatura: 40 °C

Fluxo: 1,0 mL/min

Volume de injeção: 20 µL

Fase móvel:

solvente A: água + 0,05% H₃PO₄

solvente B: acetonitrila grau HPLC + 0,05% H₃PO₄.

Programa de gradiente:

Tempo (min)	0	60	65	70
% Solvente B	10	90	90	10

SISTEMA 4:

Comprimento de onda: 230 nm, 240 nm e 280 nm

Coluna: RP-18 de 125 x 4,6 d.i. e partículas de 5 µm, pré-coluna RP-18

Temperatura: 30 °C

Fluxo: 1,0 mL/min

Volume de injeção: 10 e 20 µL

Fase móvel:

solvente A: soluções tampão (acetato pH 4,0 / 4,5 / 5,0 e citrato pH 5,0)

solvente B: metanol grau HPLC

Programa de gradiente:

Tempo (min)	0	50	55	60	65
% Solvente B	5	50	50	5	5

4.3.4.2. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS EMPREGADAS

Nos ensaios definitivos, foi empregada a atenuação 2^6 , fazendo-se posteriormente os ajustes necessários. A velocidade do papel se manteve em 2,5 mm/min. Empregou-se água deionizada em equipamento Milli-Q. O ar dos solventes foi removido por sonicação e vácuo. Empregaram-se as condições cromatográficas descritas a seguir como sistemas 4 e 5.

A. OBTENÇÃO DE PERFIS CROMATOGRÁFICOS

SISTEMA 5:

Comprimento de onda: 240 nm e 280 nm

Coluna: RP-18 de 125 x 4,6 d.i. e partículas de 5 μ m e pré-coluna RP-18

Temperatura: 40 °C

Fluxo: 1,0 mL/min

Volume de injeção: 10 μ L

Fase móvel:

solvente A: Tampão acetato (ácido acético – acetato de sódio) 25 mM, pH 5,0

solvente B: Metanol grau HPLC

Programa de gradiente:

Tempo (min)	0	10	15	40	43	50	55	60	70
% Solvente B	5	20	23	26	60	90	90	5	5

B. ENSAIOS QUANTITATIVOS

SISTEMA 6:

Comprimento de onda: 350 nm

Coluna: RP-18 de 4,6 x 15 d.i. e partículas de 5 µm, précoluna RP-18

Temperatura: 40 °C

Fluxo: 1,0 mL/min

Volume de injeção: 10 µL

Fase móvel:

solvente A: Ácido acético 2% em água

solvente B: Ácido acético 2% em metanol grau HPLC

Programa de gradiente:

Tempo (min)	0	20	30	33	40	45	50	55	60	75
% Solvente B	10	17	18	22	23	40	90	90	10	10

4.3.4.3. IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS NOS CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS

Inicialmente injetaram-se soluções dos padrões disponíveis para comparação: ácido clorogênico, ácido protocatéquico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina, isoquercitrina, quercetina e canferol. Utilizaram-se soluções de concentrações de 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL, em metanol, injetando-se 10 e 20 µL. Quando necessário, empregaram-se soluções mais concentradas. Inicialmente fizeram-se injeções de cada uma destas soluções independentemente, para determinar seus tempos de retenção; posteriormente fizeram-se misturas de algumas destas soluções para confirmar a ordem de eluição. Finalmente, foram feitas co-injeções, isto é, uma mistura da solução de amostra com cada uma das soluções padrão em proporção 1:1, para um volume de injeção de 20 µL, para confirmar a identificação dos picos, salvo nos casos em que era preciso outra proporção para a adequada identificação dos picos.

4.3.4.4. OBTENÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

A. SOLUÇÕES ESTOQUE

Pesaram-se, com exatidão de 0,01 mg, 10,00 mg de ácido clorogênico; 1,00 mg de orientina e 1,00 mg de isoorientina em balões volumétricos de 5,0 mL. Diluiu-se cada padrão para o volume do balão, com metanol grau HPLC. As soluções estoque restantes foram mantidas no freezer.

B. SOLUÇÕES PARA INJEÇÃO NO CROMATÓGRAFO

Para um balão volumétrico de 5,0 mL foram transferidos 1,0 mL da solução estoque de ácido clorogênico (2 mg/mL) e 1,0 mL da solução estoque de orientina (0,2 mg/ml) e diluídas com metanol grau HPLC para o volume final do balão (solução A: ácido clorogênico 0,4 mg/mL; orientina 0,04 mg/mL).

Para um balão volumétrico de 5,0 mL transferiram-se 3,0 mL da solução estoque de orientina (0,04 mg/ml) e diluiu-se com metanol grau HPLC para o volume final do balão (solução B: isoorientina 0,12 mg/mL).

Para um balão volumétrico de 5,0 mL transferiu-se 1,0 mL da solução estoque de isoorientina (0,2 mg/ml) e diluiu-se com metanol grau HPLC para o volume final do balão (solução C: isoorientina 0,04 mg/mL).

Nas condições estabelecidas para os ensaios de quantificação por HPLC foram feitas cinco injeções de cada um dos seguintes volumes das soluções A e C: 2, 5, 20, 30 e 40 μ l. Da solução B foram feitas cinco injeções de 20 e 30 μ L. Das três soluções, A, B e C, foram feitas dez injeções de 10 μ L .

Registraram-se as áreas dos picos nas curvas e realizaram-se os cálculos correspondentes para definir a equação da reta de melhor ajuste pelo método de mínimos quadrados, para cada padrão injetado, empregando-se o Programa Excel[®]. No caso em que o intervalo de confiança incluía o zero, escolheu-se a opção de ajustar a passagem da reta pela origem.

4.3.4.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A. LINEARIDADE

Com os dados das curvas de calibração e aqueles obtidos pelo Programa Excel[®], após o estabelecimento das retas com melhor ajuste, avaliou-se para cada uma das curvas de calibração obtidas:

- Validade da regressão linear : ANOVA,
- Passagem das retas pela origem,
- Inclinação da reta e
- Teste do coeficiente de correlação.

B. PRECISÃO

REPETIBILIDADE: A repetibilidade da resposta foi avaliada para os padrões, calculando-se para cada concentração de cada padrão as médias e os desvios padrão relativos (DPR).

PRECISÃO INTERMEDIÁRIA: Prepararam-se e injetaram-se, em dias diferentes, cinco amostras de lâminas foliares de folhas maduras do espécimen SP-S-8. Calcularam-se as médias e os desvios padrão relativos (DPR) para a concentração de ácido clorogênico, orientina e isoorientina, calculadas empregando-se a respectiva curva de calibração.

C. SELETIVIDADE

Foram injetadas as mesmas soluções padrão de ácido clorogênico, orientina e isoorientina utilizadas para a elaboração das curvas de calibração (solução A e solução B), a 280 nm, nas mesmas condições cromatográficas empregadas para a elaboração das curvas de calibração. Para verificar a seletividade, verificou-se manutenção da relação entre as áreas dos picos, entre os dois grupos de ensaios, a 280 nm e a 350 nm.

Adicionalmente, foram injetadas amostras de lâminas foliares de folhas maduras do espécimen SP-S-8 com diferentes sistemas gradientes, para verificar se os picos selecionados correspondiam a uma única substância.

D. CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DETECTÁVEL

Foram injetados 1, 2, 3 e 4 μL de cada solução padrão, correspondendo a 0,4; 0,8; 1,2 e 1,6 μg de ácido clorogênico e a 0,04; 0,08; 0,12 e 0,16 μg de orientina e isoorientina. Estabeleceu-se como concentração mínima detectável aquela onde fosse diferenciável o pico da linha base

E. CONCENTRAÇÃO MÍNIMA QUANTIFICÁVEL

Definiu-se como concentração mínima quantificável, o menor valor da curva de calibração, onde ainda se cumprem os parâmetros de linearidade e precisão.

4.3.4.6. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ORIENTINA E ISOORIENTINA NAS FOLHAS DE *CECROPIA GLAZIOVII*

A. AMOSTRAS SELECIONADAS

Para a quantificação de ácido clorogênico, orientina e isoorientina por HPLC foram selecionadas amostras que continham o menor e o maior teor de flavonóides de cada grupo, determinados a partir das análises espectrofotométricas. Assim, as amostras selecionadas foram: RD-C, SP-C (espécimes B,D e E), SP-S (espécimes 5 e 8), SP-Jun, UFMG-C, UFMG-S, e os espécimes 1 e 5 de C-F-C, C-M-C, C-C-C, C-F-S, C-M-S e C-C-S. Para as amostras em que se dispunha de material correspondente a folhas novas e a folhas maduras, estas foram analisadas separadamente. Adicionalmente, realizou-se a quantificação em pecíolos da amostra SP-S-8.

B. PREPARO DA SOLUÇÃO PARA INJEÇÃO

Pesaram-se, com exatidão de 0,1 mg cerca de 500 mg de material vegetal em pó os quais foram transferidos para um Erlenmeyer de 50 mL. Adicionaram-se cerca de 25 mL de uma solução de etanol 96% - água (7:3) e extraiu-se no banho de ultra-som por 15 minutos. Filtrou-se através de algodão e extraiu-se o resíduo e o algodão duas vezes mais com porções de 25 mL de solução de etanol 96% - água (7:3). Evaporou-se o filtrado, em rotavapor em temperatura menor que 60 °C. Empregou-se um balão de 125 mL, e evaporaram-se as três porções de 25 mL, no mesmo balão, mas de forma independente.

Eliminou-se o resíduo de solvente colocando-se o balão com o extrato no vácuo, por duas horas. Adicionaram-se com pipeta volumétrica, 5,0 mL de uma solução metanol grau HPLC – água Mili-Q (1:1). Dissolveu-se o extrato, por sonicação, por dois minutos, tendo-se o cuidado de se por o solvente em contacto com todo o resíduo. Transferiu-se a suspensão para quatro frascos Eppendorf de 1,5 mL, com ajuda de uma pipeta Pasteur. Centrifugou-se por 10 min, a 10000 rpm.

Transferiu-se a solução sobrenadante para um cartucho RP-18 previamente acondicionado com metanol grau HPLC. Para eliminar o excesso de metanol injetou-se ar no cartucho, com ajuda de uma seringa. Posteriormente, o cartucho foi acondicionado com a solução a injetar, utilizando-se o conteúdo de um frasco Eppendorf (aprox. 1 mL), descartando-se esta solução. A solução dos três frascos Eppendorf restantes foi passada, então, pelo cartucho e coletada em frascos para o injetor automático do aparelho de HPLC. Para forçar a passagem das soluções através do cartucho, foi empregada uma seringa, com a qual se injetava ar. Finalmente, o cartucho era lavado com metanol várias vezes, antes de ser novamente utilizado. Empregou-se um cartucho para cada amostra, utilizando-se o mesmo para as soluções correspondentes às folhas novas e folhas maduras da mesma árvore.

C. INJEÇÃO

Injetaram-se, na maioria dos casos, 10 μ L de solução. Se alguma das áreas dos picos avaliados não ficava dentro dos intervalos da curva de calibração, injetava-se um volume maior ou menor, dependendo do caso, para ter um valor de área do pico, dentro do intervalo estabelecido.

4.3.4.7. OBTENÇÃO DE PERFIS POR HPLC

Para a obtenção dos perfis cromatográficos das amostras de material vegetal foram preparadas como descrito para os ensaios de quantificação por HPLC (item 4.3.4.5). Para o registro dos perfis cromatográficos a 240 e 280 nm foram utilizadas as condições cromatográficas citadas no item 4.3.4.2-A (fase móvel: tampão acetato, pH 5,0, 25 mM / metanol). Os perfis cromatográficos a 350 nm foram obtidos durante os ensaios de quantificação por HPLC (item 4.3.4.6), empregando as condições cromatográficas descritas no item 4.3.4.2-B (fase móvel: ácido acético 2% em água / ácido acético 2% em metanol). Adicionalmente, obtiveram-se alguns perfis a 280 nm, empregando as condições descritas no item 4.3.4.2-B.

No caso de amostras de extratos e frações pesaram-se, em um frasco Eppendorf de 1,5 mL, cerca de 10 mg de extrato e 5 mg de fração, adicionou-se 1,0 mL de solução metanol-água (1:1) e extraiu-se em banho de ultra-som por 15 minutos. Centrifugou-se por 10 minutos a 10000 rpm e transferiu-se a solução sobrenadante para um frasco do injetor do aparelho de HPLC. Utilizaram-se as condições cromatográficas dos ensaios de quantificação (item 4.3.4.2-B; fase móvel: ácido acético 2% em água / ácido acético 2% em metanol) a 280 nm e a 350 nm.

4.3.5. DEFINIÇÃO DE METODOLOGIA PARA A OBTENÇÃO DE UM EXTRATO SEMIPURIFICADO, ENRIQUECIDO EM FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS

4.3.5.1. ESCOLHA DO SOLVENTE EXTRATOR

Para este ensaio foram utilizadas cinco amostras de material vegetal em pó, correspondente a folhas maduras: RD-C-M, UFMG-S-M, SP-S-M (espécimes 2, 5 e 8). Foi avaliada a capacidade extrativa de flavonóides e proantocianidinas de etanol 96%, e de misturas etanol 96% - água (7:3), acetona – água (7:3), além de água quente.

A. OBTENÇÃO DE EXTRATOS POR PERCOLAÇÃO

Na primeira fase foi realizado um ensaio empregando-se amostra RD-C-M e como metodologia uma percolação. Para tal fim, extraíram-se 200 g de material vegetal em pó, com cada solvente. Antes da extração propriamente dita, o material foi pré-extraído exaustivamente com *n*-hexano. Foram necessários 9 L de *n*-hexano, para cada 200 g de material vegetal, adicionados em porções de 750 mL.

Cada porção de material vegetal, desengordurado, foi percolada exaustivamente com cada um dos solventes em avaliação, etanol, etanol-água (7:3) ou acetona-água (7.3). Empregaram-se 9 L de cada solvente, em porções de 750 mL. A primeira porção de 750 mL foi de etanol ou acetona segundo o solvente correspondente, etanol-água ou acetona-água, para evitar formação de duas fases com a mistura direta do *n*-hexano com o solvente hidroalcoólico ou hidroacetônico. O percolado assim obtido foi misturado com os extratos hidroetanólicos ou hidroacetônicos do mesmo percolador.

Considerou-se o material exaustivamente extraído pela intensidade da cor do percolado e pela intensidade das manchas observadas em CCD para flavonóides, no percolado. O solvente foi evaporado em rotavapor e o resíduo foi deixado sob

vácuo, até obter-se um extrato seco. Calculou-se o rendimento. Obtiveram-se assim quatro extratos: *n*-hexânico (EH), etanólico (EE), hidroetanólico (EA) e hidroacetônico (AA).

B. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS POR SONICAÇÃO

Pesaram-se, com exatidão de 1 mg, cerca de 6 g de pó de lâminas foliares de folhas maduras. Extraíu-se com cinco porções de 40 mL do solvente respectivo, etanol, etanol-água 7:3 ou acetona-água 7:3, em banho de ultra-som por períodos de 15 min. Cada solução era filtrada através de algodão e o resíduo, junto com o algodão era novamente extraído. Os filtrados reunidos, foram evaporados até *secura*, em rotavapor, a temperatura menor que 60 °C. Finalmente, os extratos foram colocados em dessecador sob vácuo, para eliminar os resíduos de solvente. Obtiveram-se, assim, três extratos: etanólico (EE), hidroetanólico (EA) e hidroacetônico (AA), para cada amostra de material vegetal: RD-C-M, UFMG-S-M, SP-S-M (espécimes 2, 5 e 8).

Das amostras SP-S-M, espécimes 2 e 5, foram empregados somente 2,5 g de material vegetal com porções de 20 mL de solvente, uma vez que se dispunha de pequena quantidade destas amostras.

C. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS

Foi considerado o modo de preparo indicado por MATOS (2002), isto é, o cozimento de duas folhas secas (c.a. 20 g), em 0,5 L de água. A 10 g de material vegetal em pó foram adicionados 250 mL de água quente, aqueceu-se até ebulição por 15 minutos, filtrou-se sob vácuo, concentrou-se em rotavapor e eliminou-se o resíduo de solvente sob vácuo. Obteve-se, assim, o extrato identificado como AQ-K1. Adicionalmente foi preparado um extrato três vezes mais concentrado identificado como AQ-K3, seguindo o mesmo procedimento, mas empregando 12 g de material vegetal e 75 mL de água. Com a amostra RD-

C-M foram preparados extratos aquosos nas proporções K1 e K3, já para as outras amostras preparou-se somente o extrato correspondente a K1.

D. ENSAIOS REALIZADOS COM OS EXTRATOS OBTIDOS

Para todos os extractos preparados foi calculado o rendimento da extração e foram realizados os seguintes ensaios:

- Quantificação espectrofotométrica de flavonóides,
- Quantificação espectrofotométrica de proantocianidinas,
- Atividade vasorelaxante em anéis de aorta de ratos, previamente contraídos com fenilefrina.

4.3.5.2. SELEÇÃO DA PROPORÇÃO DE ETANOL E ÁGUA

Após analisar os resultados dos ensaios prévios para definir o solvente de extração mais apropriado escolheu-se a mistura hidroalcoólica. Para definir a proporção de água e etanol 96%, prepararam-se extratos seguindo-se a metodologia que utiliza banho de ultra-som (item 4.3.5.1-B) empregando-se misturas de etanol-água nas proporções (3:7), (1:1) e (7:3) e pó de lâminas foliares de amostra SP-Jun-M.

Analisou-se, também, o efeito de concentrar e filtrar, para retirar os compostos mais apolares. Para tal fim, depois de se obter a solução hidroetanólica, esta foi concentrada até reduzir o volume quatro vezes. Posteriormente a solução concentrada foi filtrada por algodão, e o resíduo lavado com água. As soluções, concentradas e filtradas, foram evaporadas até secura, em rotavapor, a temperatura menor que 60 °C. Finalmente, os extratos foram colocados em dessecador sob vácuo, para eliminar o resíduo de solventes.

Obtiveram-se, assim, seis extratos: etanol-água (3:7) sem filtrar, etanol-água (3:7) filtrado, etanol-água (1:1) sem filtrar, etanol-água (1:1) filtrado, etanol-água (7:3) sem filtrar, etanol-água (7:3) filtrado.

Para cada um dos extratos obtidos foram realizados os seguintes ensaios:

- Quantificação de flavonóides,
- Quantificação de proantocianidinas,
- Perfil por HPLC a 280 nm, empregando-se o sistema cromatográfico 5 (item 4.3.4.2-B).
- Atividade vasorelaxante em anéis de aorta de ratos, previamente contraídos com fenilefrina (somente para os extratos sem filtrar).

4.3.5.3. ESCOLHA DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO

O ensaio anterior determinou que o solvente mais adequado era etanol 96% - água (1:1). Utilizando pó de lâminas foliares de amostra SP-S-M, espécime 8, foram avaliadas três metodologias extrativas: maceração, percolação contínua e percolação descontínua. Para cada caso seguiu-se a seguinte metodologia.

A. MACERAÇÃO

30 g de material vegetal foram umedecidos com a menor quantidade possível de solvente (100 mL). Posteriormente, foram adicionados 1200 mL de solvente e agitou-se, manualmente. Deixou-se em repouso por 5 dias, com agitação manual por alguns minutos, a cada dia. Filtrou-se e concentrou-se o extrato até securo em rotavapor, em temperatura menor que 60 °C, e deixou-se sob vácuo, em dessecador.

B. PERCOLAÇÃO CONTÍNUA

30 g de material vegetal foram umedecidos com a menor quantidade possível de solvente (100 mL) e transferidos para um funil de decantação de 500 mL, acondicionado como percolador. Mediram-se 1200 mL de solvente. Adicionaram-se cerca de 300 mL de solvente ao funil, e permitindo-se a eliminação de ar. Abriu-se a torneira, de tal forma que escoaram aproximadamente, 30 gotas por minuto. Verteram-se no funil, lentamente, os 900 mL de solvente restantes.

Deixou-se gotejando até a saída da máxima quantidade de extrato e fez-se pressão, com um bastão de vidro, para eliminar o extrato ainda no percolador. Filtrou-se e concentrou-se o extrato até securo, em rotavapor, em temperatura menor que 60 °C, e deixou-se sob vácuo, em dessecador.

C. PERCOLAÇÃO DESCONTÍNUA

30 g de material vegetal foram umedecidos com a menor quantidade possível de solvente (100 mL) e transferiram-se para um funil de decantação de 500 mL, acondicionado como percolador. Adicionaram-se 300 mL de solvente, permitindo-se a eliminação de ar. Deixou-se em repouso por 12 horas. Abriu-se a torneira para retirar o extrato e fechou-se de novo. Adicionaram-se novamente 300 mL de solvente e repetiu-se a extração por 5 vezes, isto é até completar a adição de 1200 mL de solução. Deixou-se gotejando até a saída da máxima quantidade de extrato e fez-se pressão, com um bastão de vidro, para eliminar o extrato do percolador. Filtrou-se e concentrou-se o extrato até securo, em rotavapor, em temperatura menor que 60 °C, e deixou-se sob vácuo, em dessecador.

D. ULTRA-SOM

10 g de material vegetal foram umedecidos com a menor quantidade possível de solvente (30 mL), adicionaram-se 100 mL de solvente e extraiu-se por sonicação durante 15 min. Filtrou-se o extrato através de algodão e repetiu-se a extração com mais 3 porções de 100 mL. Concentrou-se o extrato até securo, em rotavapor em temperatura menor que 60 °C e deixou-se sob vácuo, em dessecador.

E. ENSAIOS REALIZADOS COM OS EXTRATOS OBTIDOS

Calculou-se em cada caso, o rendimento da extração e para cada um dos extratos obtidos foram realizados os seguintes ensaios:

- Quantificação de flavonóides,
- Quantificação de proantocianidinas,

- Atividade vasorelaxante em anéis de aorta de ratos, previamente contraídos com fenilefrina.

4.3.6. OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ENRIQUECIDAS EM FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS

4.3.6.1. EXTRATO AQUOSO PREPARADO POR DECOCCÃO

A 90 g de material vegetal em pó, SP-Jun-M, foram adicionados 750 mL de água destilada e aqueceu-se a ebulição por 15 min, utilizando agitação magnética. Filtrou-se sob vácuo, lavando a torta com 100 mL de água quente. Repetiu-se a extração com outras 3 porções de 90g. A solução extrativa aquosa foi mantida em geladeira e liofilizada. Da mesma forma foi preparado o extrato aquoso de SP-Jun-N, utilizando 60 g de material vegetal em pó e 500 mL de água.

Com estes extratos aquosos liofilizados foram realizados os seguintes ensaios de caracterização:

- Quantificação de flavonóides,
- Quantificação de proantocianidinas,
- Perfil por HPLC a 280 nm e
- Atividade vasorelaxante em anéis de aorta de ratos, previamente contraídos com fenilefrina.

4.3.6.2. PARTIÇÃO DO EXTRATO AQUOSO COM SOLVENTES IMISCÍVEIS

5 g do extrato aquoso liofilizado de SP-Jun-M foram dissolvidos em 50 mL de água, e extraídos com 3 porções de 25 mL de acetato de etila. A fração aquosa resultante, FAQ1, foi novamente extraída com 3 porções de 25 mL de *n*-butanol, dando origem as frações *n*-butanólica FB1 e aquosa FAQ2 (FIGURA 3A). Este esquema de partição foi repetido até fracionar 45 g de extrato aquoso liofilizado. Uma porção de 5 g de extrato aquoso liofilizado foi extraída somente com *n*-butanol para obter as frações *n*-butanólica FB2 e aquosa FAQ3 (FIGURA

3B). As frações obtidas foram concentradas em rotavapor e deixadas sob vácuo, em dessecador.

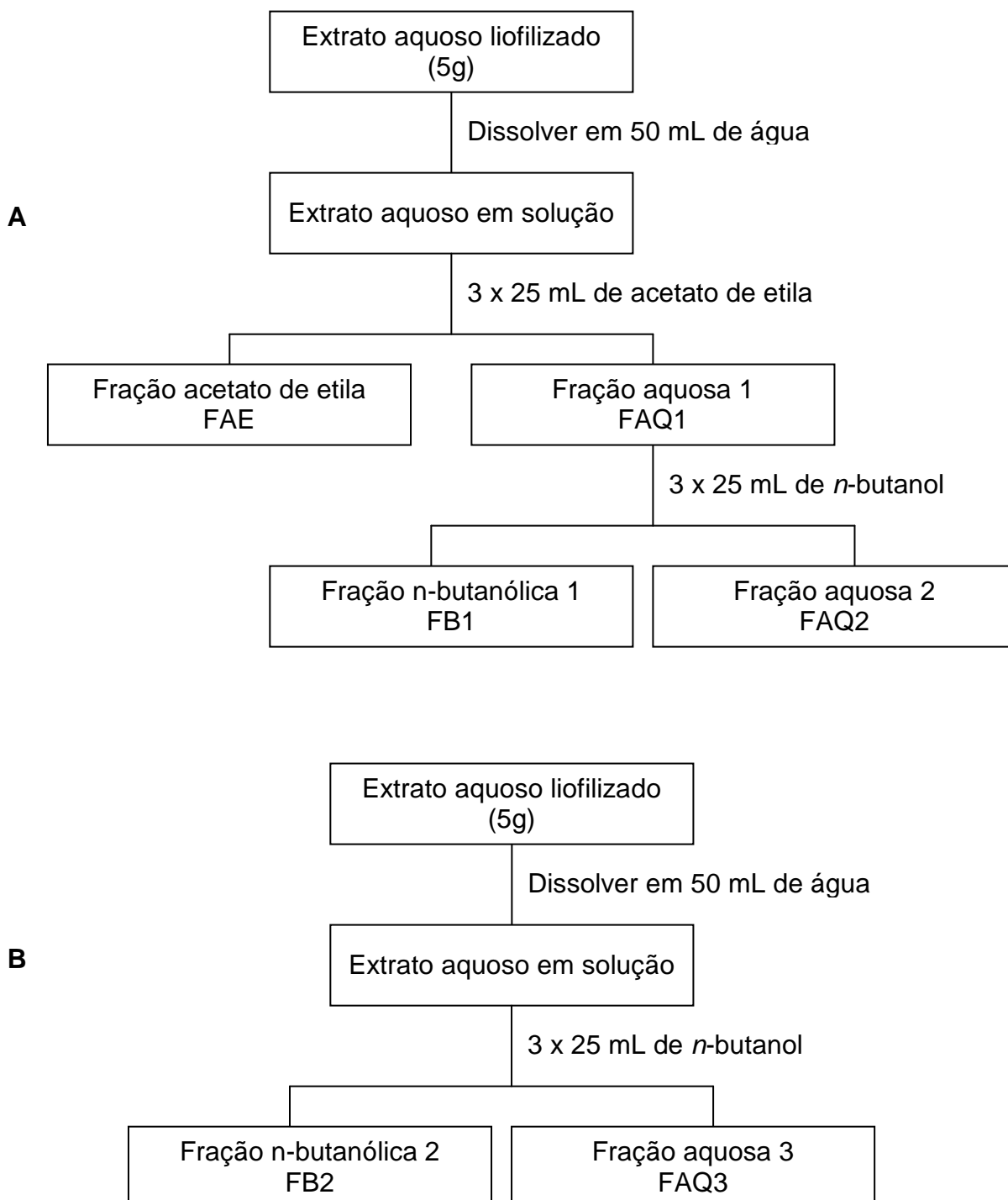


FIGURA 3. Fluxogramas das partições com solventes imiscíveis do extrato aquoso liofilizado de *C. glaziovii*.

Calculou-se para cada fração, o rendimento, tendo como referência a quantidade fracionada de extrato aquoso liofilizado e realizaram-se os seguintes ensaios de caracterização:

- Quantificação de flavonóides,
- Quantificação de proantocianidinas,
- Perfil por CCD,
- Perfil por HPLC a 280 nm e

Atividade vasorelaxante em anéis de aorta de ratos, previamente contraídos com fenilefrina.

4.3.6.3. FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20

As frações FAE e FB2 (FIGURA 3A) foram submetidas a fracionamento por cromatografia em coluna aberta de Sephadex LH-20, em metanol. Utilizou-se uma coluna de 63 cm de altura e 2,8 cm de diâmetro interno, onde a fase estacionária ocupava 35 cm de altura. Para tal fim empregaram-se porções de 500 mg de FAE ou de 1 g de FB2.

A respectiva fração foi dissolvida, por sonicação, em 5 mL de metanol e filtrada através de algodão. A solução resultante foi adicionada à coluna e submeteu-se à eluição isocrática com metanol, coletando-se aproximadamente 40 frações de 15 mL e 5 frações de 100 mL. Descartaram-se os primeiros 75 mL de eluato, após verificar que correspondiam apenas ao solvente.

As frações obtidas foram concentradas e analisadas por CCD em sílica gel utilizando-se como fase móvel acetato de etila – ácido acético – ácido fórmico – água (100:11:11:27) e anisaldeído sulfúrico, com aquecimento, como revelador, reunindo-se as frações de acordo com o perfil obtido. Da fração acetato de etila foram obtidas 4 subfrações: FAE-A, FAE-B, FAE-C e FAE-D. A fração *n*-butanólica foi fracionada em 5 grupos: FB1-A, FB1-B, FB1-C, FB1-D e FB1-E.

Para as diferentes sub-frações foram realizados os perfis cromatográficos a 280 nm, empregando-se o sistema cromatográfico 5 (item 4.3.4.2-B). Com as frações provenientes de FB1 foi determinado, por espectrofotometria, o teor de flavonóides e o teor de proantocianidinas.

4.3.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VASODILATADORA

A atividade hipotensora foi avaliada utilizando-se o modelo de vasodilatação produzida em anéis pré-contraídos de aorta de ratos (LEMOS et al., 1999; CÔRTEZ et al., 2002; VALADARES et al., 2003). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular / ICB / UFMG, pelo Prof. Dr. Steyner de França Côrtes.

4.3.7.1. ANIMAIS

Em todos os experimentos foram utilizados ratos Wistar machos (200 - 250 g), criados em condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C) e expostos a períodos de luz e penumbra (12 -12 h).

4.3.7.2. PREPARAÇÃO DE ANÉIS DE AORTA

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, seguido de sangria por perfuração da artéria carótida. A aorta foi rapidamente dissecada e, depois de retirar os excessos de gordura e tecido conectivo, fragmentada em anéis de 4-5 mm de comprimento. Os anéis foram mantidos, a 37 °C, em solução isotônica de Krebs-Henseleit (NaCl 110,8 mM, KCl 5,9 mM, NaHCO₃ 25,0 mM, MgSO₄ 1,07 mM, CaCl₂ 2,49 mM, NaH₂PO₄ 2,33 mM e glicose 11,51 mM) gaseificada com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂), sob a mesma tensão (aproximadamente 1,5 g) (LEMOS et al., 1999; CÔRTEZ et al., 2002; VALADARES et al., 2003).

4.3.7.3. ATIVIDADE VASODILATADORA

Os anéis foram equilibrados por uma hora antes de iniciar os ensaios, trocando-se a solução fisiológica a cada 15 minutos. Depois do período de equilíbrio, visando avaliar a capacidade contráctil dos tecidos, foi provocada uma resposta contráctil pela administração de fenilefrina 0,3 μM (concentração submáxima). Posteriormente, após resposta contráctil estável, foi administrada acetilcolina 1 μM . A presença de endotélio funcional foi confirmada por vasodilatação superior a 50%. As respostas dos tecidos foram registradas empregando-se transdutores isométricos e fisiógrafos. Para a execução dos testes os anéis foram lavados e novamente estabilizados por 30 minutos, antes de se adicionar fenilefrina 0,3 μM para produzir a contração dos tecidos. Depois que a contração alcançou o equilíbrio foram adicionadas as amostras solubilizadas ou suspensas em água a uma concentração máxima, no banho, de 10^{-4} $\mu\text{g/mL}$. Após adição de cada amostra, aguardaram-se 30 min. para permitir que as preparações atingissem o equilíbrio. Somente, então, realizaram-se novos testes. As preparações controle foram submetidas, simultaneamente, aos mesmos procedimentos. Para estabelecer a porcentagem de vasodilatação das amostras, considerou-se como 100%, a resposta vasodilatadora produzida pela acetilcolina (1 μM) (LEMOS et al., 1999; CÔRTEZ et al., 2002; VALADARES et al., 2003).

4.3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram realizados, pelo menos em triplicata e os dados foram analisados pelos testes de t de Student para variâncias iguais, com α de 0,05. Para as comparações entre três ou mais amostras empregou-se o teste de Dunnett, para α de 0,05 ; os intervalos de confiança para as médias (IC_{95%}) foram calculados, aplicando a expressão (DANIEL, 1991; CALLEGARI-JACQUES, 2004):

$$\text{IC}_{95\%} = \text{média} \pm t_{\alpha=0,05, \text{gl}} \frac{\text{desvio padrão}}{\sqrt{\text{número de dados}}}$$

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. MATERIAL VEGETAL

O material vegetal recebido, encontrava-se em boas condições, observando-se muito pouco material estranho, constituído, basicamente, por areia, teias de aranha e insetos, como larvas, pupas e adultos. Os orifícios causados por ataque de insetos, mais freqüentes nas coletas da época chuvosa, eram poucos e menores que 1 cm de diâmetro. Fez-se a separação de folhas novas, folhas maduras, lâminas foliares, pecíolos e estípulas.

De forma geral, as folhas maduras, rugosas, apresentavam de 9 a 11 lóbulos. As folhas novas eram menores (TABELA 4) e mais macias que as maduras. Os brotos, cobertos pela estípula, apresentavam cor verde clara avermelhada e eram muito macios. Pela pouca disponibilidade de folhas novas e brotos, estes foram moídos juntos, separando-se somente as estípulas. A mistura de folhas novas e brotos foi identificada como folhas novas. Para a determinação das dimensões selecionaram-se, aleatoriamente, 50 folhas maduras, 20 folhas novas e 20 brotos. Consideraram-se o lóbulo maior e a parte mais larga da folha. O diâmetro do pecíolo foi medido na sua parte central.

TABELA 4 – DIMENSÕES DAS FOLHAS DE *CECROPIA GLAZIOVII*

TIPO DE FOLHA	LÂMINA FOLIAR		PECÍOLO	
	COMPRIMENTO (cm)	LARGURA (cm)	DIÂMETRO (mm)	COMPRIMENTO (cm)
Madura	25 ± 4	18 ± 3	8 ± 2	67 ± 9
Nova	13 ± 2	9 ± 2	3 ± 1	13 ± 4
Broto	4 ± 1	n.d.	< 1	< 5

O material vegetal foi seco durante cerca de uma semana na estufa a 40 °C com ar circulante, quando as amostras apresentaram perdas por dessecação inferiores a 10%. O material proveniente de cultivo foi processado e seco nas mesmas condições.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL – ENSAIOS FARMACOGNÓSTICOS GERAIS

Visando dispor de uma referência preliminar, estes ensaios foram realizados unicamente com as amostras RD-C-M e RD-C-N, escolhidas aleatoriamente, por serem as primeiras coletadas. No entanto, para determinar se as características observadas para a amostra analisada se aplicam para a espécie, seria necessário avaliar um número maior de indivíduos e proceder a análise estatística apropriada.

Para cada um dos ensaios realizados se compararam os resultados obtidos com os limites para drogas oficiais na Farmacopéia Brasileira, com o objetivo de se ter um valor de referência, uma vez que estes são os primeiros dados deste tipo de caracterização para *C. glaziovii*. Como a comparação foi feita com resultados para folhas provenientes de uma única árvore e frente a valores estabelecidos para plantas de outros gêneros, esta tem valor limitado e é apenas preliminar.

5.2.1. PERDA POR DESSECAÇÃO

Na TABELA 5 se encontram os dados das perdas por dessecação do pó do material vegetal. Em todos os casos encontraram-se valores inferiores a 12%, limite recomendado para evitar a proliferação de bactérias, fungos e a hidrólise enzimática (WHO, 1998; SHARAPIN, 2000). O limite geral de quantidade de água, principal componente que é perdido durante a dessecação é, às vezes, recomendado como um intervalo, tal é o caso da Farmacopéia Brasileira (1988) que recomenda como limite geral de umidade, para drogas vegetais, de 8 a 14%, tendo-se recomendações específicas em cada monografia onde os limites máximos ficam entre 5 e 15% (FARMACOPÉIA ... , 1996).

Os valores obtidos para as respectivas triplicatas apresentam pequena dispersão, o que sugere ter ocorrido uma secagem homogênea, salvo no caso dos pecíolo, possivelmente, devido à dificuldade de secagem no interior dos

mesmos, apesar de terem sido cortados em porções menores que 15 cm, para facilitar a perda de água. Os valores médios encontrados para as perdas por dessecação dos pecíolos e das lâminas foliares (RD-C-M) são muito semelhantes, de tal forma que as diferenças observadas em alguns testes, nos resultados para pecíolos e lâminas foliares, não são devidos a diferenças em umidade.

TABELA 5 – PERDA POR DESSECAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL DE *C. GLAZIOVII* (100 ± 5 °C) APÓS A SECAGEM E MOAGEM

AMOSTRA*	PARTE DA PLANTA	PERDA POR DESSECAÇÃO (% \pm IC _{95%})
RD-C-M	Pecíolos	7,75 \pm 1,45
	Lâminas foliares	7,73 \pm 0,29
UFMG-S-M	Lâminas foliares	9,08 \pm 0,28
SP-S-8-M	Lâminas foliares	7,89 \pm 0,08

* Vide Tabela 1, pág. 54, para identificação das siglas das amostras analisadas. n=3

5.2.2. CINZAS TOTAIS

Os valores encontrados para cinzas totais estão resumidos na TABELA 6. Lembrando que as cinzas totais incluem tanto as substâncias não voláteis derivadas do tecido vegetal (cinzas fisiológicas), quanto aquelas provenientes de materiais estranhos, especialmente areia e terra aderente à superfície da droga (cinzas não-fisiológicas) (WHO, 1998; FARMACOPÉIA ... ,1996) e que não se tem outros relatos de teor de cinzas para *C. glaziovii*, nem para outras espécies do mesmo gênero que permitam prever o teor das cinzas fisiológicas, não é possível inferir se o valor encontrado é alto, médio ou baixo. Os limites máximos de cinzas totais, exigidos nas monografias da Farmacopéia Brasileira, na terceira edição (1977), estão entre 7 e 20% e na quarta edição (1996), entre 5 e 15%, para drogas vegetais, onde a parte empregada são as folhas. Os valores encontrados foram próximos a 9%, estão dentro da faixa estipulada.

TABELA 6 – TEOR DE CINZAS TOTAIS NO PÓ DO MATERIAL VEGETAL DE *C. GLAZIOVII*

AMOSTRA*	PARTE DA PLANTA	CINZAS TOTAIS (% ± IC _{95%})
RD-C-M	Pecíolos	9,24 ± 0,24
	Lâminas foliares	9,53 ± 0,25

* Vide Tabela 1, pág. 54, para identificação das siglas das amostras analisadas. n=3

5.2.3. CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO

Neste teste são esperados, na maioria das drogas vegetais, valores pequenos, devido a que este tipo de cinzas corresponde às cinzas não-fisiológicas, isto é, aquelas provenientes de material estranho, especialmente areia e terra. Sabe-se, no entanto que algumas espécies, apresentam valores altos de cinzas fisiológicas sem que isto represente contaminação, e sem uma característica do gênero ou da espécie.

TABELA 7 – TEOR DE CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO NO PÓ DO MATERIAL VEGETAL DE *C. GLAZIOVII*

AMOSTRA*	PARTE DA PLANTA	CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO (% ± IC _{95%})	PROPORÇÃO DAS CINZAS TOTAIS (%)
RD-C-M	Pecíolos	0,22 ± 0,11	2,4
	Lâminas foliares	2,44 ± 0,20	25,6

* Vide Tabela 1, pág. 54 , para identificação das siglas das amostras analisadas. n=3

Embora os valores de cinzas totais obtidos sejam similares (TABELA 6), o teor de cinzas insolúveis em ácido é muito menor para os pecíolos que para as lâminas foliares e corresponde a cerca de 2% das cinzas totais, enquanto para as amostras de lâminas foliares alcança 25% das cinzas totais (TABELA 7). Esta diferença indica a presença de maior teor de constituintes minerais nas lâminas foliares. A Farmacopéia Brasileira estabelece, nas monografias para drogas vegetais, teores máximos de cinzas insolúveis em ácido, entre 2,5 e 4% na

terceira edição (1977) e entre 2,0 e 6,0% na quarta edição (1996). O teores de cinzas insolúveis em ácido, obtidos para folhas de *C. glaziovii*, estão próximos aos exigidos para as drogas farmacopéicas.

As cinzas de folhas de *Cecropia* são utilizadas pelos indígenas amazônicos para o *mambeo* da folha de coca (HOLMSTEDT et al., 1979; MUÑOZ-DELGADO, 2000), possivelmente por conter óxidos metálicos, que facilitariam a extração dos alcalóides, o que estaria de acordo com os valores encontrados para cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido.

5.2.4. ÍNDICE DE INTUMESCÊNCIA

O índice de intumescimento informa sobre o comportamento de um material vegetal ao ser misturado com água e se relaciona com a quantidade de gomas, mucilagens, pectinas e hemicelulose (WHO, 1998). Se o emprego do material vegetal está associado às substâncias anteriormente mencionadas, este teste permite avaliar a qualidade do material. Durante a padronização de um processo industrial, especialmente se água é empregada como solvente, o valor alcançado por este índice vai determinar o tamanho dos lotes ou a capacidade requerida para os equipamentos a serem empregados durante o processo, especialmente nas etapas de extração.

Os valores de índice de intumescimento, relatados na TABELA 8, evidenciam a presença de substâncias capazes de aumentar seu volume em presença de água, tais como gomas, mucilagens, pectina e hemicelulose. O incremento no volume, após a umectação, foi considerável, especialmente no caso das lâminas foliares onde o volume aumentou em cerca de quatro vezes.

RIBEIRO & MORS (1950) relatam a presença de mucilagem em folhas e caule de *Cecropia adenopus* Mart. e a patente U.S. 2871235 (1959) indica como obter um polissacarídeo que contém ácidos urônicos e pentoses, a partir de *C. adenopus* e *C. peltata*. Mesmo sendo espécies diferentes, estes relatos são

concordantes com o resultado obtido para o índice de intumescimento de folhas de *C. glaziovii*.

TABELA 8 – ÍNDICES DE INTUMESCÊNCIA PARA O PÓ DO MATERIAL VEGETAL

AMOSTRA*	PARTE DA PLANTA	ÍNDICE DE INTUMESCÊNCIA (mL/g \pm IC _{95%})	ALTURA - 1 g PÓ SECO* mL
RD-C-M	Pecíolos	15,0 \pm 0,3	6,5
	Lâminas foliares	11,4 \pm 0,4	3

* Vide Tabela 1, pág. 54, para identificação das siglas das amostras analisadas. n=3

* Em proveta de 1,5 cm de diâmetro interno

5.2.5. ÍNDICE DE ESPUMA

Em nenhum tubo se observou uma altura de coluna de espuma de 1 cm. Aplicando as considerações descritas no item 4.3.1.5., tanto as lâminas foliares quanto os pecíolos apresentam índice de espuma menor que 100.

O índice de espuma obtido foi baixo o que sugere que o teor de saponinas, em *C. glaziovii* é pequeno ou que, pelas suas estruturas, apresentam reduzido poder tensoativo. A prospecção fitoquímica por CCD e os testes de espuma e hemólise evidenciaram a presença de saponinas. Em duas das três amostras avaliadas a hemólise foi parcial, o que indica baixo teor desta classe de compostos nas folhas de *C. glaziovii* (SANABRIA, 1983). Esta classe de metabólitos, além de responsável por algumas atividades farmacológicas, por suas propriedades tensoativas pode favorecer a absorção gastrointestinal dos princípios ativos, constituindo-se em coadjuvantes da atividade farmacológica (BUSSE, 2000.; SHARAPIN, 2000).

DE FONSECA (1935) relata a presença em *Cecropia peltata* de uma saponina similar a ambaina. FRANCK (1998) não detectou a presença de saponinas em *C. glaziovii*, *C. hololeuca* nem *C. pachystaya*, mas foram detectadas em *Musanga cecropioides*.

5.2.6. TEOR DE EXTRATIVOS EM DIFERENTES SOLVENTES

Foram escolhidos solventes que cobrem amplo intervalo de polaridade para, desta forma, ter-se uma informação preliminar sobre a polaridade dos compostos majoritários presentes. Além dos valores quantitativos referentes aos diferentes resíduos secos (TABELA 9), a cor da solução obtida depois de se filtrar o extrato (TABELA 10) permite avaliar a facilidade com que as clorofilas e carotenóides, presentes na planta, podem ser extraídos pelos solventes empregados. Quando não se sabe a natureza dos compostos responsáveis pela atividade farmacológica, este teste constitui um indicativo da quantidade de compostos presentes no material vegetal.

Os teores de extrativos obtidos (TABELA 9) indicam a presença majoritária de compostos polares, nos pecíolos, e medianamente polares a polares, nas lâminas foliares. Em todos os casos as médias dos resíduos secos obtidos para os pecíolos foram menores que aquelas para as lâminas foliares. Considerando que as lâminas foliares apresentaram maiores teores de polifenóis totais, taninos, flavonóides e proantocianidinas os pecíolos (item 5.3.), confirma-se, para *C. glaziovii*, que o teor de extrativos está relacionado com a quantidade de metabólitos secundários presentes.

Os filtrados das extrações aquosas foram concentrados até *secura* em banho-maria, em cápsulas de porcelana previamente secas e taradas, devido ao fato de que no rotavapor ocorria projeção do material para o condensador, o que representaria perdas consideráveis. Os extratos aquosos também foram difíceis de filtrar, possivelmente pela presença de mucilagem que ficava retida no papel de filtro. Esta dificuldade foi maior com os extratos das lâminas foliares do que com os pecíolos. A presença de mucilagem pode explicar, pelo menos parcialmente, por que tanto para as lâminas foliares quanto para os pecíolos, os maiores teores de extrativos foram alcançados com água. O aspecto turvo do extrato filtrado e a dificuldade para a filtração foram comuns às duas amostras, o que sugere a presença de mucilagem, em ambos os casos. Dificuldade um

pouco menor durante a filtração do extrato foi observada com o extrato aquoso, no teste de quantificação de taninos, por ser um extrato mais diluído e feito com aquecimento.

TABELA 9 – TEOR DE EXTRATIVOS DO PÓ DAS FOLHAS MADURAS DE *C. GLAZIOVII*, EM DIFERENTES SOLVENTES (MÉTODO DE MACERAÇÃO A FRIO)

AMOSTRA*	PARTE DA FOLHA	SOLVENTE	EXTRATIVOS (mg/g ± IC _{95%})
RD-C-M	Pecíolos	<i>n</i> -Hexano	4,4 ± 2,8
		Diclorometano	8,1 ± 0,7
		Etanol 95%	20,8 ± 2,3
		Água	75,0 ± 4,5
RD-C-M	Lâminas foliares	<i>n</i> -Hexano	26,2 ± 1,3
		Diclorometano	44,7 ± 2,0
		Etanol 95%	55,6 ± 2,7
		Água	82,9 ± 2,9

* Vide Tabela 1, pág. 54, para identificação das siglas das amostras analisadas.

HEBERLÉ et al. (1998) relataram dificuldades operacionais na produção de soluções extrativas aquosas a partir de pó de folhas de *Cecropia glaziovii* Snethl., dificuldades estas relacionadas com a metodologia de extração e com a proporção de droga vegetal.

O fato de o extrato hexânico ser amarelo e não esverdeado, indica que as clorofilas presentes não são tão apolares, uma vez que não são extraídas pelo hexano, e mesmo sendo extraídas pelo diclorometano, parecem ser mais afins pelo etanol 95%, como se pode deduzir pela coloração da solução, verde mais intensa, e pela maior massa de extrativos, no caso deste solvente. A cor amarela do extrato hexânico e a cor amarela-esverdeada do extrato diclorometânico sugerem a presença de carotenóides.

TABELA 10 – ASPECTO DAS SOLUÇÕES DO PÓ DAS FOLHAS MADURAS DE *C. GLAZIOVII*, EM DIFERENTES SOLVENTES (MÉTODO DE MACERAÇÃO A FRIO)

AMOSTRA*	PARTE DA FOLHA	SOLVENTE	ASPECTO DA SOLUÇÃO
RD-C-M	Pecíolos	<i>n</i> -Hexano	Amarela, límpida
		Diclorometano	Amarela-esverdeada, límpida
		Etanol 95%	Verde esmeralda, límpida
		Água	Marrom claro, ligeiramente turva
RD-C-M	Lâminas foliares	<i>n</i> -Hexano	Amarela, límpida
		Diclorometano	Amarela-esverdeada, límpida
		Etanol 95%	Verde esmeralda, límpida
		Água	Marrom, ligeiramente turva

* Vide Tabela 1, pág. 54, para identificação das siglas das amostras analisadas.

5.2.7. GRANULOMETRIA DO PÓ

Tal como pode apreciar-se nas TABELAS 11 e 12, o tamanho das partículas do pó obtido é uniforme, sendo a maioria da população de partículas inferior a 840 μm e superior a 150 μm , sendo que as folhas novas produzem um pó ligeiramente mais fino, em particular no caso de pecíolos.

Apesar de não se dispor de todos os tamises recomendados por WHO ... (1992) e FARMACOPÉIA ... (1977), números 2000, 710, 355, 250, 180, 125 e 90, pode-se concluir que o material trabalhado se aproxima das características de um pó moderadamente grosso, definido como aquele cujas partículas passam, em sua totalidade, através do tamis de abertura nominal de malha de 710 μm e, no máximo, 40% atravessa o tamis de abertura nominal de malha de 250 μm .

É importante ressaltar que as amostras de pecíolos apresentaram fluxo livre, enquanto as amostras de lâminas foliares, em particular aquelas de folhas novas, apresentaram alta coesão e, por isso, fluxo difícil e irregular quando do peneiramento. O material correspondente aos pecíolos apresentou alguns aglomerados de fibras, mas a maioria tinha aspecto de serragem fina.

TABELA 11 – GRANULOMETRIA DO PÓ DAS FOLHAS MADURAS DE *C. GLAZIOVII* PARA A AMOSTRA COLETADA NO PARQUE ESTADUAL DO RIO DOCE (RD-C-M)

TAMANHO DAS PARTÍCULAS (µm)	PORCENTAGEM	
	Pecíolos	Lâminas foliares
> 2000	0,1	0,0
1700 – 2000	0,1	0,0
1400 – 1700	0,3	0,0
1180 – 1400	0,5	0,0
1000 – 1180	1,2	1,7
840 – 1000	3,7	2,9
500 – 840	43,0	40,3
150 – 500	40,4	44,7
100 – 150	2,9	2,9
< 100	7,8	7,1
TIPO DE FLUXO	Fácil, uniforme	Difícil, pouco uniforme

TABELA 12 – GRANULOMETRIA DO PÓ DAS FOLHAS NOVAS DE *C. GLAZIOVII* PARA A AMOSTRA COLETADA NO PARQUE ESTADUAL DO RIO DOCE (RD-C-N)

TAMANHO DAS PARTÍCULAS (µm)	PORCENTAGEM	
	Pecíolos	Lâminas foliares
> 2000	0,3	0,2
1700 – 2000	0,1	0,2
1400 – 1700	0,2	0,5
1180 – 1400	0,8	0,4
1000 – 1180	3,0	1,5
840 – 1000	4,7	3,7
500 – 840	22,5	31,9
150 – 500	40,9	50,0
100 – 150	6,0	5,4
< 100	21,5	6,2
TIPO DE FLUXO	Fácil, uniforme	Difícil, pouco uniforme

5.2.8. RESUMO DOS RESULTADOS PARA OS ENSAIOS GERAIS

Na TABELA 13 resumem-se os resultados obtidos para os diferentes ensaios realizados com pó de lâminas foliares e pecíolos de *C. glaziovii*. Os pecíolos apresentaram médias menores nos ensaios de cinzas insolúveis em ácido, índice de intumescimento e teor de extrativos e valores da mesma ordem de magnitude para os resultados de perda por dessecação, cinzas totais e granulometria. O pó dos pecíolos era mais volumoso que o de lâminas foliares.

TABELA 13. CARACTERIZAÇÃO DO PÓ DE FOLHAS MADURAS DE *CECROPIA GLAZIOVII* SNETHL. - ENSAIOS GERAIS -TABELA RESUMO

ENSAIO	PECÍOLOS*	LÂMINAS FOLIARES*
Perda por dessecação	7,75 ± 1,45%	7,73 ± 0,29%
Cinzas totais	9,24 ± 0,24%	9,53 ± 0,25%
Cinzas insolúveis em ácido	0,22 ± 0,11%	2,44 ± 0,20%
Índice de intumescimento	15,0 ± 0,3 mL/g	11,4 ± 0,4 mL/g
Índice de espuma	< 100	< 100
Volume ocupado pelo material seco em proveta de 1,5 cm de diâmetro interno	aprox. 6,5 cm/g	aprox. 3 cm/g
Teor de extrativos em:		
<i>n</i> -Hexano	4,4 ± 2,8 mg/g	26,2 ± 1,3 mg/g
Diclorometano	8,1 ± 0,7 mg/g	44,7 ± 2,0 mg/g
Etanol 95%	20,8 ± 2,3 mg/g	55,6 ± 2,7 mg/g
Água	75,0 ± 4,5 mg/g	82,9 ± 2,9 mg/g
Granulometria	Aprox. pó moderadamente grosso	
Passa por tamis 840 µm	94%	95%
Passa por tamis 150 µm	11%	10%

* Amostra coletada no Parque Estadual do Rio Doce (RD-C-M)

5.3. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO MATERIAL VEGETAL

Tanto nos pecíolos, como nas lâminas foliares, detectou-se a presença e ausência das mesmas classes de substâncias (TABELA 14), em concordância com os relatos bibliográficos. Os resultados obtidos para *C. glaziovii* coincidem com aqueles descritos por FRANCK (1998), na prospecção fitoquímica de *C. hololeuca*, *C. pachystachya* e *C. glaziovii*, quanto à presença de flavonóides e proantocianidinas, e ausência de glicosídeos antracênicos, heterosídeos cardiotônicos e cumarinas.

O trabalho de FRANCK (1998) mostra ausência de saponinas, enquanto que esta classe foi observada na prospecção realizada neste trabalho. A presença de saponinas foi relatada para outras espécies do gênero *Cecropia* (DE FONSECA, 1935; PLANTAS ..., 1999; LORENZI & MATOS, 2002). Somente uma das três amostras de lâminas foliares apresentou hemólise total, mas não imediata, antes de 10 minutos; as outras amostras apresentaram hemólise parcial, indicando a presença de saponinas em quantidades pequenas (SANABRIA, 1983).

TABELA 14 - RESULTADOS DA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE PECÍOLOS E LÂMINAS FOLIARES DE *CECROPIA GLAZIOVII* SNETHL.

CLASSES DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES*	CLASSES DE SUBSTÂNCIAS AUSENTES*
Polifenóis	Antraquinônas livres
Esteróides e triterpenos	Cumarinas
Flavonóides livres ⁴	Heterosídeos antracênicos
Heterosídeos de flavonóides	Heterosídeos cardiotônicos
Saponinas	Alcalóides terciários
Taninos	Alcalóides quaternários
Proantocianidinas	

* Amostras: Parque Estadual do Rio Doce - março 2000 (RD-C-M)
 Campus da UFMG - setembro 2000 (UFMG-S-M)
 Serra Piedade - outubro de 2000 - indivíduo 8 (SP-S-M-8)

Não se detectou a presença de alcalóides, o qual está de acordo com vários relatos de ausência desta classe de metabólitos no gênero *Cecropia* (DE FONSECA, 1935; VALERI & NARVÁEZ, 1952; KING & HADDOCK, 1959) embora sua presença seja relatada por outros autores (PANIZZA, 1997; PLANTAS ..., 1999).

Observou-se, nas placas de CCD, manchas em maior número e maior intensidade, no caso das lâminas foliares. As placas em que se observou maior número de manchas foram aquelas onde se avaliava a presença de polifenóis, taninos e heterosídeos de flavonóides.

5.4. DETERMINAÇÕES QUANTITATIVAS POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

Na espectrofotometria mede-se a energia radiante absorvida por um sistema químico em função do comprimento de onda e as medidas são realizadas em um determinado comprimento de onda. Como consequência das interações entre os fótons e as moléculas do soluto, a intensidade da luz incidente é atenuada devido à absorção pela solução. A análise espectrofotométrica quantitativa tem, como princípio, a relação proporcional existente entre a intensidade de luz absorvida e a concentração da substância na solução (HESSE, MEIER & ZEEH, 1999; SKOOG, HOLLER & NIEMAN, 2000). A transmitância T da solução é, então, a fração da radiação incidente transmitida pela solução e se expressa usualmente como porcentagem:

$$T = I / I_0$$
$$\%T = I / I_0 * 100$$

Quantificações espectrofotométricas requerem que se cumpra a lei combinada de Lambert – Beer, geralmente conhecida como lei de Beer, que relaciona a transmitância, isto é, a intensidade da luz à saída da amostra (I) com a

intensidade inicial I_0 , a concentração da espécie absorvente (c) e o trajeto de absorção da radiação (b) mediante a equação:

$$\log (I_0 / I) = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Onde ε é uma constante de proporcionalidade, característica da substância absorvente de radiação e conhecida como coeficiente molar de absorção quando c se expressa em termos de concentrações molares e b em centímetros. Como a absorvância A de uma solução se define como:

$$A = -\log T = -\log I/I_0$$

a lei de Beer pode ser expressa como

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Onde A , é adimensional, d se expressa em centímetros, c em mol L^{-1} e ε em $1000 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol} \cdot \text{mmol}^{-1}$ (HESSE, MEIER & ZEEH, 1999; SKOOG, HOLLER & NIEMAN, 2000).

Para verificar o cumprimento da lei de Beer, realiza-se uma curva de calibração, considerando-se a absorvância em função da concentração, para o que se preparam soluções de concentrações conhecidas e se mede a absorvância em comprimento de onda definido. Se a lei de Beer é válida, para essa substância, nessas concentrações, a relação deve ser uma reta, que passa pela origem dos eixos cartesianos. A lei de Beer somente é aplicável com precisão a baixas concentrações (SKOOG, HOLLER & NIEMAN, 2000).

Para fazer as determinações quantitativas elege-se, geralmente, o comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}), uma vez que o erro da medida é o mínimo e a sensibilidade é a máxima. A concentração da amostra se obtém por interpolação na curva de calibração ou pela comparação com a absorvância de uma solução padrão, de concentração conhecida, próxima à da amostra, para a qual se observa a lei de Beer (FARMACOPÉIA ..., 1988).

No caso de amostras complexas, como extratos vegetais, não é possível dispor de amostras de referência para todos os metabólitos secundários presentes. Como alternativa, se expressam os resultados em função de uma substância do grupo de metabólitos secundários avaliado, tendo-se como exemplo a quantificação de flavonóides expressos, por exemplo como rutina (RUSAK, et al., 1993) e hiperósido (VIERLING et al., 2003). Pode-se, também, empregar uma substância estruturalmente semelhante, como o pirogalol, na quantificação de polifenóis e taninos (PHARMACOPÉE ..., 1986; BRITISH ..., 1988: FARMACOPÉIA ..., 1996), fazendo-se as relações matemáticas necessárias.

5.4.1. QUANTIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE POLIFENÓIS TOTAIS E TANINOS

Na FIGURA 4 estão resumidos os teores de polifenóis totais e taninos em folhas novas e maduras de *C. glaziovii*, determinados de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.3.2. As barras correspondem às médias para cada espécimen analisado. Nas lâminas foliares os teores de polifenóis totais variaram entre 1,9% e 4,8%, os de taninos entre 1,6% e 3,3% nos indivíduos analisados. Destaca-se que os pecíolos apresentaram médias menores que as lâminas foliares, e que entre as lâminas foliares, os menores teores foram para a amostra coletada no Parque Estadual do Rio Doce, na época chuvosa (RD-C). As folhas maduras, com $3,42 \pm 1,00\%$ de polifenóis totais e $2,10 \pm 0,47\%$ de taninos não apresentaram teores estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) com relação as folhas novas, com $3,80 \pm 0,53\%$ de polifenóis totais e $2,53 \pm 0,30\%$ de taninos.

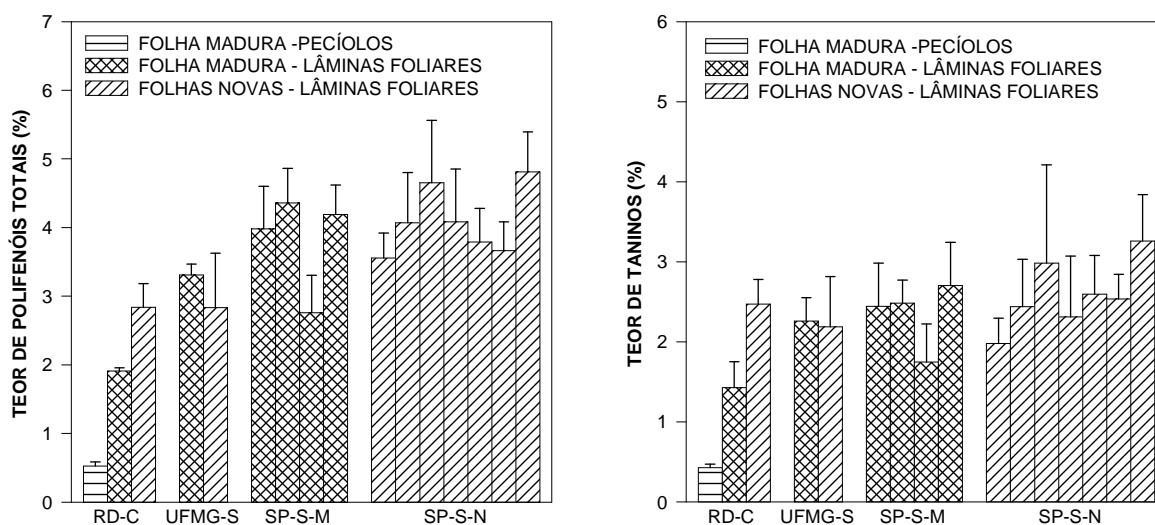


FIGURA 4. Teor de polifenóis totais e taninos em folhas de *C. glaziovii*.

Médias \pm intervalo de confiança 95%. RD: Parque Estadual do Rio Doce, UFMG: Campus da UFMG, SP: Serra da Piedade. C: Época chuvosa, S: Época seca. M: Folhas maduras, N: Folhas novas.

Os taninos representaram dois terços dos polifenóis totais presentes em *C. glaziovii*. Não é possível fazer comparações entre épocas, uma vez que para na época chuvosa, somente se analisaram folhas de um indivíduo. Analisando os resultados obtidos para os indivíduos coletados na Serra da Piedade, constata-se pouca variação intraespecífica, sendo que a relação entre maior e menor teor foi somente de 1,6.

Estes são os primeiros dados obtidos para a quantificação de polifenóis em *C. glaziovii*, não tendo sido encontrados relatos na literatura. Para definir limites farmacopéicos para este ensaio é preciso analisar um maior número de amostras de vários indivíduos em épocas e locais diferentes.

5.4.2. QUANTIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FLAVONÓIDES

5.4.2.1. PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA REMOÇÃO DE CLOROFILAS E OUTROS COMPOSTOS DE BAIXA POLARIDADE

Uma vez que está restringida a venda de tetracloreto de carbono, como parte da padronização da técnica de quantificação, avaliaram-se diferentes solventes e misturas de solventes, incluindo tetracloreto de carbono, clorofórmio e diclorometano, e misturas clorofórmio-diclorometano 1:1, 1:2 e 2:1, para eliminar clorofilas das amostras, visando encontrar o melhor substituto para o tetracloreto de carbono. Avaliaram-se os valores de absorvância após seguir, por triplicata e para uma única amostra de material vegetal, o procedimento completo (item 4.3.3.3), mudando-se somente o solvente empregado para a remoção das clorofilas. Fez-se, também, o monitoramento da presença de flavonóides na solução a ser quantificada e na fração que continha clorofilas, por CCD, empregando-se solução etanólica de $AlCl_3$ a 5%, como revelador.

Encontrou-se que o diclorometano, mesmo em mistura com clorofórmio, extraía pequenas quantidades de flavonóides, juntamente com clorofilas e carotenóides e que, nem o clorofórmio, nem o tetracloreto de carbono extraíam flavonóides. Os valores mais próximos aos obtidos quando se empregou tetracloreto de carbono foram encontrados quando este solvente foi substituído por clorofórmio. Decidiu-se, assim, empregar clorofórmio para remoção de clorofilas da solução hidrometanólica, considerando sua menor toxicidade e maior disponibilidade comercial que o tetracloreto de carbono e, também, porque dos solventes e misturas avaliados foi o que melhor substituiu o tetracloreto de carbono.

Fizeram-se, adicionalmente, alguns ensaios com *n*-hexano, mas sua baixa densidade, alta volatilidade e formação de emulsões estáveis, diminuíram a eficiência da operação, motivos pelos quais foi descartado como solvente para a etapa de remoção de clorofilas.

É importante ressaltar que foram obtidos menores valores de absorvância nas soluções correspondentes aos brancos, quando se misturaram os solventes na ordem: extrato metanólico, CCl₄, água, do que quando se adicionou, por último, o CCl₄ o que pode ser devido à formação de uma emulsão contínua, que se rompe facilmente durante a centrifugação e que só foi observada quando a água foi adicionada por último. Ao substituir o tetracloreto de carbono pelo clorofórmio, manteve-se essa ordem de adição, mesmo assim, a emulsão obtida era relativamente estável e foi necessário centrifugá-la por um período de tempo prolongado, 20 minutos, para se ter a adequada separação das fases.

De acordo com os testes realizados, não se justifica, para nenhum dos solventes avaliados, fazer mais de uma extração para remover clorofilas, uma vez que os valores de absorvância dos brancos foram muito próximos aos obtidos quando se realizaram várias extrações consecutivas.

5.4.2.2. TEOR DE FLAVONÓIDES

Os teores de flavonóides determinados de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.3.3. e calculados como rotina, em pó de lâminas foliares de folhas novas e maduras de *C. glaziovii*, provenientes de árvores nativas e cultivadas, estão representados nos gráficos das FIGURAS 5 a 7 e os de pecíolos no gráfico da FIGURA 8. Nas figuras as barras representam a média e o limite de confiança ($\alpha=0,05$), para cada amostra ou grupo de amostras. O teor de flavonóides nas lâminas foliares de *C. glaziovii* variou de 0,3% a 3,8% e os de pecíolos entre 0,01% e 0,33%, no conjunto das plantas avaliadas. Os teores de flavonóides para cada grupo de amostras trabalhadas estão resumidos na TABELA 15.

Para a análise dos resultados, consideraram-se, para plantas coletadas na mesma época do ano, as variações entre o teor de flavonóides em folhas novas e maduras e entre espécimens nativos, cultivados e clones. Posteriormente, analisou-se a influência da época da coleta e a variação intraespecífica..

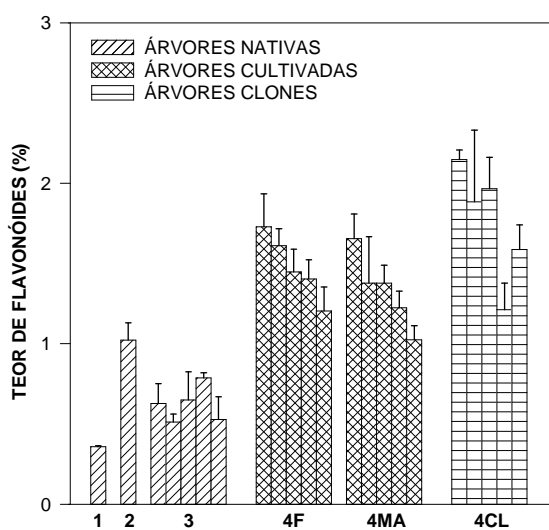
Finalmente, compararam-se os resultados obtidos para pecíolos e lâminas foliares.

ÉPOCA SECA

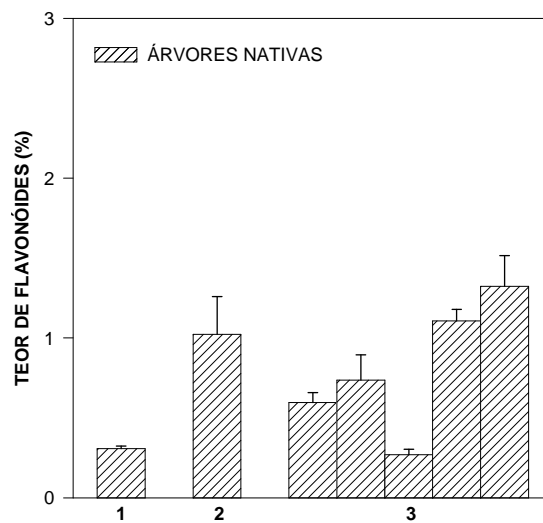
Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre o teor de flavonóides em folhas novas ($1,50 \pm 0,37\%$) e folhas maduras ($1,92 \pm 1,19\%$) de espécimens nativos. No entanto, as árvores cultivadas e clones apresentaram maiores teores de flavonóides nas folhas novas, com $2,48 \pm 0,34\%$ e $3,44 \pm 0,56\%$, respectivamente, frente a $1,80 \pm 0,24\%$ e $2,07 \pm 0,40\%$ para folhas maduras (FIGURA 6, TABELA 15).

Os teores de flavonóides em folhas novas de árvores nativas, cultivadas e clones foram, na época seca, significativamente diferentes, sendo maiores para os espécimens do último grupo ($3,44 \pm 0,56\%$). Nas folhas maduras, o valor médio do teor de flavonóides não foi diferente aos de clones ($2,07 \pm 0,40\%$), árvores cultivadas ($1,80 \pm 0,24\%$), nem plantas nativas ($1,92 \pm 1,19\%$). É importante mencionar que o teor de flavonóides foi duas vezes maior nas folhas novas dos clones que daquelas de árvores nativas (FIGURA 7, TABELA 15).

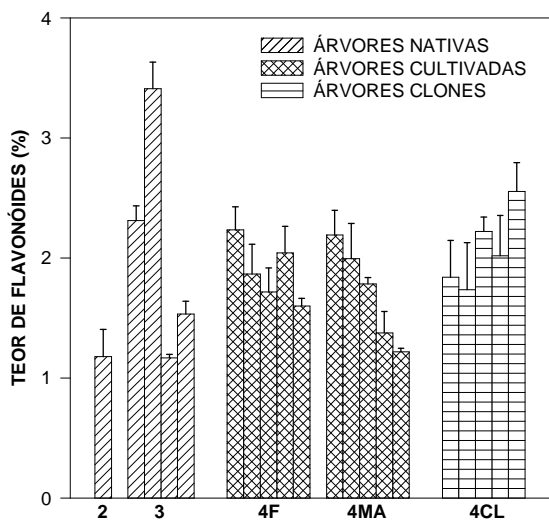
Das árvores cultivadas foram analisadas, por separado, folhas provenientes de 5 árvores femininas e 5 masculinas. Não se observaram diferenças no teor de flavonóides de árvores femininas e masculinas, nem para folhas maduras, nem para folhas novas. As folhas novas de árvores clone ($3,44 \pm 0,56\%$) tiveram 1,4 vezes maior teor de flavonóides que as folhas novas de árvores femininas ($2,53 \pm 0,67\%$) e masculinas ($2,43 \pm 0,58\%$). No entanto, para as folhas maduras não houve diferenças entre estes grupos de amostras (FIGURA 6, TABELA 15).



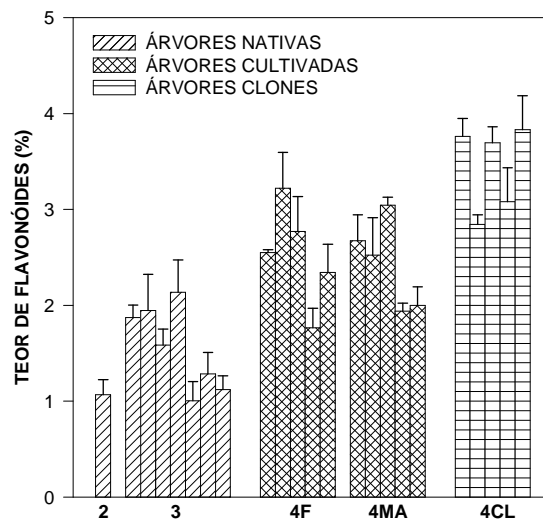
A. Folhas maduras – Época chuvosa



B. Folhas novas – Época chuvosa



C. Folhas maduras – Época seca



D. Folhas novas – Época seca

FIGURA 5. Teor de flavonóides em folhas novas e maduras de *Cecropia glaziovii* coletadas nas épocas chuvosa e seca.

1-3: Árvores nativas - 1. Parque Estadual de Rio Doce, 2. Campus da UFMG, 3. Serra da Piedade. 4: Árvores cultivadas e clones - 4F. Femininas, 4MA. Masculinas. 4CL. Clones

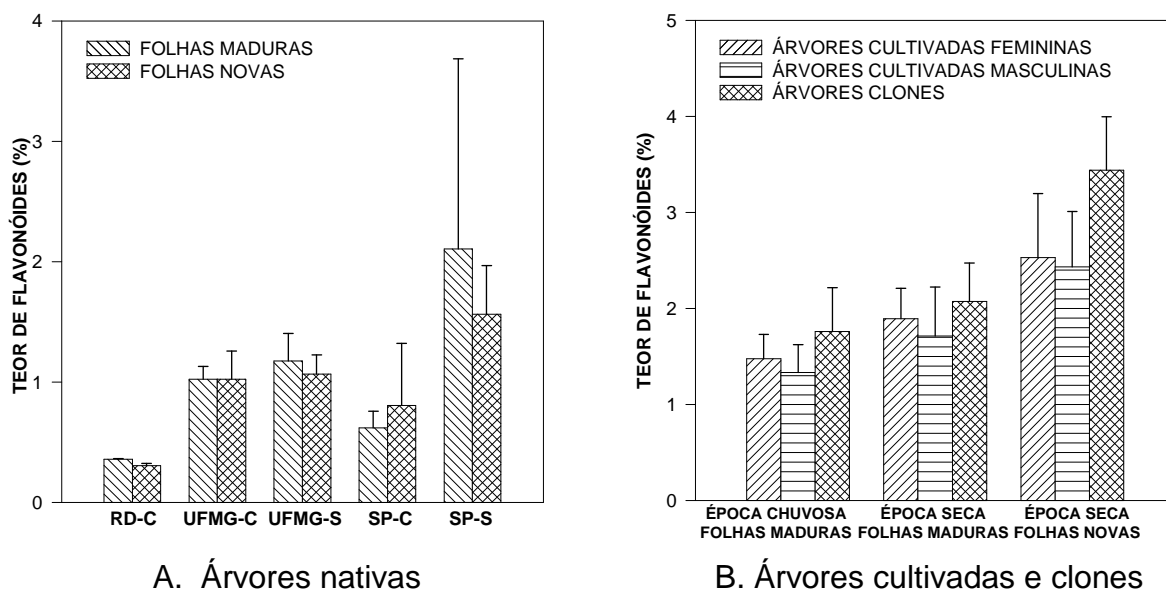


FIGURA 6. Teor de flavonóides em folhas *Cecropia glaziovii* provenientes de árvores nativas, cultivadas e clones

RD: Parque Estadual de Rio Doce, UFMG: Campus da UFMG, SP: Serra da Piedade.

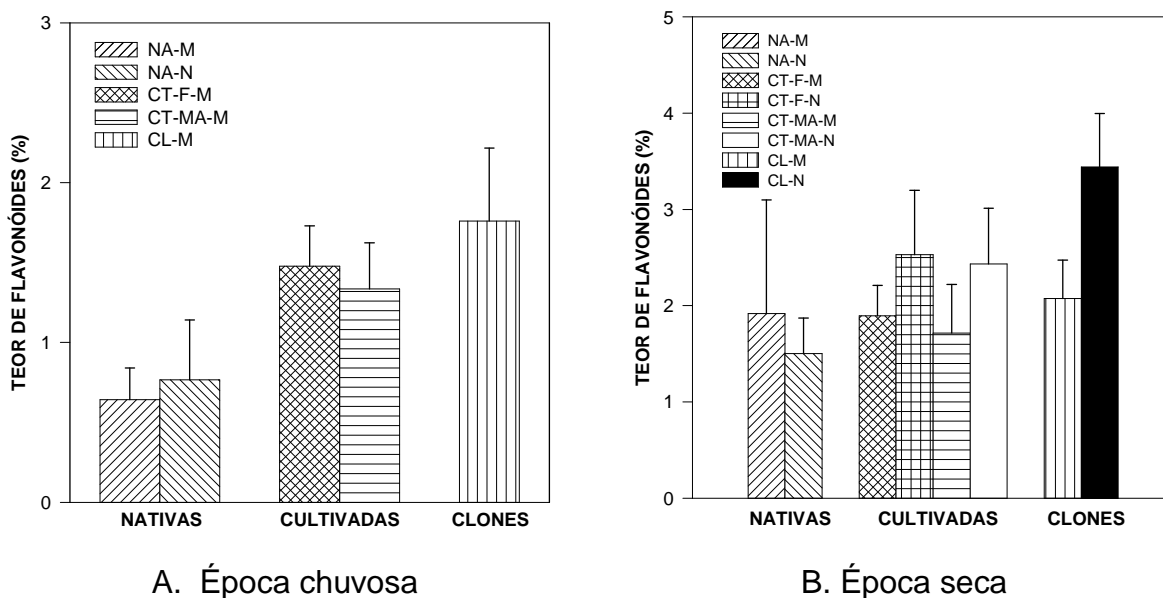


FIGURA 7. Teor de flavonóides em folhas de *Cecropia glaziovii* coletadas nas épocas chuvosa e seca.

NA: Árvores nativas, CT-F: Árvores cultivadas femininas, CT-MA: Árvores cultivadas masculinas, CL: Árvores clones, M: Folhas maduras, N: Folhas novas

ÉPOCA CHUVOSA

Para árvores nativas coletadas durante a época chuvosa, os teores de flavonóides, para folhas novas ($0,77 \pm 0,37\%$) e maduras ($0,64 \pm 0,20\%$) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (FIGURA 6, TABELA 15). Amostras de folhas novas de árvores cultivadas e clones não estavam disponíveis, não sendo por isso possível fazer a comparação com folhas maduras.

O teor de flavonóides em folhas maduras de árvores nativas ($0,64 \pm 0,20\%$) foi significativamente menor que o obtido para árvores clones ($1,76 \pm 0,45\%$) e cultivadas ($1,41 \pm 0,16\%$), coletados na época chuvosa. Da mesma forma que na época seca, no período chuvoso não se observaram diferenças nos teores de flavonóides em folhas maduras de árvores femininas ($1,48 \pm 0,25\%$) e masculinas ($1,33 \pm 0,29\%$), nem entre estes e os dos clones ($1,76 \pm 0,45\%$) (FIGURAS 6 e 7, TABELA 15).

COMPARAÇÃO ENTRE ÉPOCAS SECA E CHUVOSA

A análise da variação no teor de flavonóides entre as épocas do ano avaliadas, para espécimens nativos, indicou maiores teores no período seco para folhas novas ($1,50 \pm 0,37\%$) e maduras ($1,92 \pm 1,19\%$), em comparação com a época chuvosa ($0,77 \pm 0,39\%$ e $0,64 \pm 0,21\%$, respectivamente), ($p < 0,05$)

Para árvores cultivadas, como grupo, também se obtiveram maiores teores de flavonóides durante a época seca ($1,80 \pm 0,24\%$) que durante a chuvosa ($1,41 \pm 0,22\%$) ($p < 0,05$). Por outro lado, as folhas maduras de árvores clones não apresentaram diferenças estatisticamente significativas no teor de flavonóides durante as épocas seca ($2,07 \pm 0,40\%$) e chuvosa ($1,76 \pm 0,45\%$), ($p > 0,05$) (TABELA 15).

No caso das amostras coletadas de árvores nativas foi observada maior variabilidade do teor de flavonóides entre os períodos seco e chuvoso do ano. O teor de flavonóides na época seca foi 1,9 e 3,0 vezes maior para folhas novas e maduras de árvores nativas, respectivamente, e somente 1,3 e 1,2 vezes, para folhas maduras provenientes de árvores cultivadas e clones, respectivamente, com relação às amostras coletadas na época chuvosa (TABELA 15).

COMPARAÇÃO ENTRE ÁRVORES NATIVAS, CULTIVADAS E CLONES

As folhas maduras de árvores cultivadas, coletadas na época chuvosa, apresentaram teor médio duas vezes maior que as nativas coletadas neste período. Na época seca, as folhas novas de árvores cultivadas apresentaram 1,6 vezes maior teor de flavonóides que as plantas nativas e não foram detectadas diferenças estatisticamente significativa para os teores em folhas maduras (TABELA 15).

As folhas de árvores clones apresentaram maiores teores de flavonóides que as folhas de amostras nativas, duas vezes na época seca e 3 vezes na época chuvosa. No entanto, as amostras de clones apresentaram, no máximo, teores 1,4 vezes maiores que as amostras de cultivo (TABELA 15).

Como esperado, as amostras cultivadas e os clones mostraram menor variação intraespecífica que as populações nativas, de acordo com os valores de desvio padrão relativo (DPR), como se pode observar na TABELA 15, onde se apresentam, para cada grupo de amostras, o menor e o maior teor de flavonóides, o teor médio e o DPR. Para as árvores cultivadas, se incluem os dados para árvores femininas e masculinas, em separado, e como uma única amostra (10 árvores). Para todos os casos, árvores nativas, cultivadas e clones, são mostrados, em separado, os teores de flavonóides nas épocas seca e chuvosa, para folhas novas e maduras. Para as amostras nativas, os DPR alcançaram 53%. No entanto, para as amostras cultivadas femininas e masculinas e clones, os máximos DPR calculados, foram 14, 24 e 21% respectivamente.

TABELA 15. VARIÇÃO INTRAESPECÍFICA DO TEOR DE FLAVONÓIDES EM FOLHAS DE *CECROPIA GLAZIOVII* SNETHL. PROVENIENTES DE ÁRVORES NATIVAS, CULTIVADAS E CLONES

ORIGEM	ÉPOCA	AMOSTRA	n	TEOR DE FLAVONÓIDES			
				MENOR TEOR (%)	MAIOR TEOR (%)	TEOR MÉDIO (% \pm IC _{95%})	DPR (%)
ÁRVORES NATIVAS	CHUVOSA	C-M	7	0,4	1,0	0,64 \pm 0,20	33,5
		C-N	7	0,3	1,3	0,77 \pm 0,37	52,7
	SECA	S-M	5	1,2	3,4	1,92 \pm 1,19	49,7
		S-N	8	1,0	2,1	1,50 \pm 0,37	29,4
ÁRVORES CULTIVADAS	CHUVOSA	CT-F-C-M	5	1,2	1,7	1,48 \pm 0,25	13,6
		CT-MA-C-M	5	1,0	1,7	1,33 \pm 0,29	17,4
		CT-C-M	10	1,0	1,7	1,41 \pm 0,16	15,6
	SECA	CT-F-S-M	5	1,6	2,2	1,89 \pm 0,31	13,4
		CT-MA-S-M	5	1,2	2,2	1,71 \pm 0,51	24,0
		CT-S-M	10	1,2	2,2	1,80 \pm 0,24	18,6
		CT-F-S-N	5	1,8	3,2	2,53 \pm 0,67	21,3
		CT-MA-S-N	5	1,9	3,0	2,43 \pm 0,58	19,2
		CT-S-N	10	1,8	3,2	2,48 \pm 0,34	19,2
ÁRVORES CLONES	CHUVOSA	CL-C-M	5	1,2	2,2	1,76 \pm 0,45	20,8
	SECA	CL-S-M	5	1,8	2,6	2,07 \pm 0,40	15,7
		CL-S-N	5	2,8	3,8	3,44 \pm 0,56	13,1

CT: Cultivo, F: Femininas, MA: Masculinas, CL: Clone, C: Época chuvosa, S: Época seca, M: Folhas maduras, N: Folhas novas. n: número de espécimens coletados.

A relação entre o maior e o menor valor de teor de flavonóides foi maior para as amostras de árvores nativas que para as cultivadas e os clones. Para as amostras nativas, o teor máximo foi duas a quatro vezes o menor teor, enquanto não chegou a ser o dobro deste, no caso de amostras provenientes de cultivo e de clones.

Após analisar a variação intraespecífica para as árvores clone observa-se que, para a maioria das amostras, obtiveram-se DPR similares ou maiores que as de

árvores cultivadas, que apresentam maior diversidade genética, dentro da sua população. Lembrando que, além da variação genética, a composição qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários numa planta depende de fatores ambientais, período de colheita e processos pós-colheita, principalmente, e sabendo que estes últimos foram semelhantes para as árvores clone e as de cultivo, pode-se considerar que o teor de flavonóides em folhas de *C. glaziovii*, depende de forma importante, das variações ambientais e em menor proporção das variações genéticas, intra-específicas.

COMPARAÇÃO ENTRE PECÍOLOS E LÂMINAS FOLIARES

Adicionalmente, avaliaram-se algumas amostras de pecíolo e compararam-se os resultados com os obtidos para as respectivas lâminas foliares. Como pode constatar-se na FIGURA 6, o teor de flavonóides nos pecíolos, com valores entre 0,01% e 0,33%, foi muito menor que nas lâminas foliares, sendo de quatro a trinta vezes menor que nas respectivas lâminas foliares.

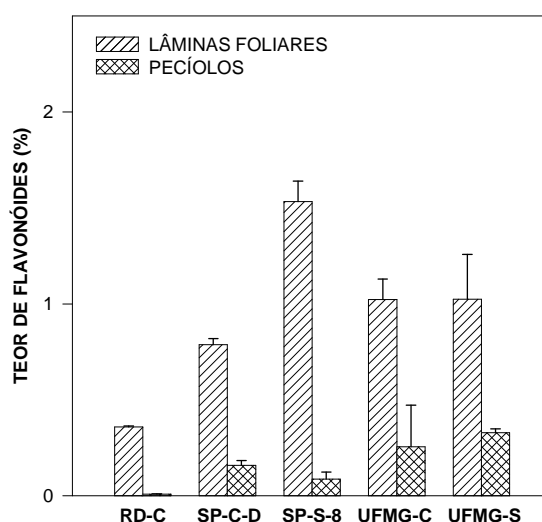


FIGURA 8. Teor de flavonóides em pecíolos e lâminas foliares de folhas maduras de *Cecropia glaziovii* coletadas nas épocas seca e chuvosa.

RD: Parque Estadual de Rio Doce, UFMG: Campus da UFMG, SP: Serra da Piedade, D: espécimen D, 8: espécimen 8. C: Época chuvosa, S: Época seca.

Em resumo, de acordo com os resultados obtidos, se recomenda a coleta de folhas de *C. glaziovii* na época seca, uma vez que neste período do ano, tanto folhas novas como maduras, apresentam maiores teores de flavonóides, que na época chuvosa. As amostras de cultivo e de clones, apresentaram teores de flavonóides similares ou maiores que as amostras de plantas nativas, mas menor variação intraespecífica. Podem coletar-se indistintamente folhas novas e maduras, provenientes de árvores femininas, masculinas ou clones. Finalmente, como os pecíolos continham teores bastante inferiores que as lâminas foliares, de acordo com este ensaio, recomendaria-se a coleta das folhas com a menor porção de pecíolos possível.

5.4.3 QUANTIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PROANTOCIANIDINAS

Os teores de proantocianidinas foram determinados de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.3.4. e calculados como cloreto de cianidina. Avaliou-se o pó de lâminas foliares de folhas novas e maduras de *C. glaziovii*, provenientes de árvores nativas e cultivadas, e o pó de pecíolos de algumas amostras de árvores nativas. Os resultados obtidos, resumidos nos gráficos das FIGURAS 9 a 12, indicam teores de proantocianidinas entre 1,2 e 7,5 % para lâminas foliares e entre 0,4 e 5,4% para pecíolos. Nas figuras, as barras representam a média e o limite de confiança ($\alpha=0,05$), para cada amostra ou grupo de amostras analisado.

5.4.3.1. TEOR DE PROANTOCIANIDINAS

Da mesma forma, que para os teores de flavonóides, na análise dos resultados, consideraram-se, os resultados obtidos para plantas coletadas na mesma época do ano, as variações entre o teor de proantocianidinas em folhas

novas e maduras e entre espécimens nativos, cultivados e clones. Posteriormente, analisaram-se a influência da época da coleta e a variação intraespecífica. Finalmente, compararam-se os resultados obtidos para pecíolos e lâminas foliares.

ÉPOCA SECA

Considerando os teores médios de cada grupo de amostras, na época seca, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre folhas novas e folhas maduras de plantas nativas, assim como de árvores cultivadas e clones ($p > 0,05$). A comparação dos teores médios de proantocianidinas determinados para folhas novas das três populações, $4,43 \pm 1,08\%$, $5,36 \pm 0,68\%$ e $4,93 \pm 0,73\%$ para árvores nativas, cultivadas e clones, respectivamente, não revela diferenças estatísticas significativas, entre elas. De forma similar, os teores médios de proantocianidinas em folhas maduras não apresentaram diferenças significativas entre espécimens cultivados ($3,96 \pm 0,46\%$) e clones ($4,07 \pm 0,48\%$) ($p > 0,05$). No entanto, para plantas nativas, o teor médio ($4,92 \pm 1,80\%$) foi maior que nas amostras de cultivo e clones ($p < 0,05$) (FIGURA 10, TABELA 16).

ÉPOCA CHUVOSA

Os teores médios de proantocianidinas em folhas novas ($2,23 \pm 0,89\%$) e maduras ($2,54 \pm 0,64\%$) de plantas nativas não apresentaram, na época chuvosa, diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (FIGURA 10, TABELA 16). Como já foi discutido, a comparação entre folhas novas e maduras não foi possível para árvores cultivadas e clones, uma vez que na época chuvosa não se dispunha de folhas novas.

Na época chuvosa, o teor médio de proantocianidinas em folhas maduras de clones ($3,59 \pm 0,53\%$) não diferia do determinado para folhas maduras de árvores cultivadas ($3,28 \pm 0,44\%$), mas estes dois teores foram consideravelmente maiores que o teor médio em plantas nativas ($2,54 \pm 0,64\%$) ($p < 0,05$) (FIGURA 11, TABELA 16).

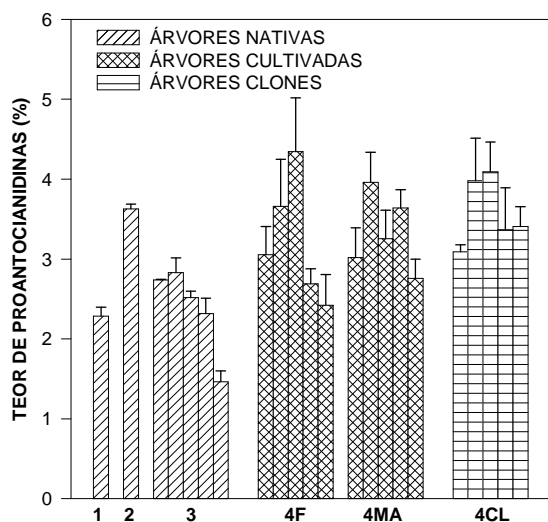
COMPARAÇÃO ENTRE ÉPOCAS SECA E CHUVOSA

Dentro das populações avaliadas, maiores teores médios de proantocianidinas foram encontrados na época seca ($p > 0,05$), excetuando os clones, para os quais não houve diferenças estatisticamente significativas entre a época seca ($4,07 \pm 0,48\%$) e a chuvosa ($3,58 \pm 0,53\%$) ($p > 0,05$). A variação dos teores médios de proantocianidinas entre o período seco e chuvoso foi maior para as amostras nativas ($4,92 \pm 1,80\%$ e $2,54 \pm 0,64\%$) que para as cultivadas ($3,96 \pm 0,46\%$ e $3,28 \pm 0,44\%$) (FIGURAS 10 e 11, TABELA 16).

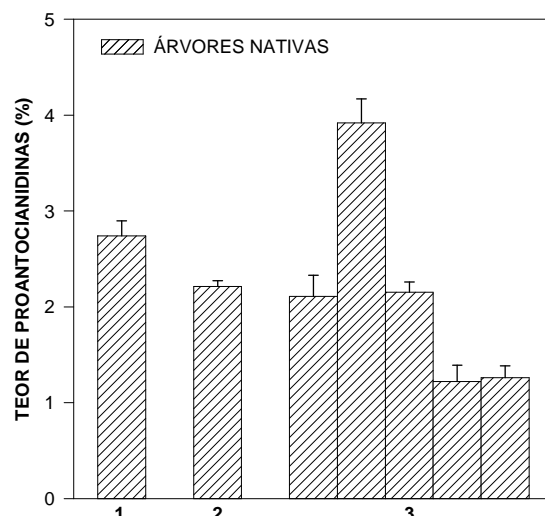
COMPARAÇÃO ENTRE ÁRVORES NATIVAS, CULTIVADAS E CLONES

Como já foi explicado, das árvores cultivadas foram analisadas, em separado, folhas provenientes de árvores femininas e masculinas, não sendo detectadas diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos de amostras, tanto na época seca como na chuvosa (FIGURA 10, TABELA 16).

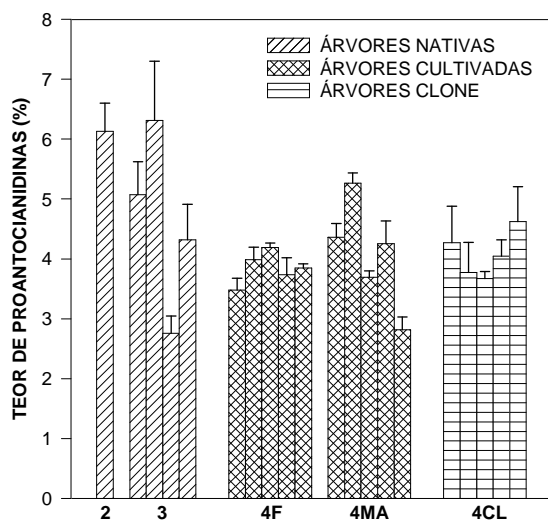
As amostras de árvores nativas apresentaram maior variabilidade entre os períodos seco e chuvoso que as cultivadas e clones. Na época seca as folhas maduras de árvores nativas apresentaram o dobro do teor de proantocianidinas que as amostras coletadas na época chuvosa. No entanto, as amostras cultivadas e clones continham, no máximo teores 1,2 vezes maiores.



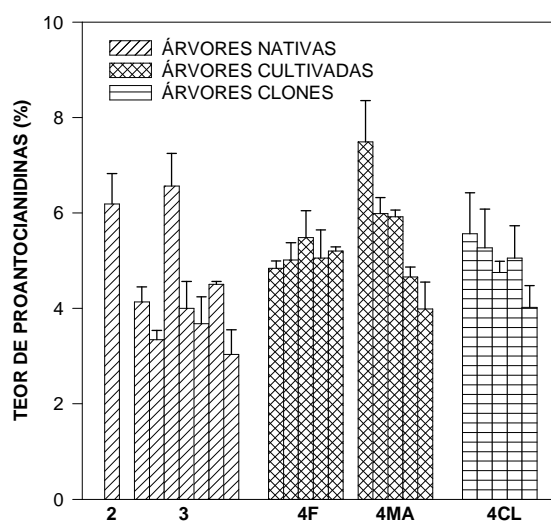
A. Folhas maduras – Época chuvosa



B. Folhas novas – Época chuvosa



C. Folhas maduras – Época seca



D. Folhas novas – Época seca

FIGURA 9. Teor de proantocianidinas em folhas novas e maduras de *Cecropia glaziovii* coletadas nas épocas chuvosa e seca.

1-3: Árvores nativas - 1. Parque Estadual de Rio Doce, 2. Campus da UFMG, 3. Serra da Piedade. 4: Árvores cultivadas e clones - 4F. Femininas, 4MA. Masculinas. 4CL. Clones

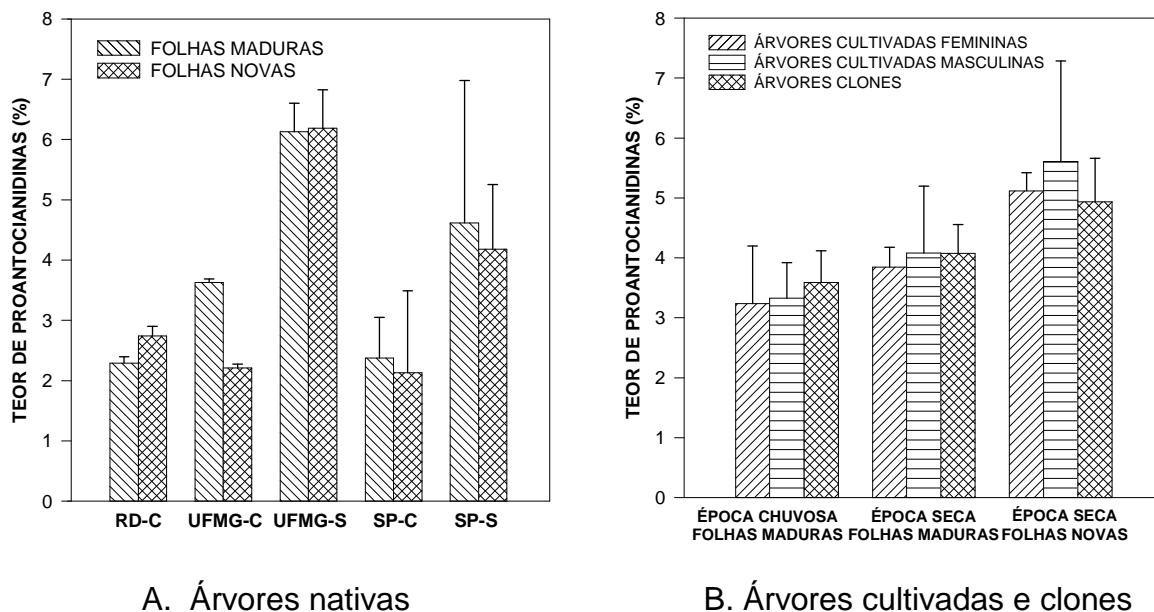


FIGURA 10. Teor de proantocianidinas em folhas *Cecropia glaziovii* provenientes de árvores nativas, cultivadas e clones.

RD: Parque Estadual de Rio Doce, UFMG: Campus da UFMG, SP: Serra da Piedade.

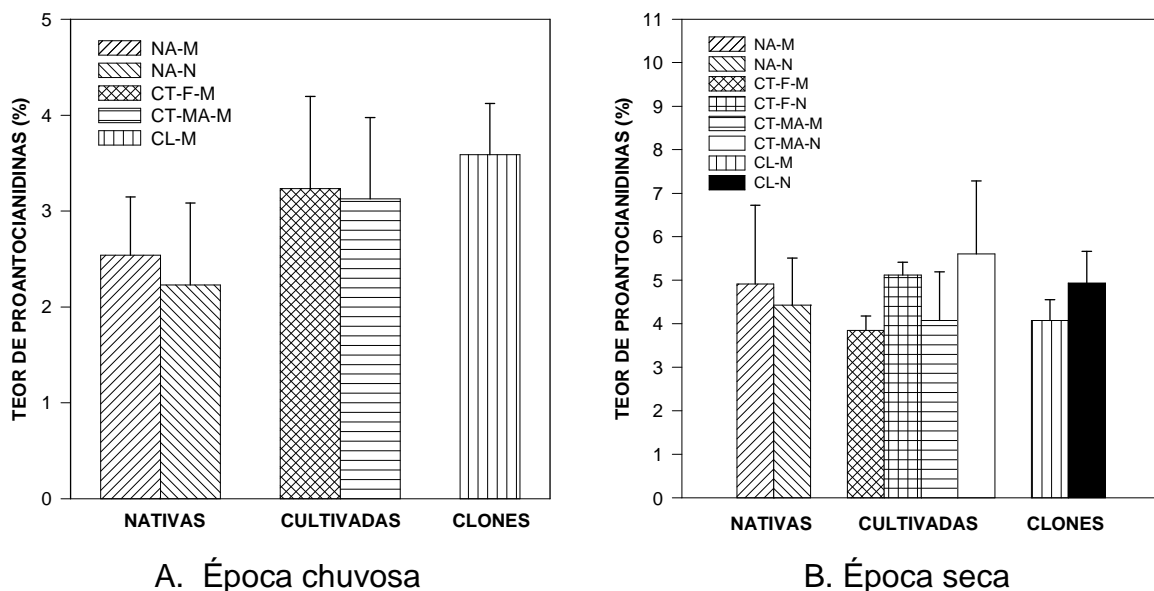


FIGURA 11. Teor de proantocianidinas em folhas de *Cecropia glaziovii* coletadas nas épocas chuvosa e seca.

NA: Árvores nativas, CT-F: Árvores cultivadas femininas, CT-MA: Árvores cultivadas masculinas, CL: Árvores clones, M: Folhas maduras, N: Folhas novas

Como se pode estabelecer, a partir dos dados da TABELA 16, a variação intraespecífica para os teores de proantocianidinas entre os diferentes grupos de amostras avaliados, apresenta a mesma tendência observada para os teores de flavonóides. As amostras cultivadas e os clones apresentaram menor variação intraespecífica que as populações nativas, de acordo com os valores de desvio padrão relativo (DPR) que alcançaram, para plantas nativas, valores de 41%, em comparação com as árvores cultivadas femininas e masculinas e clones com DPR máximos de 24, 24 e 12%, respectivamente.

TABELA 16. VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA DO TEOR DE PROANTOCIANIDINAS EM FOLHAS DE *CECROPIA GLAZIOVII* SNETHL. PROVENIENTES DE ÁRVORES NATIVAS, CULTIVADAS E CLONES

ORIGEM	ÉPOCA	AMOSTRA	n	TEOR DE FLAVONÓIDES			
				MENOR TEOR (%)	MAIOR TEOR (%)	TEOR MÉDIO (% \pm IC _{95%})	DPR (%)
ÁRVORES NATIVAS	CHUVOSA	C-M	7	1,5	3,6	2,54 \pm 0,64	25,8
		C-N	7	1,2	3,9	2,23 \pm 0,89	41,3
	SECA	S-M	5	2,8	6,3	4,92 \pm 1,80	29,6
		S-N	8	3,0	6,6	4,43 \pm 1,08	29,1
ÁRVORES CULTIVADAS	CHUVOSA	CT-F-C-M	5	2,4	4,3	3,23 \pm 0,96	24,0
		CT-MA-C-M	5	2,8	4,0	3,33 \pm 0,60	14,4
		CT-C-M	10	2,4	4,3	3,28 \pm 0,44	18,6
	SECA	CT-F-S-M	5	3,5	4,2	3,85 \pm 0,33	6,9
		CT-MA-S-M	5	2,8	5,3	4,08 \pm 1,12	22,1
		CT-S-M	10	2,8	5,3	3,96 \pm 0,46	16,1
		CT-F-S-N	5	4,8	5,5	5,12 \pm 0,30	4,7
		CT-MA-S-N	5	4,0	7,5	5,61 \pm 1,68	24,1
		CT-S-N	10	4,0	7,5	5,36 \pm 0,68	16,5
	ÁRVORES CLONES	CHUVOSA	CL-C-M	5	3,1	4,1	3,59 \pm 0,53
SECA		CL-S-M	5	3,7	4,6	4,07 \pm 0,48	9,4
		CL-S-N	5	4,0	5,6	4,93 \pm 0,73	11,9

CT: Cultivo, F: Femininas, MA: Masculinas, CL: Clone, C: Época chuvosa, S: Época seca, M: Folhas maduras, N: Folhas novas. n: número de espécimens coletados.

A relação entre o maior e o menor teor de proantocianidinas foi menor para as amostras de cultivo e clones que para as nativas. Para as árvores nativas esta relação esteve entre 2,3 e 3,3. A relação maior teor/menor teor foi menor que 1,9 para as amostras de cultivo e menor que 1,4 para os clones.

De acordo com os DPR, o teor de proantocianidinas em folhas de *C. glaziovii* está menos influenciado pelo ambiente, que o teor de flavonóides, uma vez que os clones apresentam menor variação nos teores de proantocianidinas que nos teores de flavonóides (TABELAS 15 e 16).

COMPARAÇÃO ENTRE PECÍOLOS E LÂMINAS FOLIARES

Avaliaram-se, também, algumas amostras de pecíolo e compararam-se os resultados com os obtidos para as respectivas lâminas foliares. Diferentemente do observado, previamente, nos teores de flavonóides (FIGURA 8), os teores de proantocianidinas nos pecíolos não apresentam uma tendência definida, observando-se amostras com teores muito menores, menores e semelhantes aos das lâminas foliares, como se pode constatar na FIGURA 12.

A partir dos resultados obtidos para teores de proantocianidinas, nas diferentes amostras avaliadas, recomenda-se, da mesma forma que quando considerado o teor de flavonóides, a coleta de folhas de *C. glaziovii* na época seca, podendo-se utilizar folhas de árvores nativas, cultivares e clones. As amostras de cultivo e de clones apresentaram menor variação intraespecífica que as folhas nativas e não foram detectadas diferenças nos teores de proantocianidinas entre folhas novas e maduras de *C. glaziovii*.

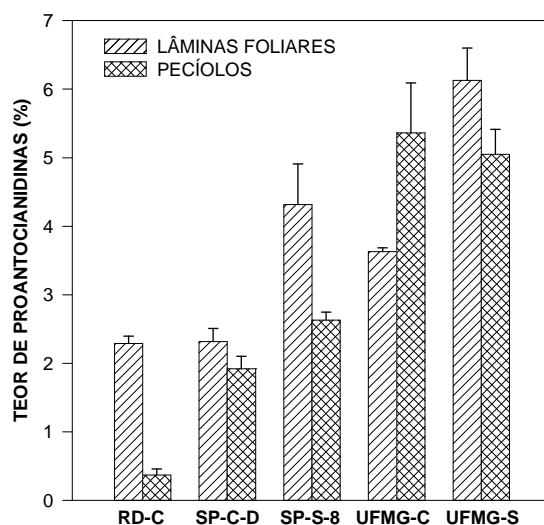


FIGURA 12. Teor de proantocianidinas em pecíolos e lâminas foliares de folhas maduras de *Cecropia glaziovii* coletadas nas épocas seca e chuvosa.

RD: Parque Estadual de Rio Doce, UFMG: Campus da UFMG, SP: Serra da Piedade, D: espécimen D, 8: espécimen 8. C: Época chuvosa, S: Época seca.

5.4.4. TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS EM FOLHAS DE *CECROPIA GLAZIOVII* SNETHL. – RECOMENDAÇÕES PARA A COLETA E COMPARAÇÃO COM OUTRAS ESPÉCIES

De acordo com os resultados previamente apresentados (Itens 5.3.3 e 5.3.4) tanto folhas novas como maduras podem ser utilizadas para fins industriais, sendo que, em conjunto, não se evidenciaram diferenças para os teores de flavonóides e de proantocianidinas.

A época seca é a mais adequada para coletar folhas de *C. glaziovii* de árvores nativas uma vez que, neste período do ano, tanto folhas novas como maduras apresentaram maiores teores de flavonóides e proantocianidinas que na época chuvosa. Para árvores cultivadas, obtiveram-se maiores teores, tanto de flavonóides como de proantocianidinas, na época seca, mas considerando que as diferenças observadas foram pequenas, as coletas podem ser realizadas durante todo o ano.

Comparadas às árvores nativas, as plantas cultivadas e clones apresentaram teores de flavonóides e proantocianidinas, similares ou maiores, porém, menor variação intraespecífica. Estes fatos sugerem que cultivares de *C. glaziovii* podem prover matéria prima vegetal de qualidade uniforme.

Um pequeno número de drogas vegetais tem tido sua eficácia e segurança confirmadas como anti-hipertensivas, apesar de algumas plantas serem utilizadas, tradicionalmente, no mundo. *Crataegus oxyacantha* L. [syn. *C. monogyna* Jacq. (Lindm.)] tem seu uso medicinal confirmado por ensaios pré-clínicos e clínicos para tratamento de insuficiência cardíaca congestiva e de sintomas do sistema simpático-adrenérgico ativado, como hipertensão, taquicardia e arritmia (WHO, 2002). Esta droga é utilizada no tratamento de distúrbios da função cardíaca em idosos que ainda não requerem terapia com glicosídeos cardiotônicos (REUTER, 1991). Os efeitos anti-hipertensivos de *Crataegus oxyacantha* foram demonstrados em ensaios *in vitro* e *in vivo* e em estudos clínicos (WHO, 2002), incluindo a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) (LACAILLE-DUBOIS et al., 2001).

Como mencionado na revisão bibliográfica (item 3.9.2.), tem-se demonstrado em ensaios *in vitro*, *in vivo* e em ensaios clínicos, a atividade anti-hipertensiva de extratos e frações de folhas de *C. glaziovii* (FRANCK, et al., 1996; FRANCK, 1998; LAPA et al., 1999; MATOS, 2000; ROCHA et al., 2002).

Extratos metanólicos, frações e compostos isolados de amostras de *Cecropia hololeuca*, *C. pachystachya* e *C. glaziovii*, coletadas no Brasil, foram ensaiados frente à espécie africana, *Musanga cecropioides* (Cecropiaceae), e *Crataegus oxyacantha*, no ensaio *in vitro* de atividade inibitória da ECA. Os extratos mais ativos foram os de *M. cecropioides*, com inibição completa (100%), e *C. glaziovii* com $91,0 \pm 8,9\%$ de inibição. Para as outras espécies, a inibição esteve no intervalo de 32 a 42%. De acordo com FRANCK (1998) e LACAILLE-DUBOIS et al (2001) o teor de proantocianidinas foi 4,6% para folhas e flores de *Crataegus oxyacantha*, 13,5% para folhas de *M. cecropioides*, 10,7 % para folhas de *C. pachystachya* e 11,4% para o extrato etanólico de *C. hololeuca*. No presente

trabalho, os teores médios de proantocianidinas em folhas de *C. glaziovii* foram $3,59 \pm 0,65\%$, $4,19 \pm 0,42\%$ e $4,19 \pm 0,40\%$ para árvores nativas, cultivadas e clones, respectivamente, valores estes da mesma ordem de magnitude ao relatado para *Crataegus oxyacantha*.

Para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, *C. oxyacantha/C.monogyna*, folhas e flores, devem conter não menos de 1,5% de flavonóides, de acordo com a Farmacopéia Européia (2002). É importante ressaltar que os teores médios de flavonóides em folhas de árvores nativas, cultivadas e clones, deste trabalho, foram $1,16 \pm 0,28\%$, $1,90 \pm 0,21\%$ e $2,43 \pm 0,46\%$, respectivamente. Os perfis químicos e farmacológicos similares para *C. glaziovii* e *Crataegus oxyacantha* sugerem que *C. glaziovii* poderia se um sucedâneo do *Crataegus*.

Estes são os primeiros dados do teor de flavonóides e proantocianidinas em folhas de *Cecropia glaziovii* Snethl. e podem ser úteis para a padronização de extratos que possam ser empregados para o desenvolvimento de produtos fitoterapêuticos e para a definição de parâmetros farmacopéicos.

5.5. ANÁLISES POR HPLC

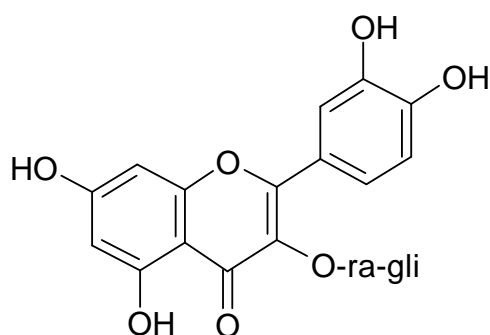
A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica analítica muito empregada para identificação e quantificação de compostos em misturas simples e complexas, uma vez que a sua sensibilidade permite a detecção de compostos presentes em baixas concentrações, empregando quantidades pequenas de amostra (MEYER, 1994). No caso de extratos e produtos fitoterápicos, os cromatogramas obtidos por HPLC constituem uma característica própria da amostra (impressão digital), útil para a caracterização e o controle de qualidade (BONATI, 1991; BAUER, 1998)

O detector mais freqüentemente utilizado para analisar os compostos separados na coluna é o UV-VIS, uma vez que muitas substâncias apresentam cromóforos e que as diferenças estruturais conduzem a espectros distintos, podendo-se selecionar um comprimento de onda, pouco ou muito seletivo, segundo, as necessidades do ensaio. No item 5.4. discutiram-se os fundamentos da espectrofotometria de absorção no ultravioleta e no visível que se aplicam, também, na detecção em HPLC

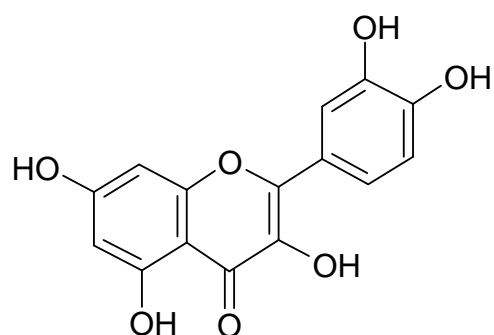
Entre os objetivos do presente trabalho estava a identificação de alguns metabólitos secundários presentes em *C. glaziovii*, particularmente ácidos orgânicos, flavonóides e proantocianidinas, e a quantificação de alguns deles. Para definir os comprimentos de onda mais adequados foram considerados os espectros de absorção UV-VIS (FIGURA 13) de ácido clorogênico, ácido protocatéquico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, orientina, isoquercitrina, (estruturas no item 3.9.3), rutina (36) e quercetina (37).

Deve-se destacar que as catequinas apresentam espectros muito semelhantes, com máximos de absorção a um λ menor que 220, com um ombro a 230 nm, um máximo com absorção de baixa intensidade a 280 nm e nenhuma absorção a 350 nm. As flavonas e flavonóis apresentam um máximo a λ menor que 220, a banda II com máximo de absorção entre 250 e 270 e a banda I com máximo de absorção entre 330 e 370 nm. O espectro do ácido clorogênico

apresenta máximos de absorção a 210, 300 e 325 nm, enquanto que o ácido protocatéquico apresenta absorção intensa a 280 nm e não absorve em 350 nm. Os resultados de FRANCK (1998) mostram que as proantocianidinas B1 e C1, constituídas por unidades de (-)-epicatequina, apresentam espectros de absorção ao UV-VIS semelhantes aos de (+)-catequina e (-)-epicatequina no que se refere a máximos de absorção.



(36) Rutina



(37) Quercetina

Considerando estes espectros de absorção escolheram-se, como comprimentos de onda para o registro dos perfís de *C. glaziovii*, 280 nm para a detecção de catequinas, proantocianidinas, flavonas e flavonóis e, 350 nm para o perfil de flavonas e flavonóis. Adicionalmente, para se obter um perfil não seletivo empregou-se o menor λ possível, de acordo com a transparência da fase móvel utilizada.

5.5.1. ENSAIOS PRELIMINARES

Com o objetivo de se estabelecer o perfil do extrato hidroetanólico (7:3) das folhas de *C. glaziovii*, amostra RD-C, obtiveram-se, nas condições descritas como Sistemas 1 e 2 (item 4.3.4.1.), a 210 nm, os cromatogramas da FIGURA 14. Neste extrato, bastante complexo, predominam os compostos polares, com tempos de retenção (TRs) menores que 30 min, isto é, eluídos com menos de 50% de acetonitrila. O aumento das áreas dos picos evidencia a necessidade de

se incluir um ácido na fase móvel para que os compostos polares não fiquem retidos na coluna, o que sugere que estes sejam de caráter ácido.

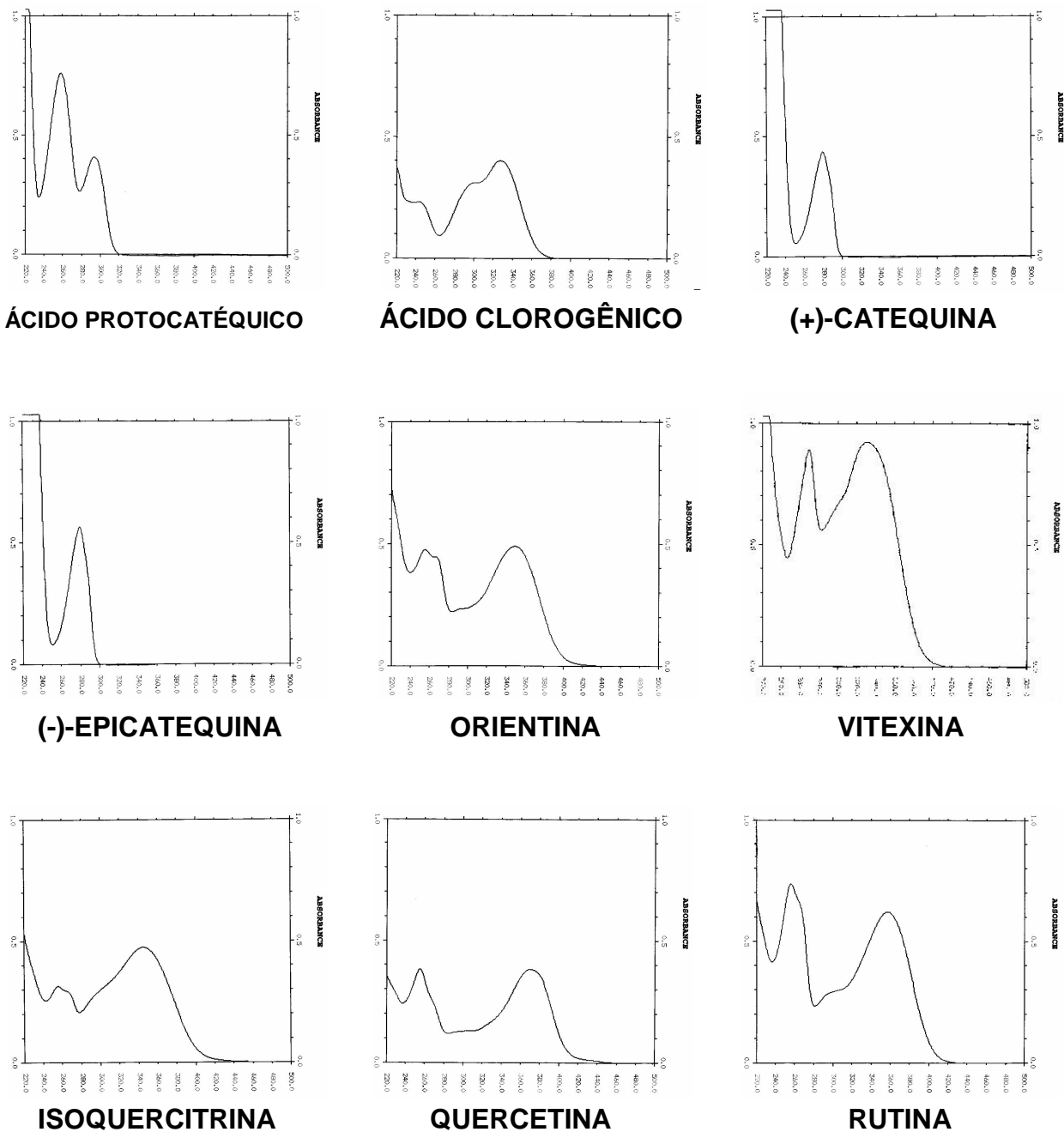


FIGURA 13. Espectros UV-VIS de alguns ácidos orgânicos, catequinas, flavonas e flavonóis presentes em *Cecropia glaziovii*.

Ácido protocatéquico 8 $\mu\text{g/mL}$, ácido clorogênico 4 $\mu\text{g/mL}$, (+)-catequina 20 $\mu\text{g/mL}$, (-)-epicatequina 20 $\mu\text{g/mL}$, orientina 10 $\mu\text{g/mL}$, vitexina 10 $\mu\text{g/mL}$, isoquercitrina 4 $\mu\text{g/mL}$, quercetina 4 $\mu\text{g/mL}$ e rutina 20 $\mu\text{g/mL}$. λ : 220 - 500 nm.

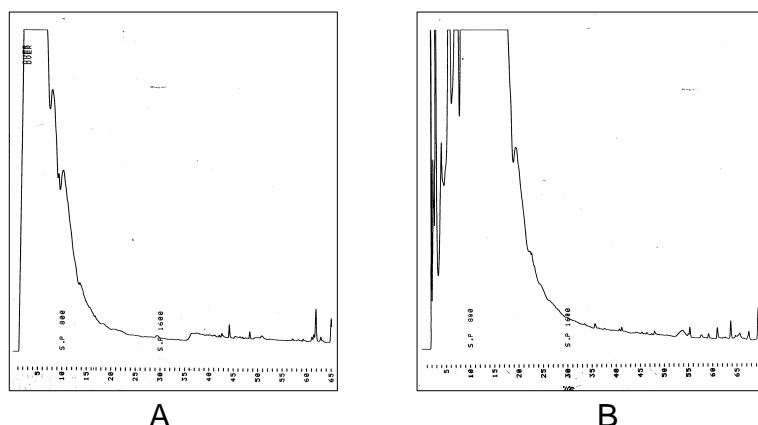


FIGURA 14. Perfís cromatográficos, obtidos por HPLC, para o extrato hidroetanólico (7:3) de lâminas foliares de folhas maduras de *Cecropia glaziovii*. Detecção no UV – 210 nm. A: Sistema Cromatográfico 1. B: Sistema Cromatográfico 2. (item 4.3.4.1.).

Empregando-se o Sistema Cromatográfico 3 (item 4.3.4.1.) obtiveram-se os perfís a 210 e 254 nm do extrato hidroetanólico (7:3) de folhas maduras de RD-C (FIGURA 15). No perfil a 210 nm observam-se dois grupos de picos, um primeiro grupo de compostos altamente polares, com TRs inferiores a 5 min (10% de CH₃CN) e um segundo grupo de polaridade maior, eluído entre 15 e 40 min (20 a 45% de CH₃CN). Neste cromatograma (FIGURA 15), com melhor resolução que os anteriores (FIGURA 14) constata-se o alto grau de complexidade do extrato. O perfil a 254 nm apresenta uma distribuição de picos semelhante àquela observada a 210 nm, mas de modo geral muito mais fracos.

Nos Sistemas cromatográficos 1, 2 e 3 foram injetados, isoladamente e como mistura, 20 µl de soluções padrão 0,1 mg/mL de ácido protocatéquico, ácido clorogênico, (+)-catequina e (-)-epicatequina, compostos descritos por FRANCK (1996 e 1998), como presentes em folhas de *C. glaziovii*. No entanto, os picos correspondentes não ficaram adequadamente resolvidos, sendo que, quando injetados separadamente, estes compostos foram eluídos entre 2 e 3 minutos, com tempos de retenção muito próximos entre si, e com muita variação nas repetições, não sendo possível, identificar, na mistura os pico correspondentes a cada substância de referência.

Posteriormente foram ensaiadas várias fases móveis, incluindo sistemas isocráticos, com percentagens de acetonitrila ou metanol entre 1 e 5%, e diferentes sistemas em gradiente de acetonitrila-água e metanol-água, com e sem adição de ácido fosfórico, temperatura do forno de 30, 35 e 40 °C, fluxo entre 0,5 e 1,0 mL/min. Em todos estes ensaios não houve resolução adequada dos picos correspondentes às quatro substâncias avaliadas: ácido protocatéquico, ácido clorogênico, (+)-catequina e (-)-epicatequina, sendo estes eluidos juntos, muitas vezes como um único pico em TRs tempos menores que 3 minutos.

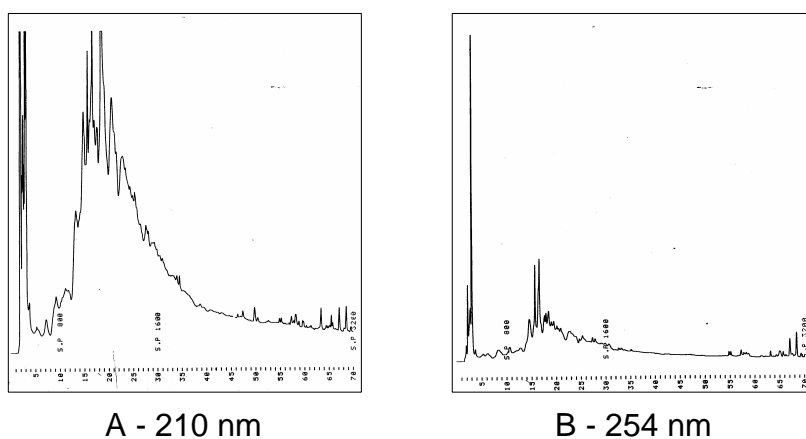


FIGURA 15. Perfil cromatográficos por HPLC para o extrato hidroetanólico (7:3) de lâminas foliares de folhas maduras de *Cecropia glaziovii*. Sistema Cromatográfico 3 (item 4.3.4.1.). Detecção no UV. A: 210 nm, B: 254 nm.

Utilizando-se sistemas isocráticos com 2, 5 e 10% de metanol e solução 0,4 M de sulfato de sódio obteve-se a eluição diferenciada dos quatro picos das substâncias de referência, cujas áreas aumentaram ao se incluir ácido fosfórico na solução de sulfato de sódio. Os picos apresentaram boa resolução, mas TRs ainda inferiores a 5 minutos (FIGURA 16). Este sistema não era adequado para o registro dos perfís de amostras, já que o alto teor de sulfato de sódio limitava a quantidade de metanol que se poderia empregar, sem risco de precipitação do sal na coluna, mas sugeriu que o emprego de um sistema tampão-metanol poderia levar a uma boa resolução dos picos de interesse. Empregou-se comprimento de onda 230 nm, o menor possível, considerando-se as restrições de transparência do metanol.

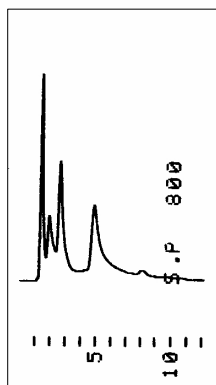


FIGURA 16. Perfil cromatográfico obtido por HPLC, para a mistura de ácido protocatéquico, ácido clorogênico, (+)-catequina e (-)-catequina 0,05 mg/mL em metanol. Fase móvel: NaSO₄ 0,4 M (água) – metanol 90:10. 30 °C. Fluxo 1 mL/min. 20 µL. Detecção no UV – 230 nm.

Com o extrato hidroetanólico de SP-S-M-2, amostra com alto teor de flavonóides e proantocianidinas, avaliaram-se os comprimentos de onda 230 nm, 240 nm e 280 nm, utilizando-se o Sistema Cromatográfico 4 (item 4.3.4.1.) e tampão fosfato monobásico de potássio / ácido fosfórico, pH 2,5. Os perfís a 230 e 240 nm foram muito similares entre si, mas no caso de 240 nm, a linha base foi mais estável. O perfil a 280 nm se apresenta mais simples que os perfís a 230 e 240 nm.

Para escolher o melhor sistema tampão ensaiaram-se, a 280 nm, no Sistema Cromatográfico 4 (item 4.3.4.1.), tampão - metanol, testando soluções tampão 25 mM, de

- fosfato monobásico de potássio / ácido fosfórico, pH 2,5
- acetato de sódio / ácido acético, pH 4,0
- acetato de sódio / ácido acético, pH 4,5
- acetato de sódio / ácido acético, pH 5,0
- citrato trisódico / ácido cítrico, pH 5,0.

Avaliaram-se as soluções de referência e o extrato hidroetanólico (7:3) de folhas da amostra SP-S-M-2 dissolvido em metanol – água (1:1). A melhor resolução dos picos principais obteve-se com o tampão acetato pH 5,0. Os picos das substâncias de referência foram completamente resolvidos e distribuídos ao

longo do cromatograma (FIGURA 17). Posteriormente fez-se um ensaio com tampão acetato 50 mM, pH 5,0 observando que os perfís obtidos, tanto para amostra como para a solução dos padrões, não diferia dos obtidos ao empregar o tampão 25 mM. Considerando que uma solução com maior concentração de sais, apresenta maior risco de precipitação na coluna, escolheu-se a concentração de 25 mM.

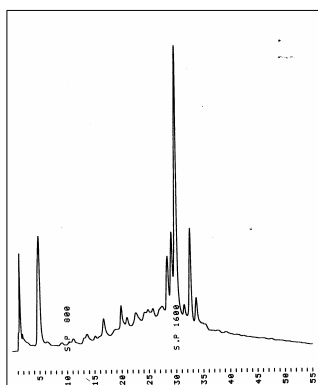


FIGURA 17. Perfil cromatográfico obtido por HPLC para o extrato hidroetanólico (7:3) de lâminas foliares de folhas maduras de *Cecropia glaziovii*, amostra SP-S-M-2. Sistema Cromatográfico 4 (item 4.3.4.1.). Detecção no UV - 280 nm.

Estabeleceram-se, como condições de trabalho preliminares, o Sistema Cromatográfico 4 (item 4.3.4.1.), o tampão acetato de sódio / ácido acético, 25 mM, pH 5,0 e 280 nm. Injetaram-se, adicionalmente, em separado, 20 μ L de soluções padrão 0,1 mg/ml (em metanol) de orientina, isorientina, vitexina, isovitexina, rutina, isoquercitrina e quercetina, independentemente e co-injeções destes padrões e da mistura de ácido protocatéuico, ácido clorogênico, (+)-catequina e (-)-epicatequina, com soluções de extratos hidroetanólicos (7:3) das amostras RD-C-M e SP-S-2-M, para identificar os picos correspondentes nos cromatogramas das amostras e, assim, planejar os ensaios para melhorar a resolução dos picos correspondentes. Estas substâncias foram escolhidas já que, de acordo com os relatos de FRANCK et al., (1996), FRANCK, (1998), XAVIER (1998) e MATOS (2000), estão presentes nas espécies de *Cecropia*. Avaliaram-se, também, rutina e quercetina, como outros flavonóides de referência.

Posteriormente, avaliaram-se diferentes sistemas gradiente empregando-se tampão acetato 25 mM, pH 5,0 e metanol, temperaturas de 30, 35 e 40 °C, e 280 nm de comprimento de onda e fluxos de 0,5; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,5 mL/min. Testaram-se vários sistemas gradiente, avaliando-se, também, o efeito da temperatura e do fluxo. Escolheram-se as condições cromatográficas descritas na metodologia (item 4.3.4.2.), como o Sistema 5, para realizar os perfís cromatográficos das amostras de folhas de *C. glaziovii* selecionadas, a 240 e 280 nm, perfís apresentados nas FIGURAS 18 e 19.

5.5.2. PERFÍS CROMATOGRÁFICOS A 240 nm

Para a obtenção dos perfís cromatográficos empregaram-se as mesmas amostras selecionadas para os ensaios quantitativos, isto é, amostras que apresentaram, no ensaio espectrofotométrico, teores extremos, maiores e menores, de flavonóides. Avaliaram-se, neste caso, unicamente extratos de folhas maduras. Os perfís cromatográficos a 240 nm, empregando-se o Sistema Cromatográfico 5 (item 4.3.4.2.), estão mostrados nas FIGURAS 18a - 18d.

Nas diferentes amostras, observa-se um grupo de picos com TRs inferiores a 3 minutos, entre os quais está o do ácido protocatéquico (TR \cong 1,6 min), seguido pelo pico do ácido clorogênico (TR \cong 4 min). Entre 7 e 35 min, observa-se um grupo de picos com resolução inadequada, que inclui os picos de (+)-catequina, (-)-epicatequina, orientina, isorientina e isovitexina. Nesta região, possivelmente, são também registrados os picos das proantocianidinas relatadas como presentes em *C. glaziovii* (FRANCK, 1998). Finalmente, registrado como um pico, com TR semelhante ao da quercetina (TR \cong 48 min.), que pode corresponder a agliconas de flavonóides.

As diferentes amostras foram preparadas da mesma forma e injetadas nas mesmas condições cromatográficas, o que permite avaliar, de forma qualitativa, a

variação na composição dos metabólitos secundário presentes. Observa-se que, as amostras com os maiores teores de flavonóides, SP-S-2-M, SP-Jun-M e CL-S-M-1 ($> 2,5\%$), apresentaram picos com áreas muito maiores que aquelas das amostras com os menores teores de flavonóides, RD-C-M, SP-S-M-B e SP-S-M-F, ($< 0,8\%$). No entanto, algumas amostras com teores intermediários de flavonóides ($1,7-2,5\%$), exibem perfís com áreas semelhantes àquelas das amostras com alto teor de flavonóides, por exemplo: CT-S-MA-M-1, e CL-S-M-5, ou picos pequenos como as amostras com baixo teor de flavonóides tais como: SP-S-M-5, CT-C-F-M-5 e CT-C-MA-M-5, sendo que nas amostras SP-S-M-5 e CT-C-F-M-5 um pico de compostos menos polares, possivelmente agliconas de flavonóides, apresenta um área consideravelmente maior que as das amostras com baixo teor de flavonóides. Outras amostras com teores intermediários ($1,7-2,5\%$) de flavonóides, por exemplo, CT-C-F-M-1, CT-S-F-M-1, CT-C-MA-M-1 CT-S-MA-M-1, CL-C-M-5 apresentam perfís com áreas intermediárias.

Com relação às proantocianidinas, a não identificação dos picos correspondentes, inviabilizou estabelecer uma relação entre as áreas dos picos nos cromatogramas e o teor de proantocianidinas determinado espectrofotometricamente. As amostras SP-S-M-2 e UFMG-S-M, com os maiores teores de proantocianidinas ($6,3 \pm 1,0\%$ e $6,1 \pm 0,5\%$, respectivamente), apresentam perfís diferentes na região entre 7 e 35 minutos, onde possivelmente são eluidas as proantocianidinas, o que sugere que a diferença nos teores de flavonóides ($3,4 \pm 0,2\%$ e $1,2 \pm 0,2\%$), tem maior influências no perfil que as proantocianidinas presentes. Os perfís das amostras com os menores teores de proantocianidinas ($< 2,5\%$), RD-C-M, SP-C-D-M e CT-C-F-M-5, apresentam picos de áreas pequenas, na região entre 7 e 35 min. Estas amostras também contêm baixos teores de flavonóides ($< 1,2\%$), sendo que a de CT-C-F-M-5, com áreas ligeiramente maiores, contém o maior teor de flavonóides das três amostras, e a de RD-C-M, com as menores áreas, o menor teor tanto de proantocianidinas como de flavonóides.

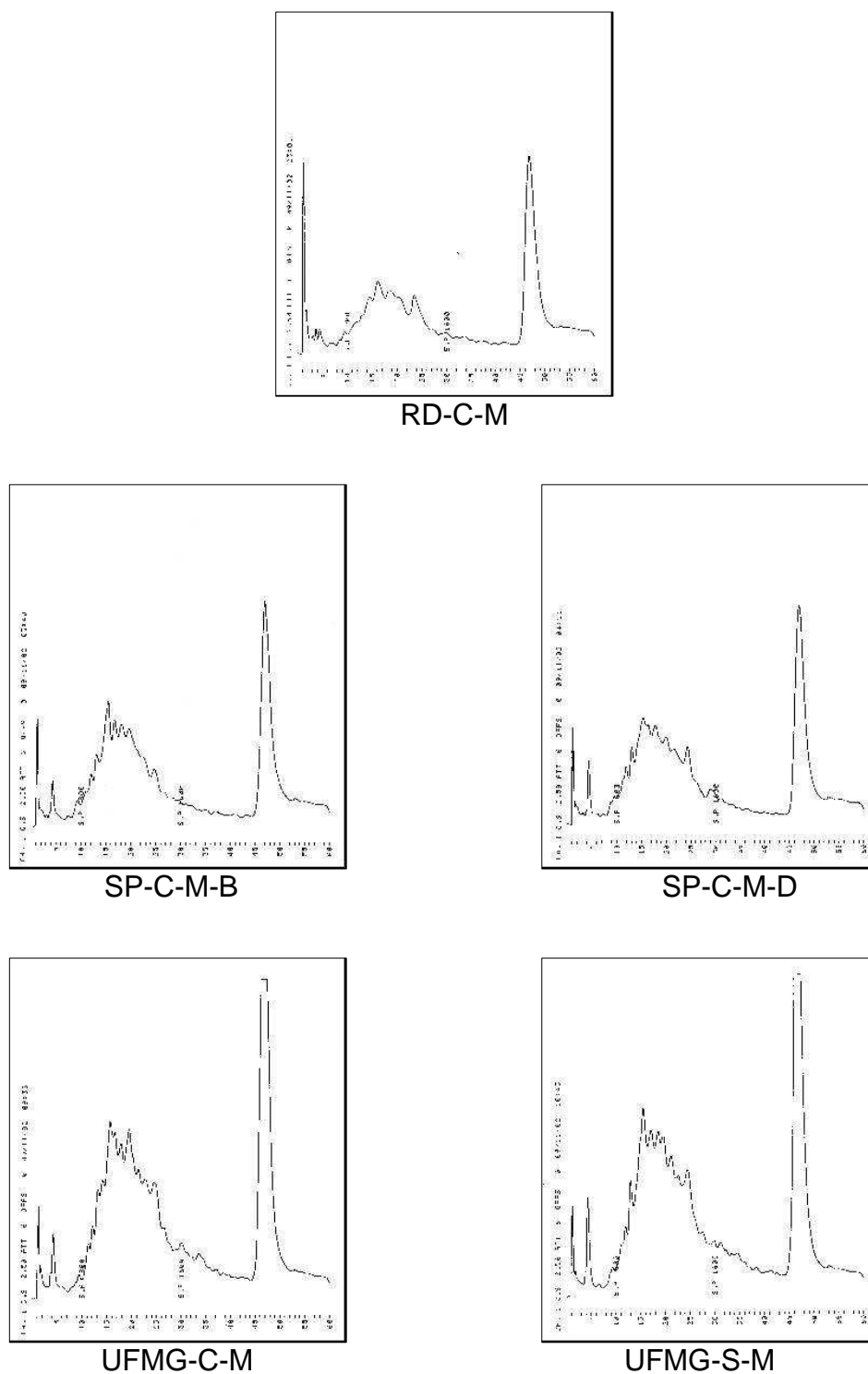
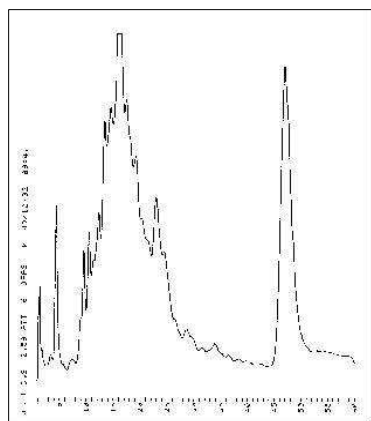
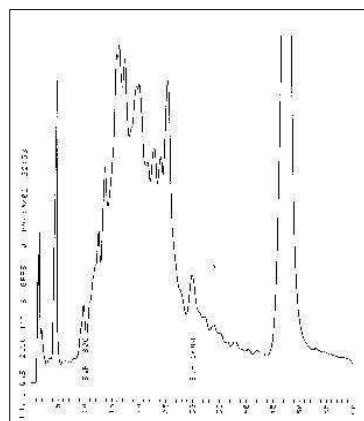


FIGURA 18a: Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras provenientes das árvores nativas de *Cecropia glaziovii*: RD-C-M, SP-C-M-B, SP-C-M-D, UFMG-C-M e UFMG-S-M. Sistema Cromatográfico 5 – Detecção no UV -240 nm.

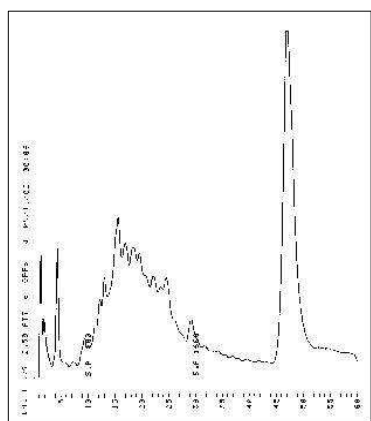
RD: Parque Estadual do Rio Doce, UFMG: *Campus* da UFMG, SP: Serra da Piedade, C: Época chuvosa, S: Época seca, M: Folhas maduras.



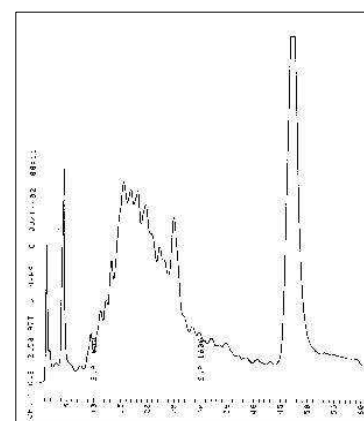
SP-Jun-M



SP-S-M-2



SP-S-M-5



SP-S-M-8

FIGURA 18b: Perfís cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras provenientes das árvores nativas de *Cecropia glaziovii*: SP-Jun-M, SP-S-M-2, SP-S-M-5, SP-S-M-8. Sistema Cromatográfico 5 – Detecção no UV -240 nm. SP: Serra da Piedade. S: Época seca. M: Folhas maduras.

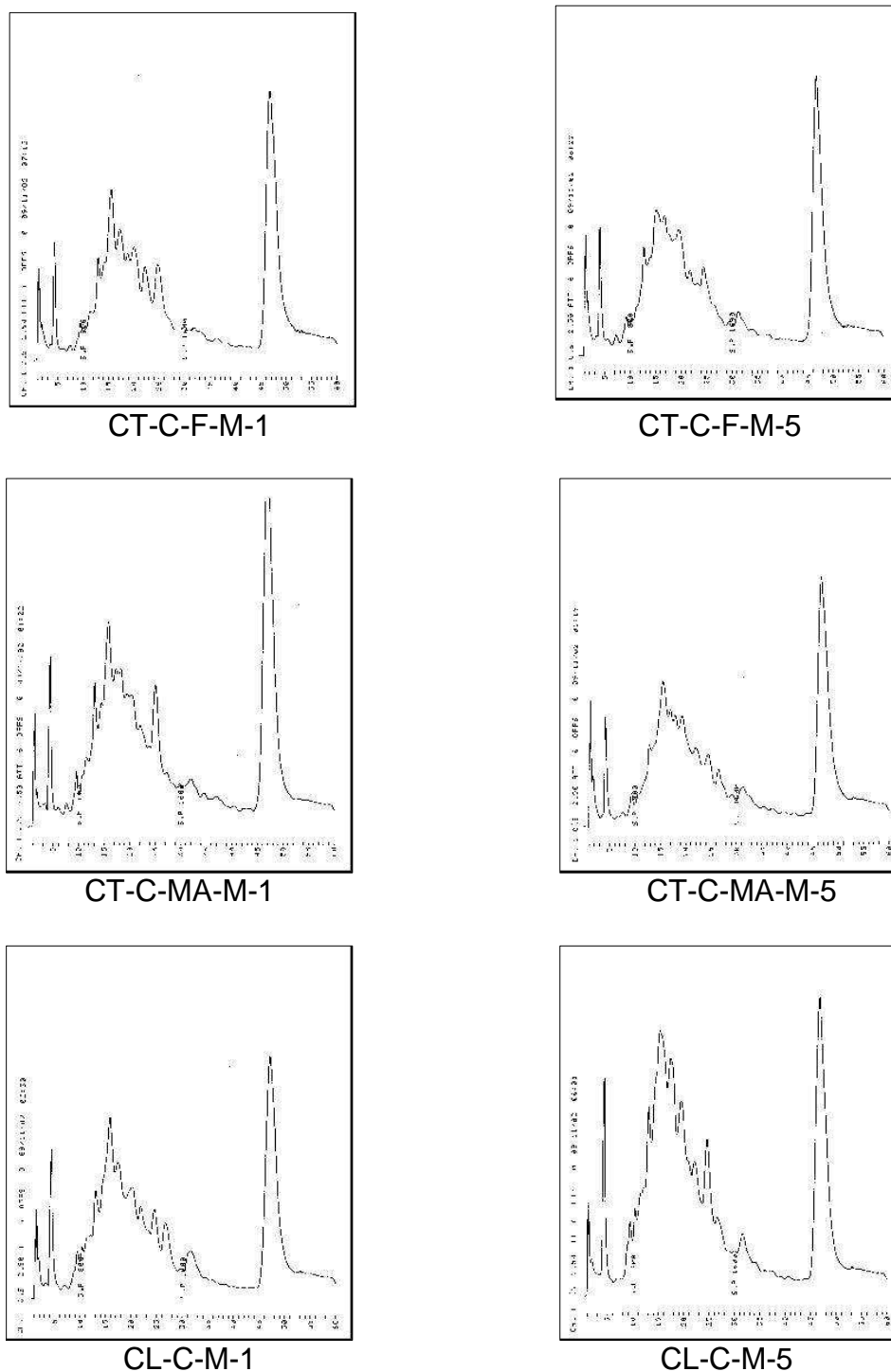


FIGURA 18c: Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras de *Cecropia glaziovii* provenientes de cultivares femininos (CT-C-F-M-1, CT-C-F-M-5), masculinos (CT-C-MA-M-1, CT-C-MA-M-5), e clones (CL-C-M-1, CL-C-M-5) coletadas na época chuvosa. Sistema Cromatográfico 5 – Detecção no UV -240 nm.

CT: Cultivadas, F: Femininas, MA: Masculinas, CL: Clones, M: Folhas maduras, C: Época chuvosa.

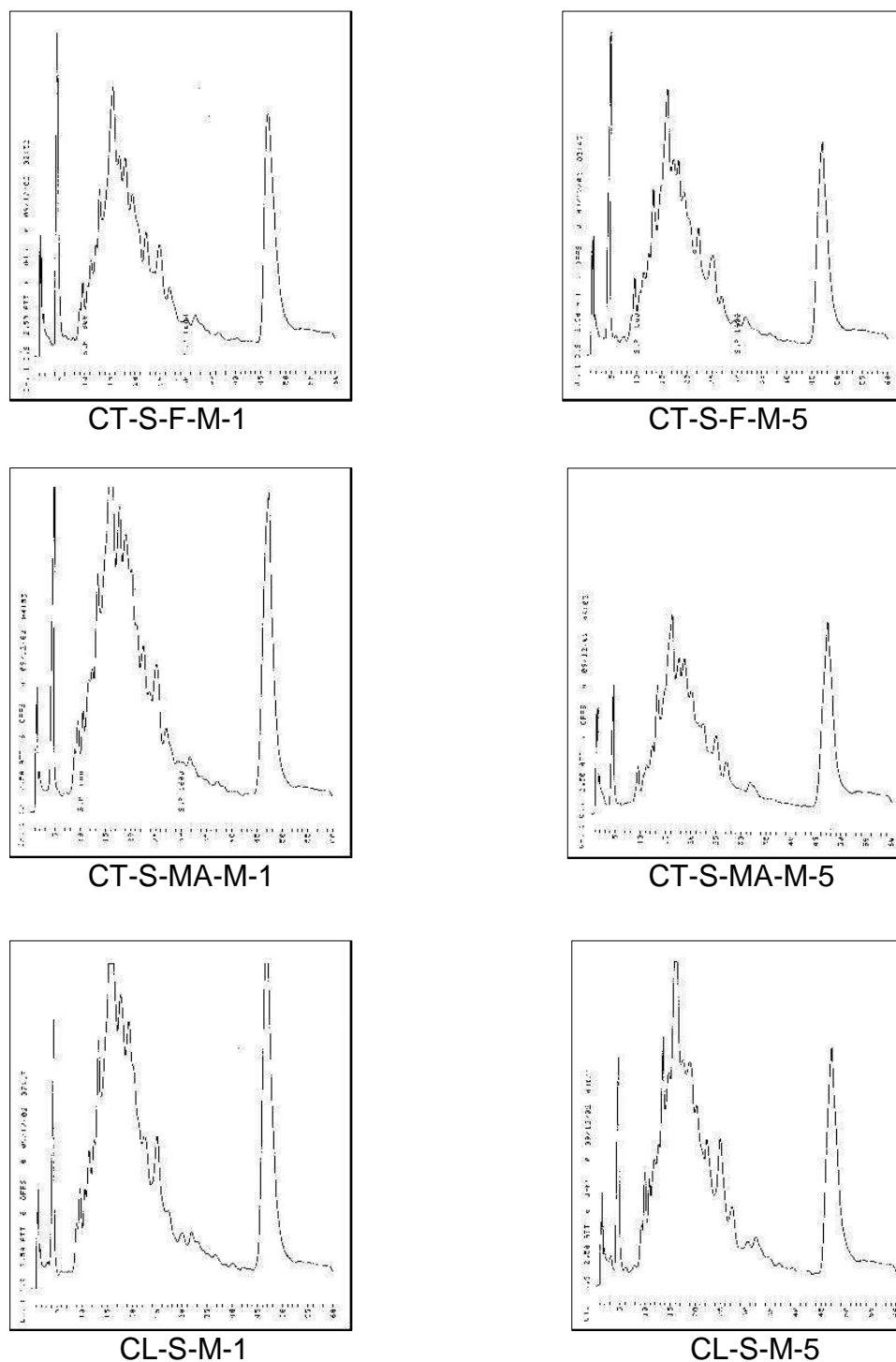


FIGURA 18d: Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras de *Cecropia glaziovii* provenientes de cultivares femininos (CT-S-F-M-1, CT-S-F-M-5), masculinos (CT-S-MA-M-1, CT-S-MA-M-5), e clones (CL-S-M-1, CL-S-M-5) coletadas na época seca.

Sistema Cromatográfico 5 – Detecção no UV -240 nm.

CT: Cultivadas, F: Femininas, MA: Masculinas, CL: Clones, M: Folhas maduras, S: Época chuvosa.

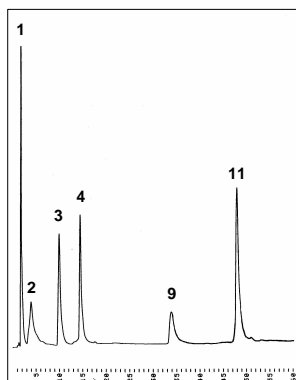
5.5.3. PERFÍS CROMATOGRÁFICOS A 280 nm

Uma vez estabelecidos os parâmetros cromatográficos identificaram-se, por injeção de soluções metanólicas de cada substância de referência (FIGURA 19), e por co-injeções com a amostra SP-S-2-M, alguns dos picos presentes nas amostras (FIGURA 20). Empregaram-se soluções metanólicas das mesmas substâncias de referência selecionadas durante os ensaios preliminares: ácido protocatéquico e ácido clorogênico (0,05 mg/mL) e (+)-catequina, (-)-epicatequina, e orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina, rutina, isoquercitrina e quercetina (1,0 mg/mL). Para as co-injeções, fizeram-se os ajustes de atenuação necessários.

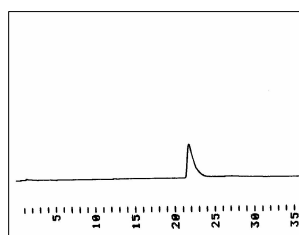
Pode-se observar que para os ácidos carboxílicos e a quercetina (aglicona), obtiveram-se picos finos e simétricos. Já para os glicosídeos de flavonóides, os picos apresentaram cauda, ainda utilizando uma fase móvel com pH ácido. Dada a dificuldade de se obter uma melhor resolução dos picos, manteve-se o Sistema Cromatográfico 5. Na TABELA 17 indicam-se as médias dos tempos de retenção para os padrões injetados (n=3), utilizando-se as condições do Sistema 5.

TABELA 17 – TEMPOS DE RETENÇÃO DOS PADRÕES - SISTEMA CROMATOGRÁFICO 5, DETECÇÃO UV- 280 nm

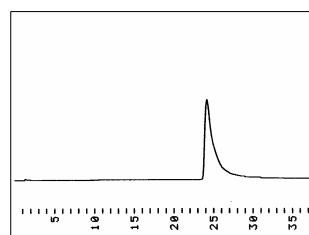
SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA	TEMPO DE RETENÇÃO (min \pm IC _{95%}) n=3
Ácido protocatéquico	1,7 \pm 0,1
Ácido clorogênico	3,9 \pm 0,3
(+)-catequina	9,9 \pm 0,3
(-)-epicatequina	14,5 \pm 0,4
Orientina	21,9 \pm 0,5
Isoorientina	24,0 \pm 0,5
Vitexina	24,9 \pm 0,6
Isovitexina	31,1 \pm 0,8
Rutina	33,7 \pm 0,7
Isoquercetrina	33,9 \pm 1,0
Quercetina	48,0 \pm 0,2



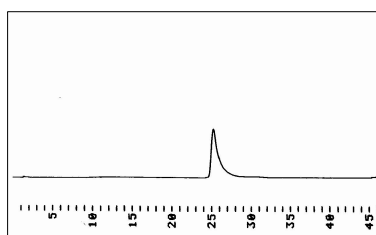
- 1. ÁCIDO PROTOATÉQUICO
- 2. ÁCIDO CLOROGÊNICO
- 3. (+)-CATEQUINA
- 4. (-)-EPICATEQUINA
- 9. RUTINA
- 11. QUERCETINA



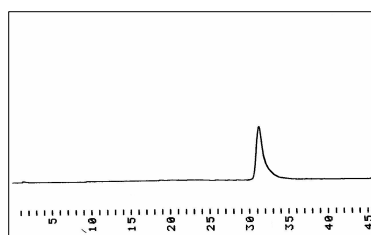
ORIENTINA



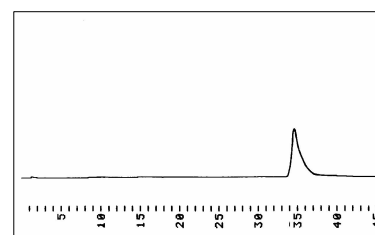
ISOORIENTINA



VITEXINA



ISOVITEXINA



ISOQUERCETRINA

FIGURA 19. Cromatogramas obtidos por HPLC para as substâncias de referência. Sistema Cromatográfico 5. Detecção no UV – 280 nm.

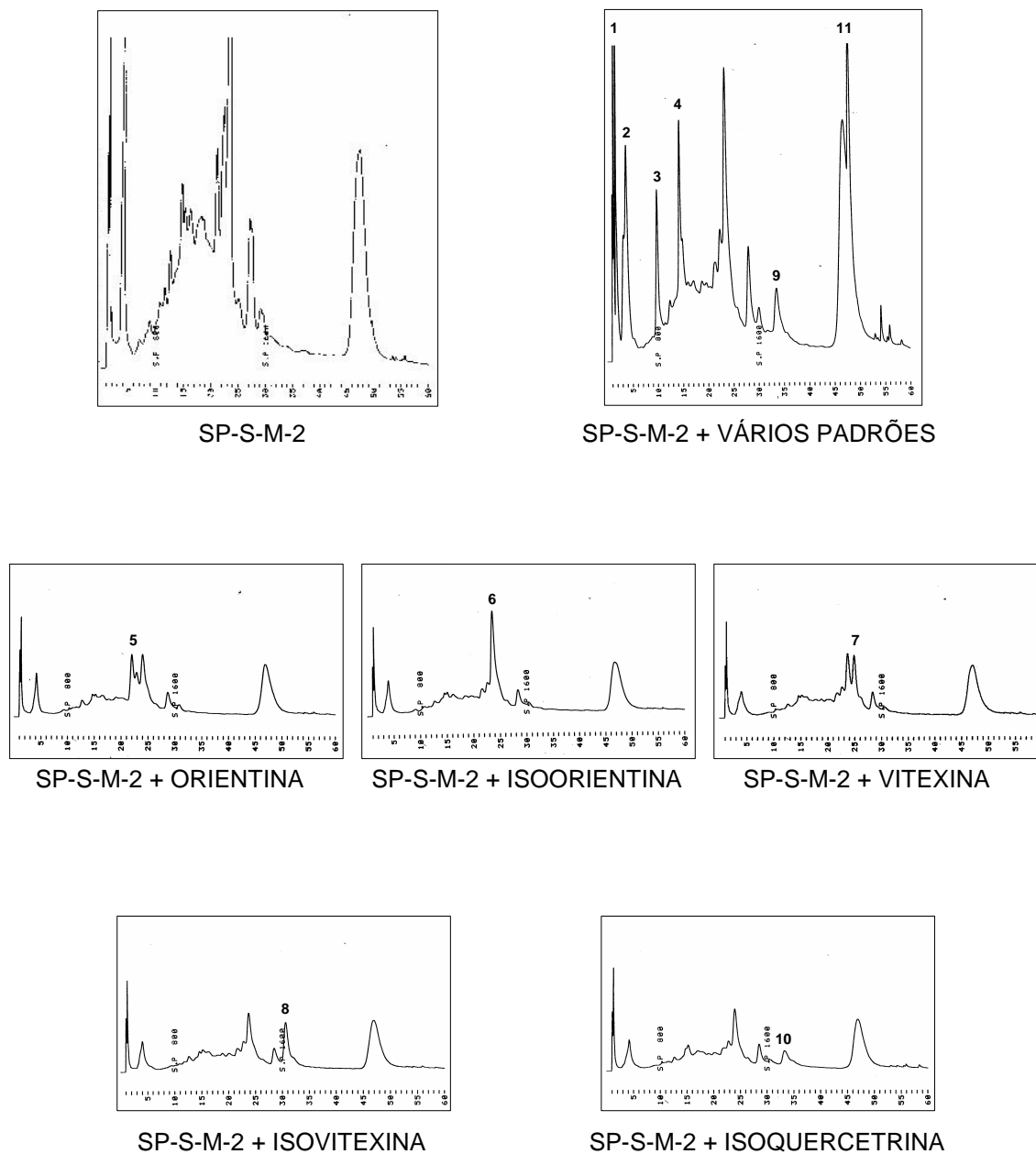


FIGURA 20. Co-injeções com as substâncias de referência: ácido protocatéquico (1), ácido clorogênico (2), (+)-catequina (3), (-)-epicatequina (4), orientina (5), isorientina (6), vitexina (7), isovitexina (8), rutina (9), isoquercetrina (10) e quercetina (11). Amostra: SP-S-M-2. Sistema Cromatográfico 5. Detecção no UV – 280 nm.

Por comparação dos perfís obtidos para o extrato hidroetanólico (7:3) de SP-S-M-2 e para as co-injeções com as substâncias de referência (FIGURA 20), confirmou-se a presença de ácido protocatéquico, ácido clorogênico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, orientina, isoorientina e isovitexina. Não foram detectadas, no extrato de SP-S-M-2, vitexina, isoquercetrina e rutina. O pico com maior TR, 47 min., parece corresponder a uma ou várias agliconas de flavonóides, uma vez que com um tempo de retenção semelhante, 48 min., é eluída a quercetina, como um pico mais fino que o da amostra (FIGURA 20). Em alguns dos cromatogramas obtidos, nos ensaios para a definição do sistema cromatográfico, se observou a presença de vários picos nesta região. Em nenhum dos ensaios se obteve uma adequada resolução dos picos desta região que permitisse a identificação de algum dos compostos da mistura. Por isso, no sistema gradiente escolhido, esta região tem aumentos rápidos da percentagem de metanol, buscando diminuir o tempo da corrida.

As FIGURAS 21a - 21d reúnem os perfís obtidos a 280nm nas condições cromatográficas identificadas como Sistema Cromatográfico 5 (item 4.3.4.2.), para o grupo de amostras selecionado. O perfil, ainda que mais simplificado e com picos melhor resolvidos que o perfil a 240 nm, apresenta as mesmas características: um grupo de picos de substâncias muito polares, incluindo o do ácido protocatéquico, um pico que é eluído a 4 minutos (ácido clorogênico), um grupo de picos, com pouca resolução, entre 7 e 35 min, e um pico de compostos pouco polares (agliconas de flavonóides), com TR próximo de 47 minutos. A absorvidade dos diferentes compostos é aproximadamente a metade daquela observada a 240 nm, uma vez que para se obterem picos de áreas semelhantes às alcançadas a 240 nm foi necessário, nos perfís a 280 nm, injetar 20 µL em vez de 10 µL de solução.

Da mesma forma que nos perfís a 240 nm, há uma clara diferença na área dos picos das amostras com baixos teores de flavonóides (< 0,8%), RD-C-M, SP-S-M-B e SP-S-M-F, em relação àquelas com os maiores teores (>2,5%), SP-S-M-2, SP-Jun-M e CL-S-M-1, indicando que as variações nas concentrações destes metabólitos, nos diferentes espécimes, se vêm refletidas nos perfís

cromatográficos. Nas amostras com teores um pouco menores aos máximos determinados (1,7 – 2,2%), observaram-se perfís com áreas semelhantes aos das amostras com altos teores de flavonóides, como no caso de C-S-MA-M-1, CL-C-M-5 e CL-S-M-5, e perfís com picos de áreas intermediárias, como nas amostras C-C-F-M-1, C-S-F-M-1, C-S-F-M-5, C-C-MA-M-1 e CL-C-M-1. As amostras com teores entre 1,0 e 1,5% (SP-S-M-8, UFMG-C-M, UFMG-S-M, CT-C-F-M-5, CT-C-MA-M-5 e CT-S-MA-M-5) apresentaram áreas um pouco maiores que os das amostras com os menores teores de flavonóides.

Levando-se em consideração o teor de proantocianidinas, da mesma forma que nos perfís a 240 nm, não se observa uma relação direta entre o teor destas e as áreas dos picos, na região entre 7 e 35 min, sendo que as amostras com os maiores teores de proantocianidinas (> 6,0%), SP-S-2-M e UFMG-S-M, apresentam perfís com áreas muito diferentes, predominando a diferença no teor de flavonóides.

Os perfís a 240 e 280 nm, além da distribuição dos picos característicos de *C. glaziovii*, permitem uma correlação entre a área dos picos e o teor de flavonóides, determinado espectroscopicamente, mas não permitem este tipo de correlação com o teor de proantocianidinas totais. Os perfís a 280, um pouco mais simples que os obtidos a 240 nm, apresentaram picos melhor resolvidos, o que permitiu a identificação de alguns picos presentes nos cromatogramas. Assim, conclui-se que, para a obtenção de perfís de extratos ou frações de folhas de *C. glaziovii*, 280 nm é um comprimento de onda mais adequado que 240 nm.

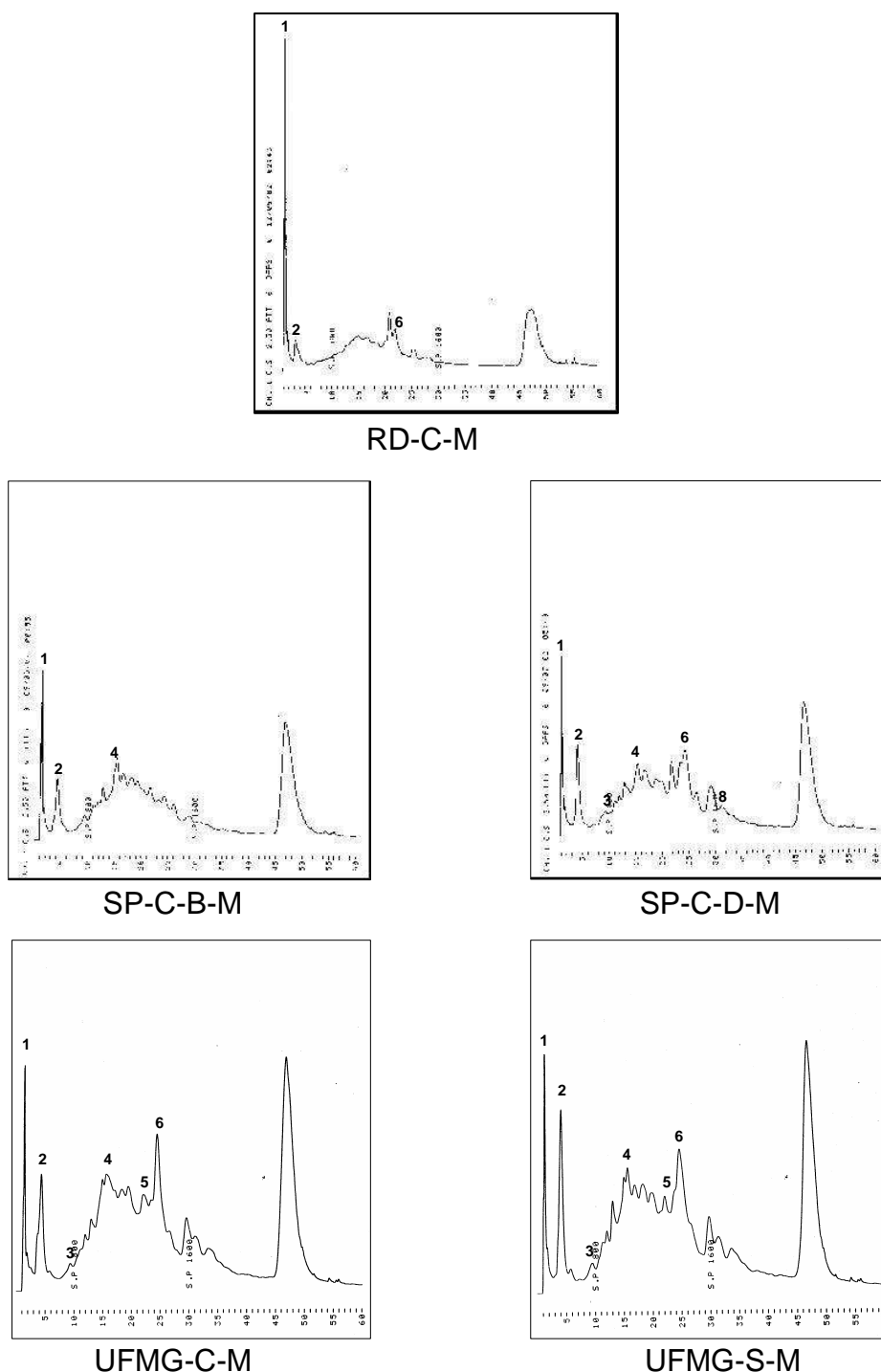


FIGURA 21a: Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras provenientes das árvores nativas de *Cecropia glaziovii*: RD-C, SP-C-B, SP-C-D, UFMG-C e UFMG-S. Sistema Cromatográfico 5 – Detecção no UV -280 nm.

RD: Parque Estadual do Rio Doce, UFMG: *Campus* da UFMG, SP: Serra da Piedade, C: Época chuvosa, S: Época seca, M: Folhas maduras.

1: ácido protocatéuico, 2: ácido clorogênico, 3: (+)-catequina, 4: (-)-epicatequina, 5: orientina, 6: isorientina, 8: isovitexina.

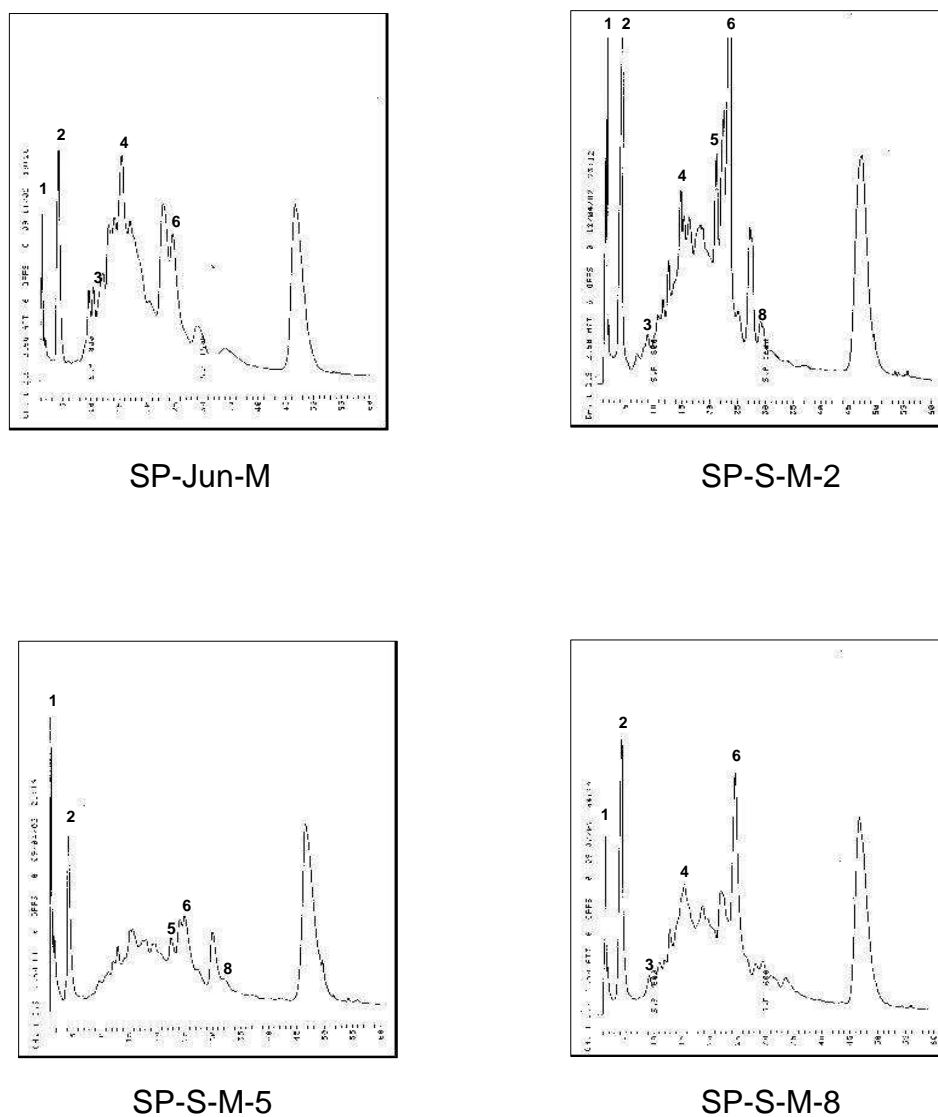


FIGURA 21b: Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras provenientes das árvores nativas de *Cecropia glaziovii*: SP-Jun, SP-S-2, SP-S-5, SP-S-8. Sistema Cromatográfico 5. Detecção no UV - 280 nm.

SP: Serra da Piedade. S: Época seca. M: Folhas maduras.

1: ácido protocatéquico, 2: ácido clorogênico, 3: (+)-catequina, 4: (-)-epicatequina, 5: orientina, 6: isoorientina, 8: isovitexina.

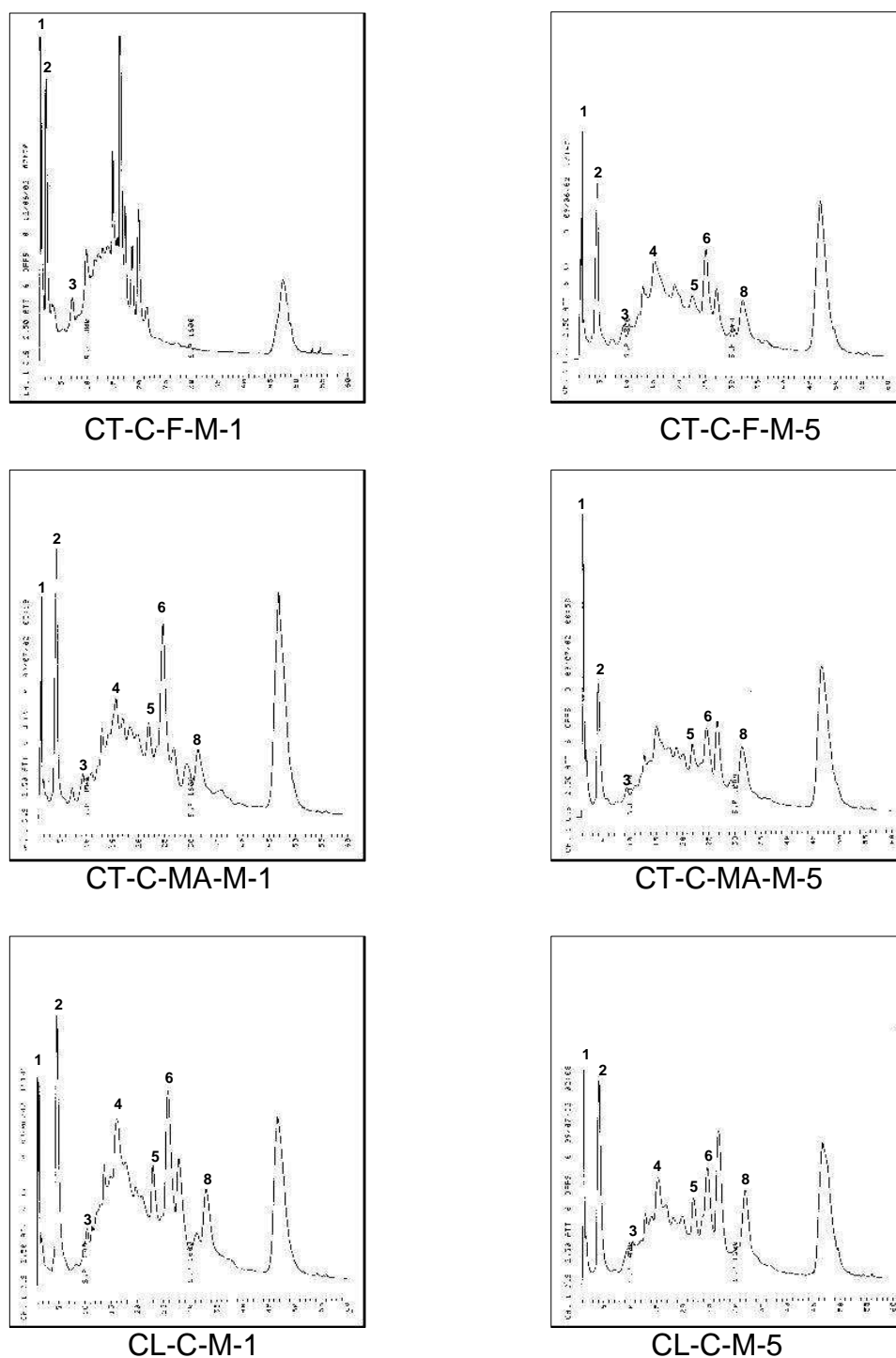


FIGURA 21c: Perfís cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras de *Cecropia glaziovii*, provenientes de cultivares femininos (CT-C-F-1, CT-C-F-5), masculinos (CT-C-MA-1, CT-C-MA-5), e clones (CL-C-1, CL-C-5) coletadas na época chuvosa. Sistema Cromatográfico 5. Detecção no UV - 280 nm.

CT: Cultivadas, F: Femininas, MA: Masculinas, CL: Clones, M: Folhas maduras, S: Época chuvosa.

1: ácido protocatéquico, 2: ácido clorogênico, 3: (+)-catequina, 4: (-)-epicatequina, 5: orientina, 6: isorientina, 8: isovitexina.

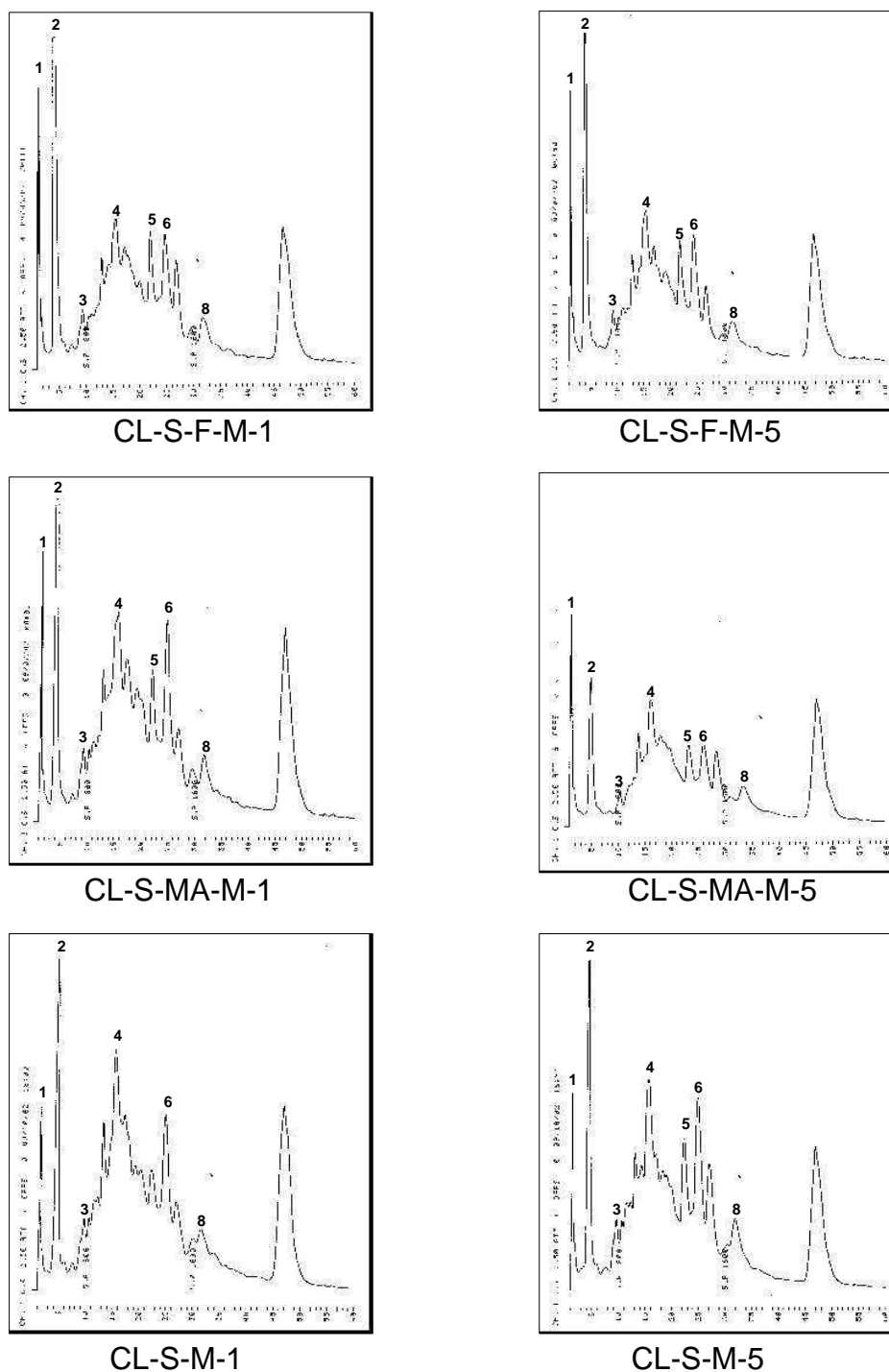


FIGURA 21d: Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras de *Cecropia glaziovii*, provenientes de cultivares femininos (CL-S-F-1, CL-S-F-5), masculinos (CL-S-MA-1, CL-S-MA-5), e clones (CL-S-1, CL-S-5) coletadas na época seca. Sistema Cromatográfico 5. Detecção no UV - 280 nm.

CT: Cultivadas, F: Femininas, MA: Masculinas, CL: Clones, M: Folhas maduras, S: Época chuvosa.

1: ácido protocatéquico, 2: ácido clorogênico, 3: (+)-catequina, 4: (-)-epicatequina, 5: orientina, 6: isoorientina, 8: isovitexina.

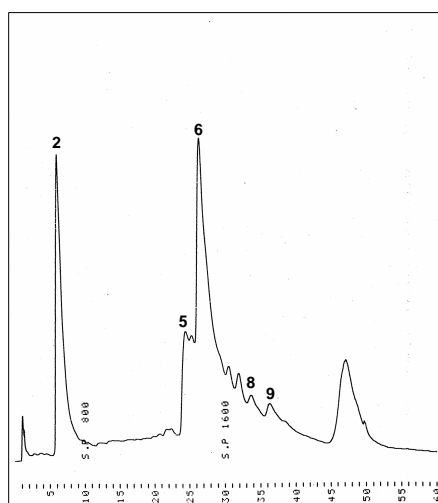
5.5.4. PERFÍS CROMATOGRÁFICOS A 350 nm

A complexidade e a falta de resolução adequada dos picos nos cromatogramas a 240 e 280 nm, onde o único composto quantificável seria o ácido clorogênico, tornou necessário avaliar outros comprimentos de onda. Por isso, visando o estabelecimento de condições cromatográficas que permitissem a quantificação de alguns metabólitos secundários presentes nas folhas de *C. glaziovii*, registraram-se perfís cromatográficos a 350 nm, empregando-se inicialmente, o Sistema Cromatográfico 5 (item 4.3.4.2.).

Escolheu-se 350 nm, uma vez que flavonas e flavonóis apresentam a banda I, referente ao cromóforo cinamoíla, na região de 320 – 380 nm. A posição e intensidade do λ_{max} depende da contribuição das estruturas de ressonância e, portanto, dos substituintes oxigenados presentes na molécula (JURD & HOROWITZ, 1957; MABRY, 1970). Considerando que 350 nm seria um λ mais específico para flavonas e flavonóis e que catequinas, proantocianidinas e o ácido protocatéuico, além de outros compostos presentes nos extratos não absorvem nesta região do ultravioleta – visível, seriam obtidos cromatogramas mais simples o que facilitaria o estabelecimento de condições próprias para a quantificação de alguns compostos (FIGURA 13).

O cromatograma da FIGURA 22 foi obtido a 350 nm, empregando-se a amostra SP-S-M-8 e as condições cromatográficas 5 (item 4.3.4.2.). Obteve-se um cromatograma que mantém as três regiões de picos, observadas a 240 e 280 nm, mas que, como esperado, é bastante simplificado. Considerando que este cromatograma apresenta picos com áreas da mesma ordem de magnitude àquelas observadas para os mesmos no cromatograma a 240 nm, empregando-se em ambos casos, a mesma forma de preparo da amostra e o mesmo volume de injeção, se pode inferir que estes compostos apresentam absorvidades (ϵ) da mesma ordem de magnitude a 240 nm e a 350 nm, o que pode ser explicado pela presença da banda II, no espectro UV-VIS de flavonas e flavonóis (240-280 nm) (MABRY, 1970).

Por co-injeção das substâncias de referência, identificaram-se alguns dos picos presentes no cromatograma. Além dos compostos já identificados a 280 nm, verificou-se a presença de isoquercetrina na amostra avaliada. No cromatograma a 350 nm destacam-se os picos correspondentes ao ácido clorogênico e à isoorientina. Na região entre 23 e 37 minutos, não foram identificados três picos, que por absorverem a 350 nm e apresentarem tempos de retenção semelhantes aos dos padrões identificados, podem corresponder, também, a glicosídeos de flavonóides. Os picos de substâncias mais polares, incluindo o do ácido protocatéquico, com área significativa a 280 nm, são fracos a 350 nm. O ácido protocatéquico, com máximos de absorção a 259 e 293 nm, apresenta absorção fraca a 350 nm, por isso não foi detectado nos cromatogramas das amostras registrado neste comprimento de onda, e foi necessário injetar a sua solução padrão a uma concentração alta, 15 mg/mL.



SP-S-M-8

FIGURA 22: Perfil cromatográfico, obtido por HPLC, para o extrato etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras de SP-S-8 a 350 nm.

Sistema Cromatográfico 5.

2: ácido clorogênico, 5: orientina, 6: isoorientina, 8: isovitexina, 9: isoquercetrina.

O cromatograma obtido a 350 nm, com um número menor de picos do que a 280 nm, mas com picos com tempos de retenção entre 20 e 40 min, correspondentes aos flavonóides glicosídicos, ainda mal resolvidos. Assim, realizaram-se vários ensaios visando obter-se um sistema gradiente no qual a resolução dos picos identificados fosse adequada para sua quantificação.

Após avaliar várias opções, chegou-se ao Sistema Cromatográfico 6 (item 4.3.4.2-B) que emprega soluções aquosa e metanólica de ácido acético a 2%, como componentes da fase móvel. Nestas condições injetaram-se, isoladamente, e em co-injeção, as soluções das substâncias de referência. Na TABELA 18 indicam-se as médias dos tempos de retenção obtidos para as substâncias de referência injetadas (n=3). Na FIGURA 23 apresentam-se os cromatogramas das substâncias de referência e nas FIGURAS 24a e 24b, os cromatogramas para as co-injeções.

TABELA 18 – TEMPOS DE RETENÇÃO DOS PADRÕES - SISTEMA CROMATOGRÁFICO 6 – DETECÇÃO UV-VIS - 350 nm

PADRÃO	TEMPO DE RETENÇÃO (min ± IC_{95%}) n=3
Ácido protocatéquico	2,9 ± 0,2
Ácido clorogênico	7,3 ± 0,2
Orientina	24,8 ± 0,3
Isoorientina	27,6 ± 0,4
Vitexina	28,3 ± 0,4
Isovitexina	33,9 ± 0,5
Rutina	35,6 ± 0,6
Isoquercetrina	36,8 ± 0,5
Quercetina	51,2 ± 0,3
Canferol	52,3 ± 0,2

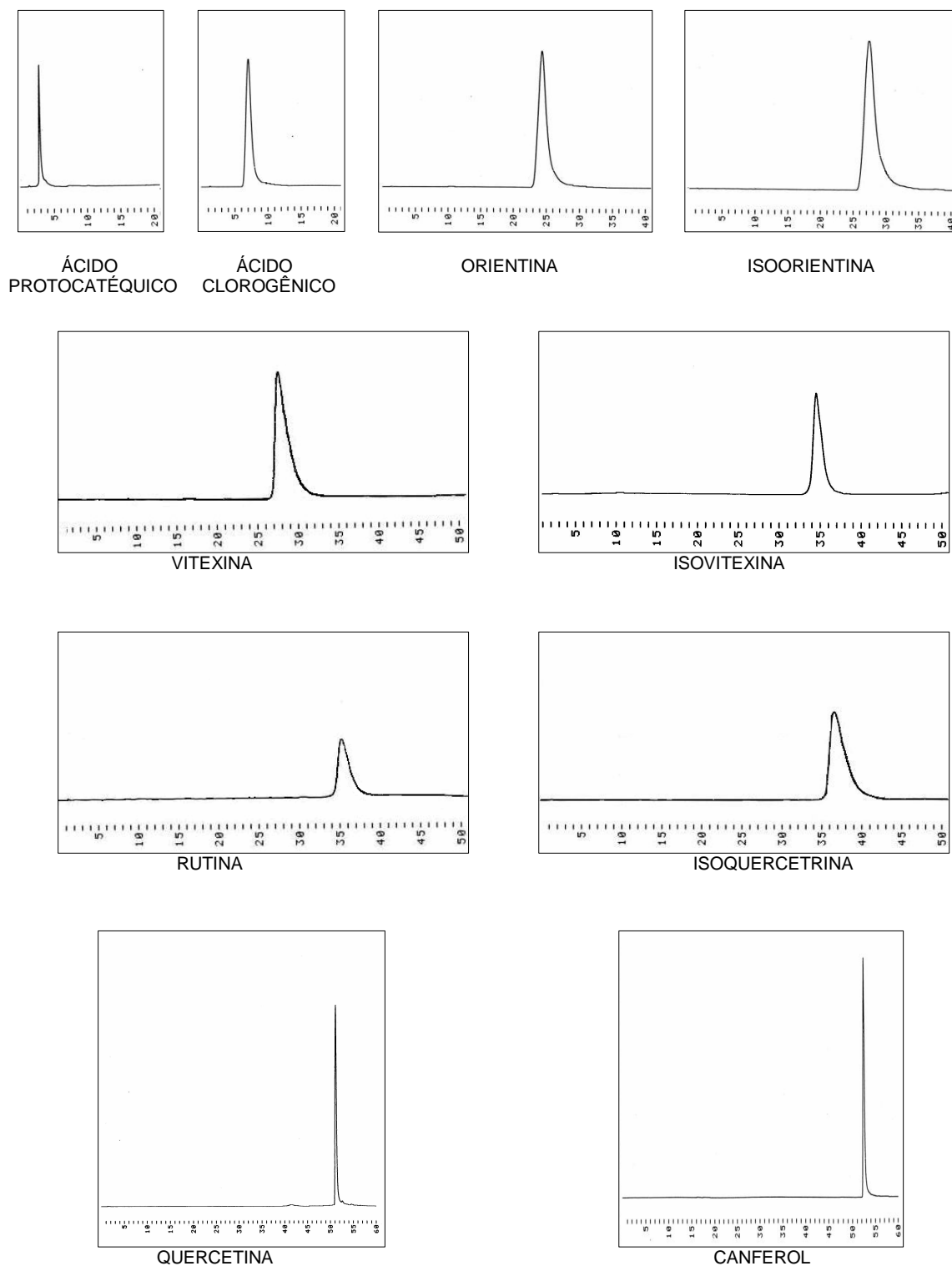
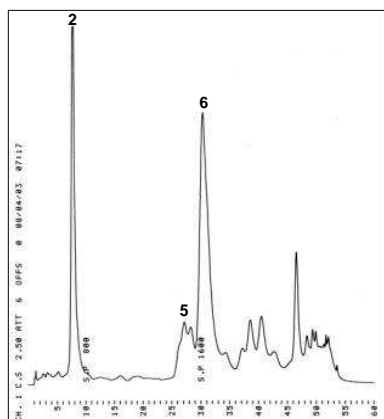
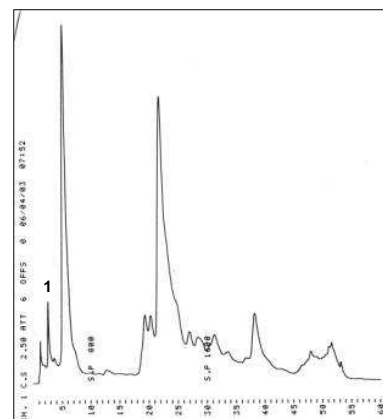


FIGURA 23. Cromatogramas obtidos por HPLC para as substâncias de referência.

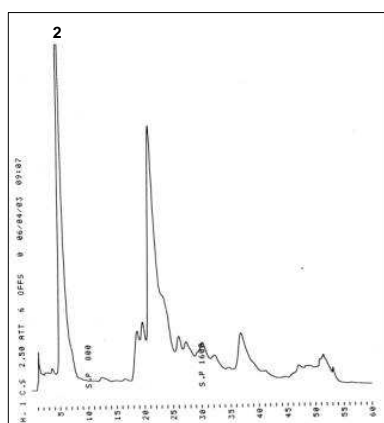
Sistema Cromatográfico 6 – Detecção UV-Vis 350 nm.



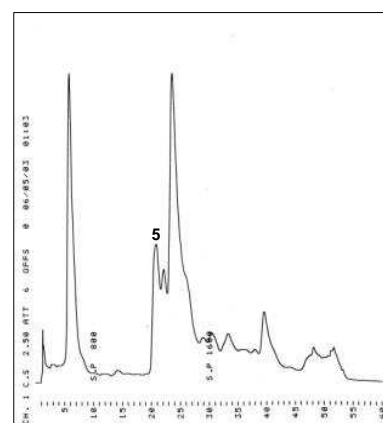
SP-S-M-8



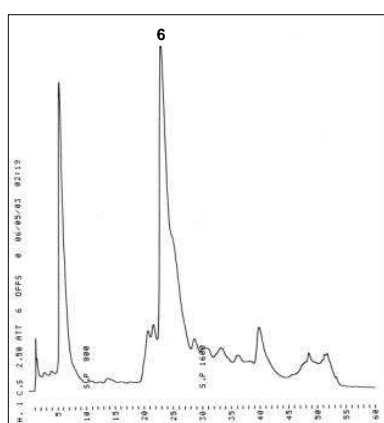
SP-S-M-8 + ÁCIDO PROTOCATÉQUICO



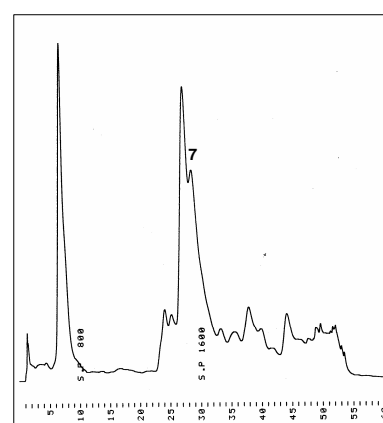
SP-S-M-8 + ÁCIDO CLOROGÊNICO



SP-S-M-8 + ORIENTINA

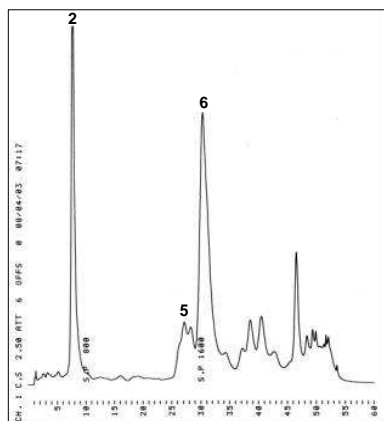


SP-S-M-8 + ISOORIENTINA

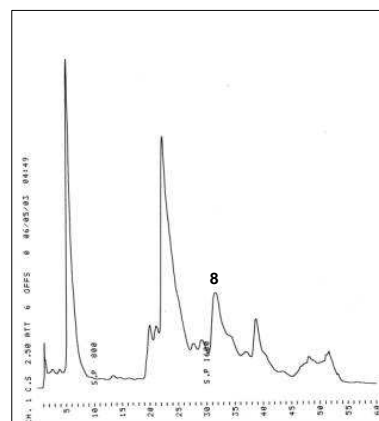


SP-S-M-8 + VITEXINA

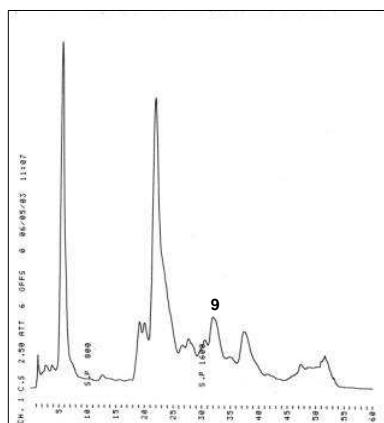
FIGURA 24a. Cromatogramas, obtidos por HPLC, para as co-injeções com as substâncias de referência: ácido protocatéutico (1), ácido clorogênico (2), orientina (5), isoorientina (6) e vitexina (7)
Sistema Cromatográfico 6 – Detecção UV-Vis 350 nm. Amostra: SP-S-8-M-8.



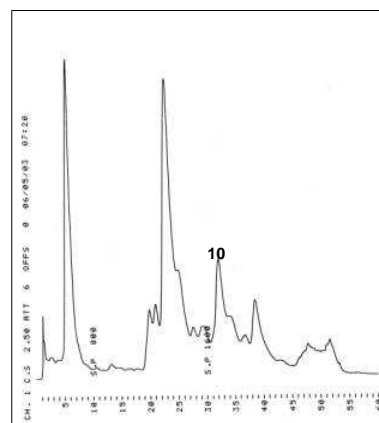
SP-S-M-8



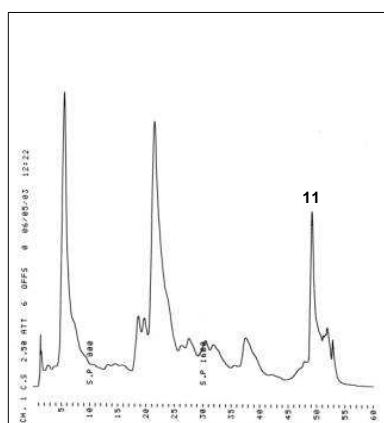
SP-S-M-8+ ISOVITEXINA



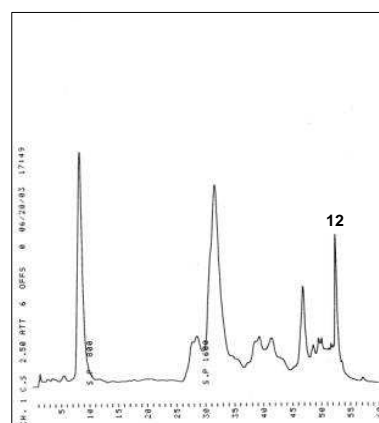
SP-S-M-8+ RUTINA



SP-S-M-8 + ISOQUERCETRINA



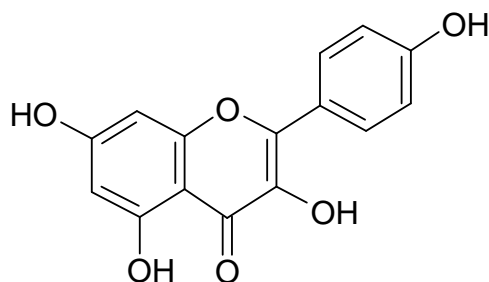
SP-S-M-8 + QUERCETINA



SP-S-M-8 + CANFEROL

FIGURA 24b. Cromatogramas, obtidos por HPLC, para as co-injeções com as substâncias de referência: isovitexina (8), rutina (9), isoquercetrina (10), Quercetina (11) e canferol (12).

Sistema Cromatográfico 6 – Detecção UV-Vis 350 nm. Amostra: SP-S-8-M-8.



(38) Canferol

Utilizando-se o Sistema Cromatográfico 6 (item 4.3.4.2-B), obtiveram-se perfís com o pico do ácido clorogênico bem definido e resolvido. Apesar dos muitos ensaios, não foi possível obter uma completa separação dos picos correspondentes aos glicosídeos de flavonóides, sendo que o melhor resultado foi obtido nas condições do Sistema Cromatográfico 6. Da mesma forma que nos sistemas cromatográficos anteriores, os picos correspondentes aos glicosídeos de flavonóides (TR: 20 - 40 min.) apresentam assimetria e são bastante largos, em contraposição àqueles obtidos para as agliconas (TR: 50 – 55 min.) que são finos e simétricos. Neste caso, também, não foi possível separar adequadamente os picos dos compostos menos polares, por isso, a partir dos 45 minutos, aumenta-se rapidamente a quantidade de metanol na fase móvel, visando reduzir o tempo de cada corrida.

Comparando-se os cromatogramas dos extratos metanólico e hidroetanólico (7:3) (FIGURA 25) e as áreas para o ácido clorogênico, orientina e isoorientina (TABELA 19), pode-se constatar que a extração metanólica, a frio, mediante ultrassom, não é completa, razão pela qual continuou-se utilizando etanol-água (7:3) como solvente de extração. Os perfís obtidos para o extrato hidroetanólico de SP-S-8-M dissolvido em metanol e em metanol-água (1:1) são semelhantes (FIGURA 25), o que indica que ambos solventes poderiam ser empregados nesta etapa do ensaio. Considerando-se as áreas ligeiramente maiores para o ensaio que utilizou solução hidrometanólica e o aspecto das soluções, verifica-se que as clorofilas são menos solúveis em metanol-água (1:1) que em metanol, optando-se

por re-dissolver o extrato em metanol:água (1:1), antes da sua injeção na coluna. Para maior proteção da coluna, filtraram-se as soluções por um cartucho RP-18, para remover os compostos de baixa polaridade, que pudessem ficar retidos na coluna, entre eles as clorofilas.

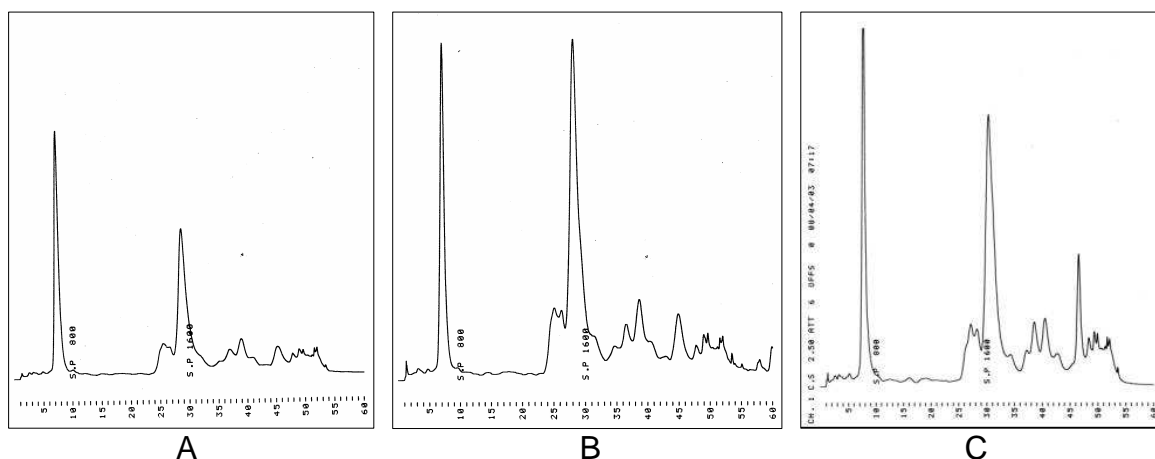


FIGURA 25. Cromatogramas obtidos, por HPLC, variando os solventes de extração e dissolução final das amostras. Sistema Cromatográfico 6 – Detecção UV-Vis 350 nm.

- A) Solvente de extração: metanol. Extrato re-dissolvido em metanol-água 1:1
 B) Solvente de extração: etanol-água (7:3). Extrato re-dissolvido em metanol-água 1:1
 C) Solvente de extração: etanol-água (7:3). Extrato re-dissolvido em metanol
 Amostra: Folhas maduras de *Cecropia glaziovii*, SP-S-M-8

TABELA 19. AVALIAÇÃO DO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO E DISSOLUÇÃO NA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO POR HPLC: ÁREAS DOS PICOS DE ÁCIDO CLOGÊNICO, ORIENTINA E ISOORIENTINA

SUBSTÂNCIA	ÁREAS		
	TESTE A	TESTE B	TESTE C
Ácido clorogênico	1925176	2979166	2712542
Orientina	427053	926481	909674
Isoorientina	2674542	8810129	6016732

- A) Solvente de extração: metanol. Extrato re-dissolvido em metanol-água 1:1
 B) Solvente de extração: etanol-água (7:3). Extrato re-dissolvido em metanol-água 1:1
 C) Solvente de extração: etanol-água (7:3). Extrato re-dissolvido em metanol
 Amostra: Folhas maduras de *Cecropia glaziovii*, SP-S-M-8
 Sistema Cromatográfico 6 – Detecção UV-Vis 350 nm.

Tendo estabelecido as condições de extração e preparação da amostra, além do Sistema Cromatográfico, obtiveram-se perfís a 350 nm, das mesmas amostras de folhas maduras selecionadas para os perfís a 240 e 280 nm, incluindo adicionalmente, as amostras SP-S-1-M, SP-C-E-M e a do pecíolo de SP-S-8-M. Os perfís cromatográficos para as folhas maduras das 24 amostras selecionadas estão mostrados nas FIGURAS 26a - 26d.

De acordo com os cromatogramas obtidos para as co-injeções e para os perfís cromatográficos a 350 nm, pode-se identificar a presença, nas folhas de *C. glaziovii*, de ácido clorogênico, orientina, e isoorientina, em todas as amostras, e a presença de isovitexina, em algumas delas. Com os resultados obtidos não é possível estabelecer com segurança presença de rutina e isoquercetrina. Não foi possível detectar, a 350 nm, a presença do ácido protocatéquico nos cromatogramas obtidos, uma vez que o mesmo não apresenta absorção a 350 nm.

Tal como esperado, pelo baixo teor de flavonóides, o cromatograma da amostra de pecíolo (SP-S-8-PECIOLO-M), apresenta picos muito pequenos. Ainda assim, este perfil apresenta as mesmas características, isto é, a mesma distribuição de picos, que as amostras de lâmina foliar (FIGURA 26b).

Obtiveram-se, adicionalmente, perfís a 350 nm, empregando-se o Sistema Cromatográfico 6 (4.3.4.2-B), de extratos hidroetanólicos de amostras de folhas novas. Selecionaram-se, para este fim, as amostras que tinham seu par no grupo de amostras de folhas maduras já analisadas. Os respectivos perfís, mostrados nas FIGURAS 27a - 27c, apresentam as mesmas características dos perfís obtidos para os extratos de folhas maduras. Observa-se, em vários cromatogramas de amostras de folhas novas, que o pico correspondente ao ácido clorogênico tem áreas significativamente maiores que as dos cromatogramas das respectivas amostras de folhas maduras, o que sugere que este composto está em maior quantidade nas folhas novas.

Na TABELA 20 incluem-se algumas características observadas para os cromatogramas, obtidos a 350 nm, de folhas maduras (lâmina foliar e pecíolo) e lâminas foliares de folhas novas. Da mesma forma, na TABELA 21, se comparam algumas características dos cromatogramas a 280 e 350 nm, para as amostras de árvores nativas, cultivadas e clones.

TABELA 20. CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS NOS CROMATOGRAMAS DE FOLHAS NOVAS E MADURAS DE *CECROPIA GLAZIOVII*, OBTIDOS POR HPLC A 350 nm

CARACTERÍSTICAS	LÂMINAS FOLIARES		PECÍOLOS
	FOLHAS MADURAS	FOLHAS NOVAS	FOLHAS MADURAS
Áreas dos picos	De acordo com o teor de flavonóides totais		
Ácido clorogênico	Presente	Presente (maiores áreas que nas folhas maduras)	Presente (área muito pequena)
Flavonóides glicosídicos	Presentes	Presentes (áreas semelhantes ou maiores que nas folhas maduras)	Presentes (área muito pequena)
Agliconas de flavonóides	Presentes	Presentes (áreas semelhantes as das folhas maduras)	Presentes (área muito pequena)
Resolução dos picos	Semelhante		
Perfis dos cromatogramas	Semelhantes		

TABELA 21. CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS NOS CROMATOGRAMAS DE LÂMINAS FOLIARES DE FOLHAS DE ÁRVORES NATIVAS, CULTIVADAS E CLONES DE *CECROPIA GLAZIOVII*, OBTIDOS, POR HPLC, A 280 E 350 nm

CARACTERÍSTICAS	ÁRVORES		
	NATIVAS	CULTIVADAS	CLONES
Áreas dos picos	Muito variável	Menos variável	Menos variável
Ácido clorogênico	Presente (área variável segundo amostra)	Presente (áreas grandes, maior uniformidade que entre as amostras nativas)	
Flavonóides glicosídicos	Presentes	Presentes (áreas com maior uniformidade que entre as amostras nativas)	
Agliconas de flavonóides	Presentes (áreas pequenas médias e grandes)	Presentes (áreas pequenas, médias e grandes)	Presentes (áreas médias e grandes)
Resolução dos picos	Semelhante		
Perfis dos cromatogramas	Semelhantes		

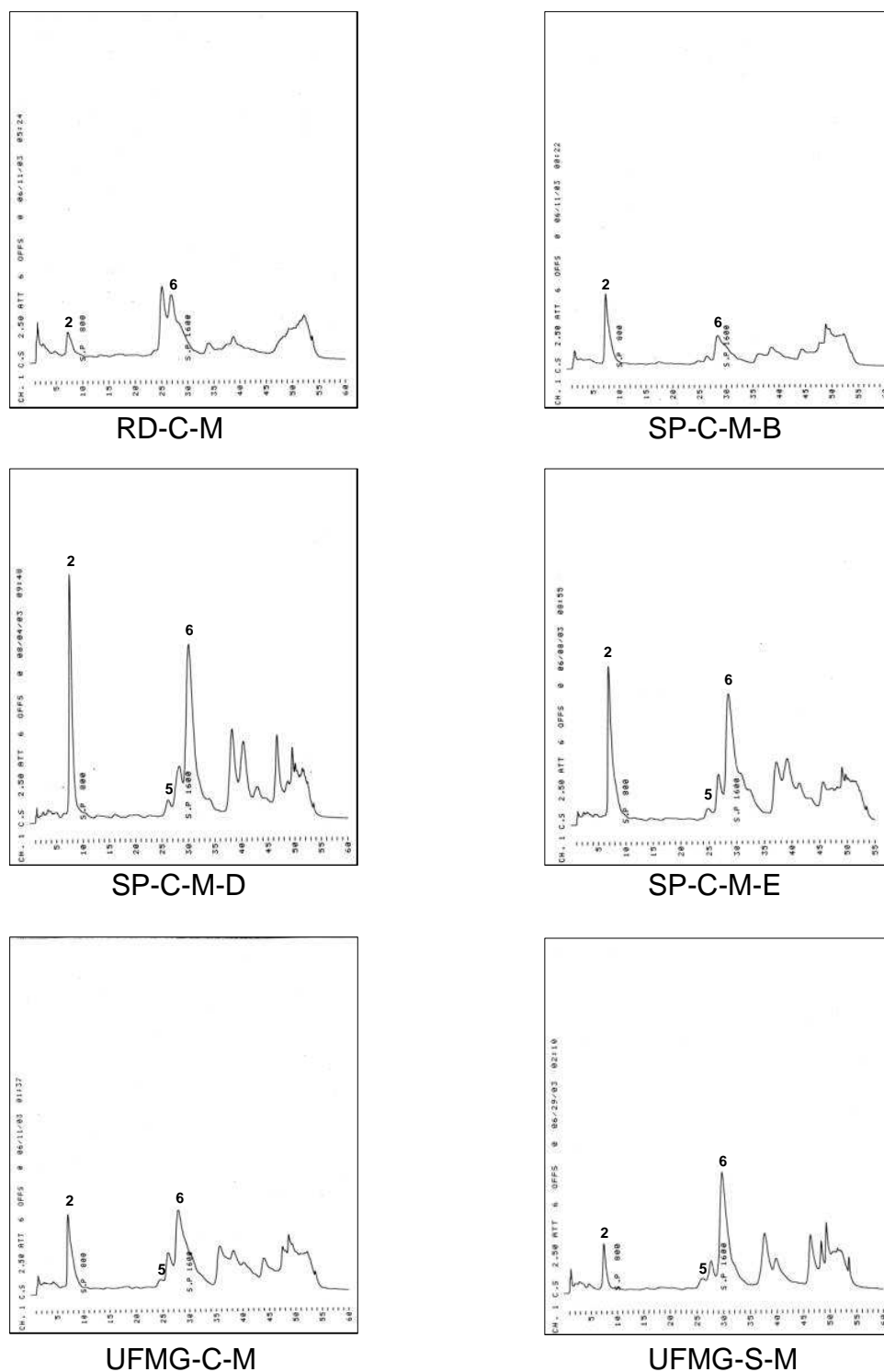


FIGURA 26a. Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de pó de lâminas foliares de folhas maduras das amostras provenientes das árvores nativas de *Cecropia glaziovii*: RD-C, SP-C-B, SP-C-D, SP-C-E, UFMG-C e UFMG-S. Sistema Cromatográfico 6 – Detecção UV-Vis 350 nm.

RD: Parque Estadual do Rio Doce, SP: Serra da Piedade. UFMG: *Campus da UFMG*. S: Época seca. M: Folhas maduras. 2: ácido clorogênico, 5: orientina, 6: isoorientina.

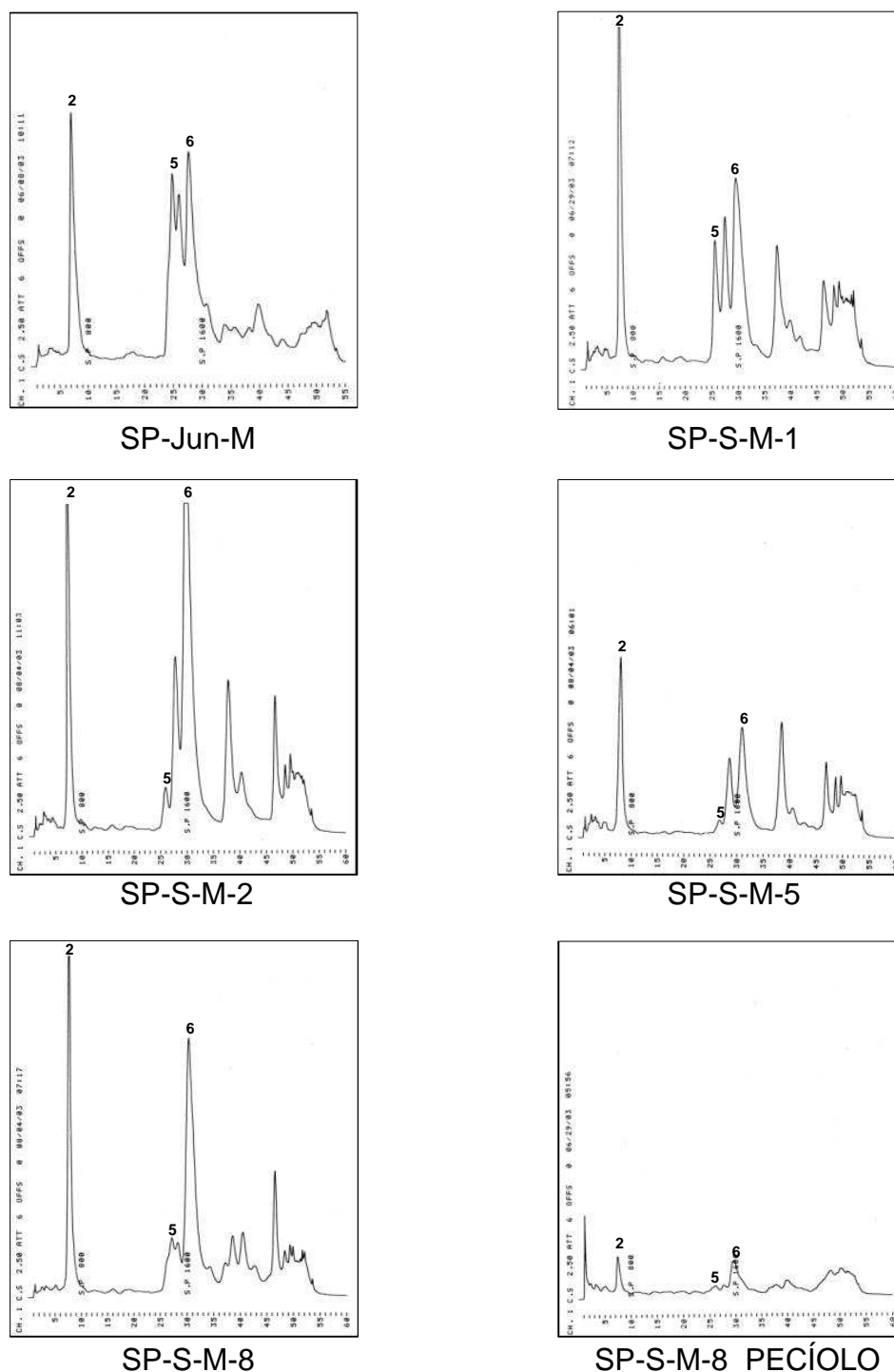


FIGURA 26b. Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de pó de lâminas foliares de folhas maduras das amostras provenientes das árvores nativas de *Cecropia glaziovii*: SP-Jun, SP-S-1, SP-S-2, SP-S-5, SP-S-8, e de pecíolos de SP-S-M-8. Sistema Cromatográfico 6 – Detecção UV-Vis 350 nm.

SP: Serra da Piedade. S: Época seca. M: Folhas maduras.

2: ácido clorogênico, 5: orientina, 6: isoorientina.

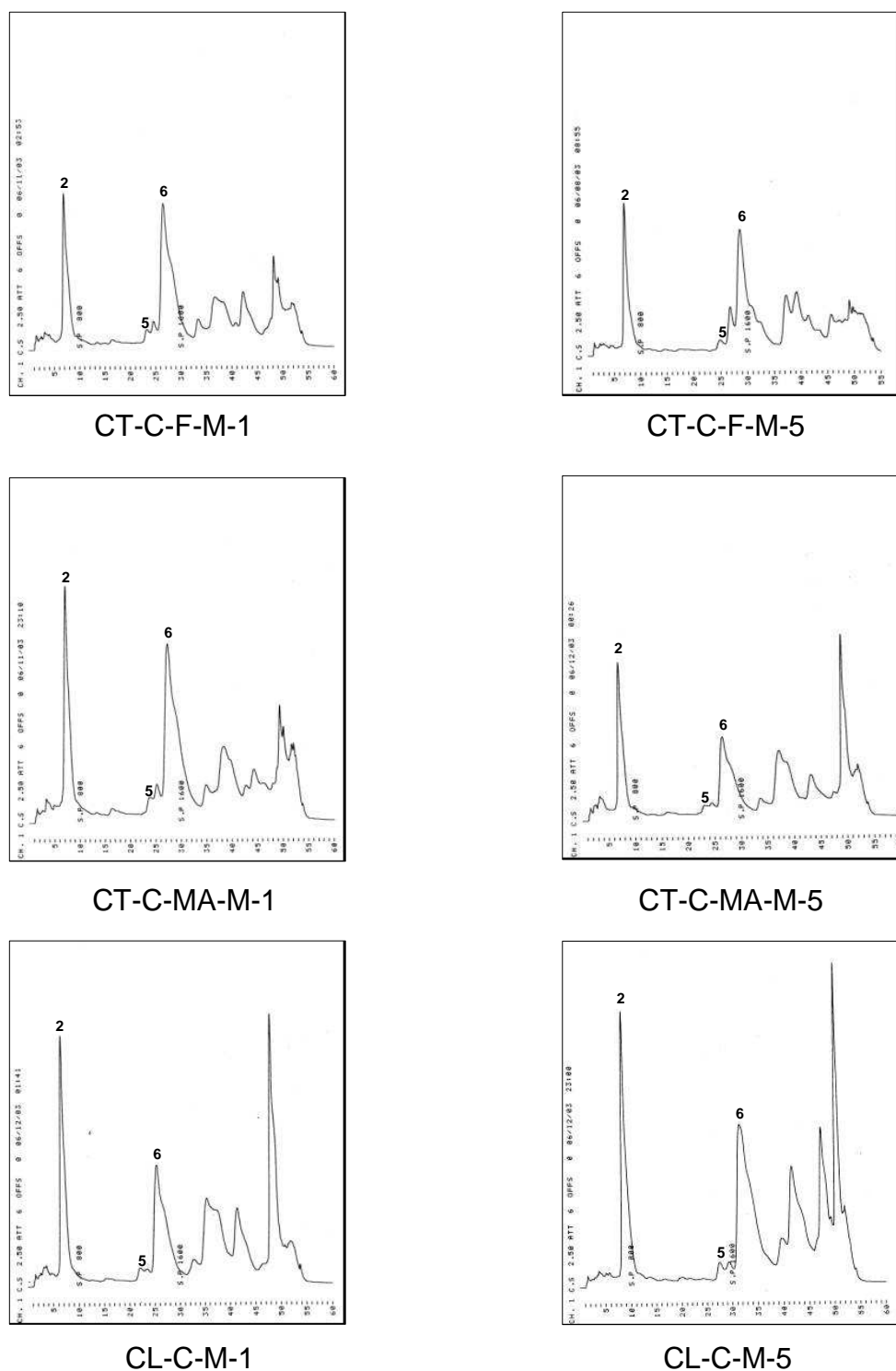


FIGURA 26c: Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras de *Cecropia glaziovii*, provenientes de cultivares femininos (CT-C-F-1, CT-C-F-5), masculinos (CT-C-MA-1, CT-C-MA-5), e clones (CL-C-1, CL-C-5) coletadas na época chuvosa. Sistema Cromatográfico 6. Detecção no UV-Vis- 350 nm. CT: Cultivadas, F: Femininas, MA: Masculinas, CL: Clones, M: Folhas maduras, S: Época chuvosa. 2: ácido clorogênico, 5: orientina, 6: isoorientina.

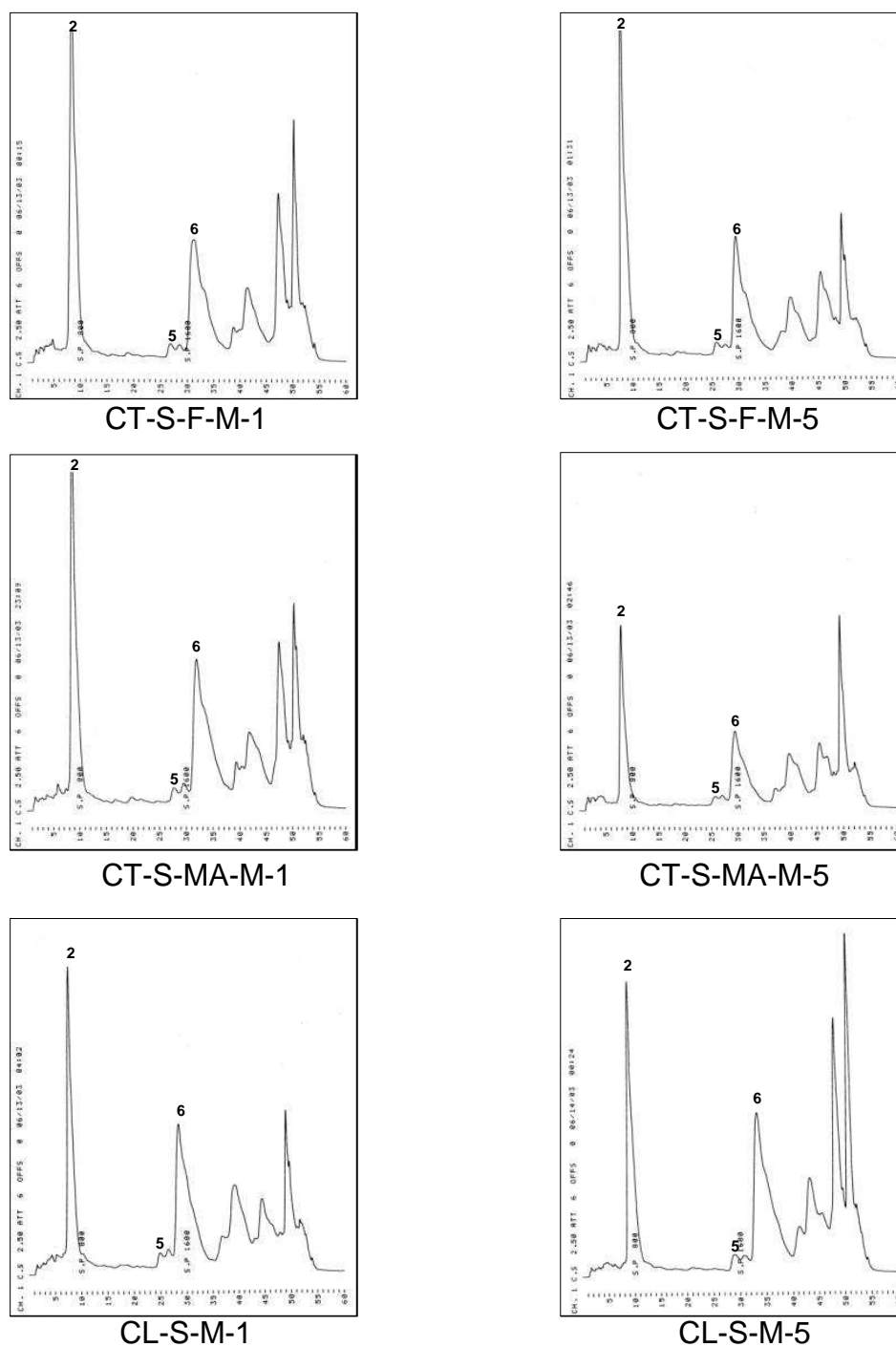


FIGURA 26d: Perfís cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras de *Cecropia glaziovii*, provenientes de cultivares femininos (CL-S-F-1, CL-S-F-5), masculinos (CL-S-MA-1, CL-S-MA-5), e clones (CL-S-1, CL-S-5) coletadas na época seca. Sistema Cromatográfico 6. Detecção no UV-Vis 350 nm.

CT: Cultivadas, F: Femininas, MA: Masculinas, CL: Clones, M: Folhas maduras, S: Época chuvosa. 2: ácido clorogênico, 5: orientina, 6: isoorientina.

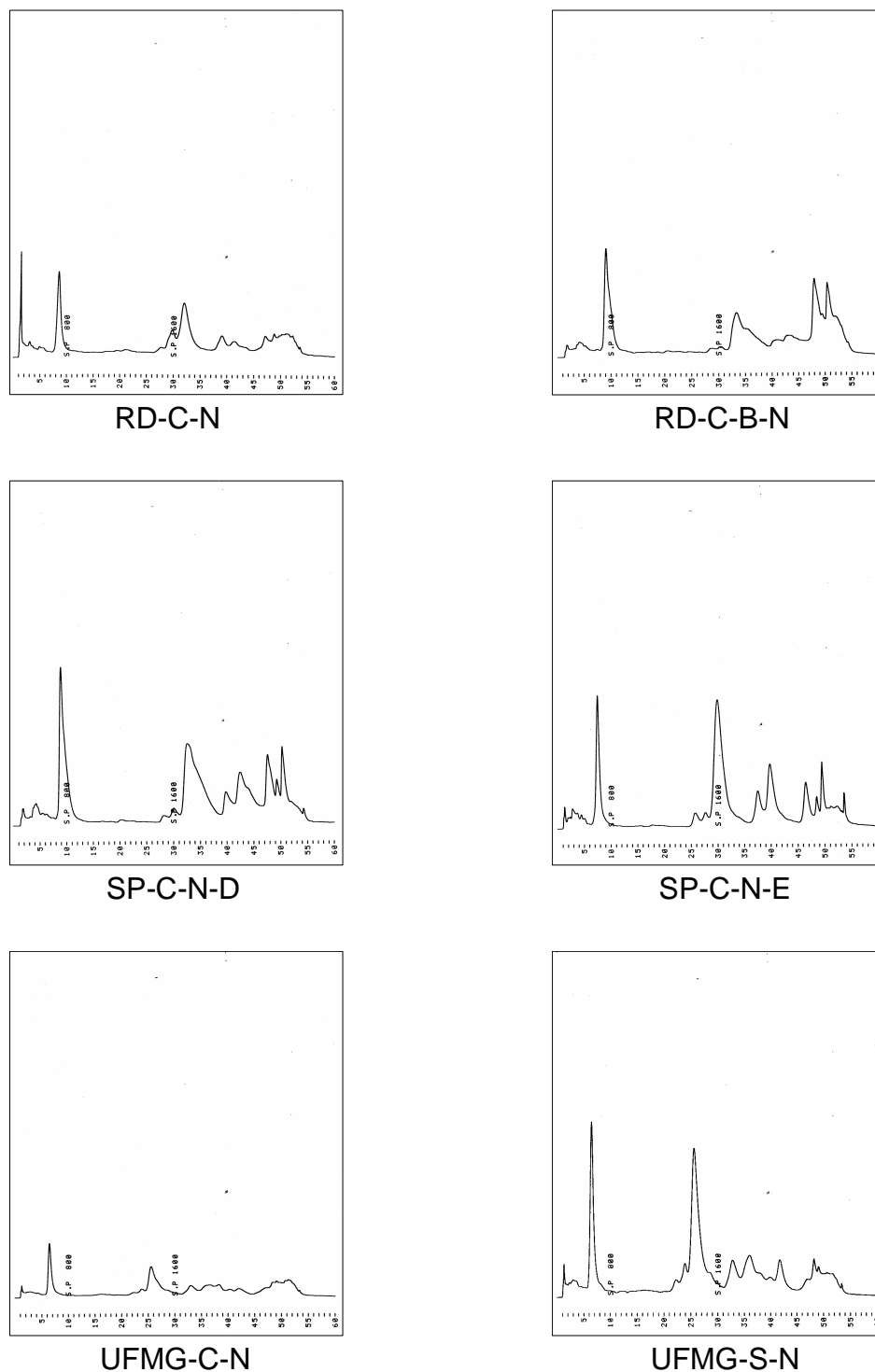


FIGURA 27a. Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de pó de lâminas foliares de folhas novas das amostras provenientes das árvores nativas de *Cecropia glaziovii*: RD-C, SP-C-B, SP-C-D, SP-C-E, UFMG-C e UFMG-S. Sistema Cromatográfico 6 – Detecção UV-Vis 350 nm.

RD: Parque Estadual do Rio Doce, SP: Serra da Piedade. UFMG: Campus da UFMG. S: Época seca. M: Folhas maduras

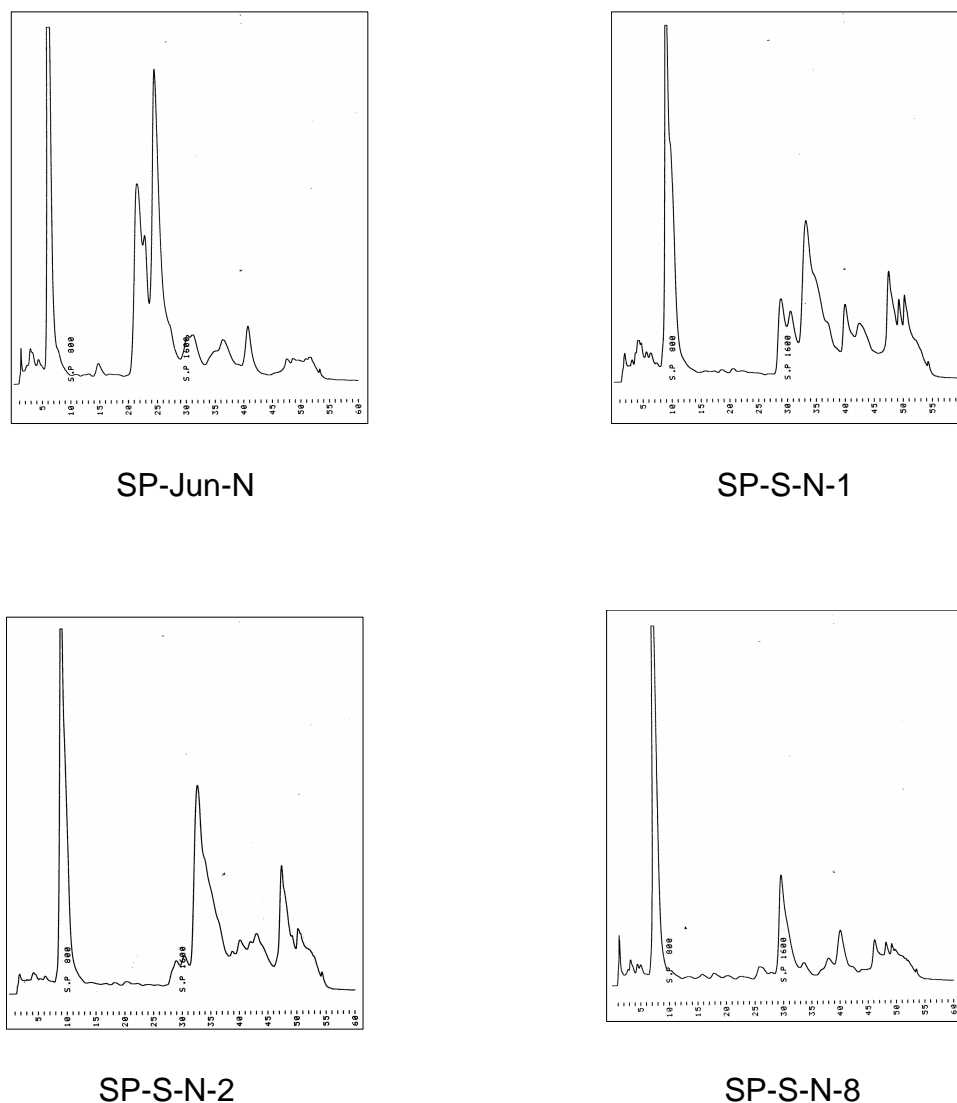


FIGURA 27b. Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de pó de lâminas foliares de folhas novas das amostras provenientes das árvores nativas de *Cecropia glaziovii*: SP-Jun, SP-S-1, SP-S-2, SP-S-8. Sistema Cromatográfico 6 – Detecção UV-Vis 350 nm.

SP: Serra da Piedade. S: Época seca. M: Folhas maduras.

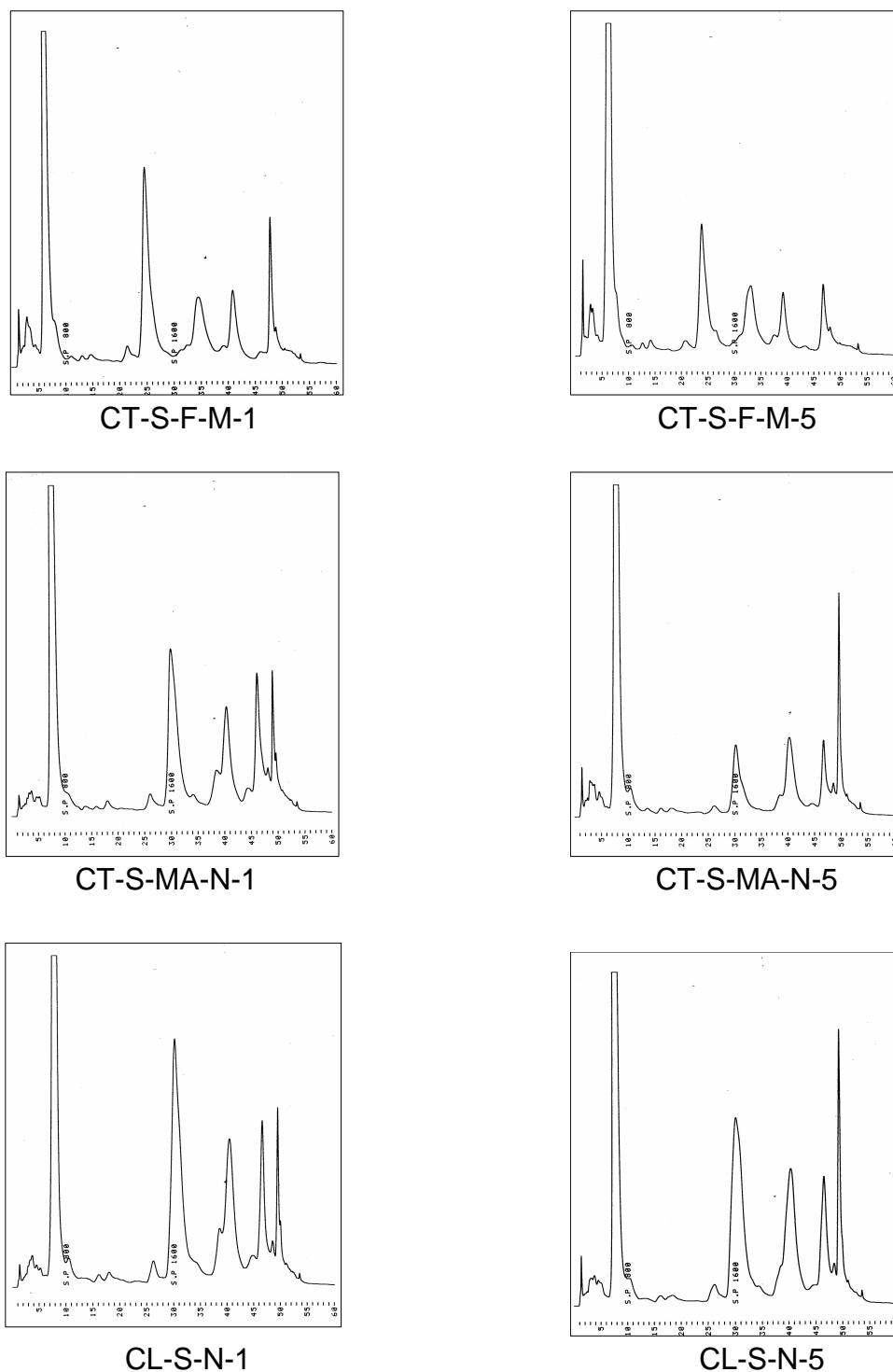


FIGURA 27c: Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, para extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas novas de *Cecropia glaziovii*, provenientes de cultivares femininos (CL-S-F-1, CL-S-F-5), masculinos (CL-S-MA-1, CL-S-MA-5), e clones (CL-S-1, CL-S-5) coletadas na época seca. Sistema Cromatográfico 6. Detecção no UV-Vis 350 nm.

CT: Cultivadas, F: Femininas, MA: Masculinas, CL: Clones, M: Folhas maduras, S: Época chuvosa.

5.5.5. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ORIENTINA E ISOORIENTINA POR HPLC

Ácido clorogênico, orientina e isoorientina foram os metabólitos secundários selecionados para quantificação por estarem presentes em todas as amostras de *C. glaziovii* analisadas. Além disso, os picos correspondentes a estas substâncias apresentavam resolução adequada para a quantificação, nas condições cromatográficas estabelecidas: sistema cromatográfico 6 (item 4.3.4.2.- B) e detecção a 350 nm. As amostras empregadas na quantificação foram as mesmas para as quais se obtiveram os perfis cromatográficos por HPLC. Estas apresentaram valores extremos (inferiores e superiores) no teor de flavonóides, determinados por espectrofotometria e, portanto, deveriam representar a variabilidade da espécie.

5.5.5.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Na TABELA 22 estão resumidos os parâmetros das curvas de calibração utilizadas, calculadas pelo programa Excel[®], ajustando a passagem da reta pela origem. Na FIGURA 28 estão os gráficos correspondentes.

TABELA 22. PARÂMETROS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO POR HPLC – RETAS AJUSTADAS PARA PASSAR PELA ORIGEM

PARÂMETRO	PADRÃO		
	ÁCIDO CLOROGÊNICO	ORIENTINA	ISOORIENTINA
Quantidade de padrão (µg)	0,8 a 16,0	0,2 a 3,6	0,8 a 16,0
Inclinação	535034,2 ± 10077,9	496620,8 ± 4566,3	782823,2 ± 8016,6
Coeficiente de regressão linear (r)	0,996126	0,999219	0,998864
Coeficiente de determinação (r ²)	0,992267	0,998438	0,997729

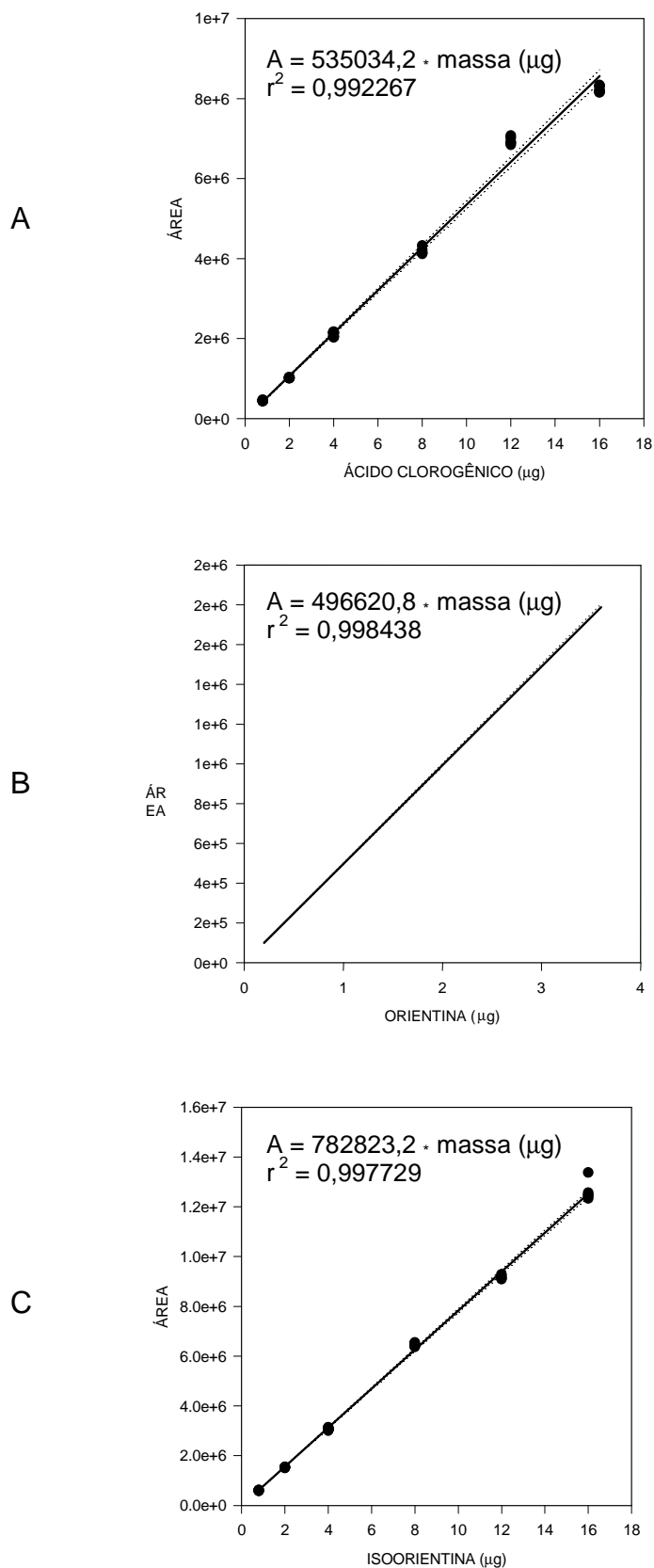


FIGURA 28. Curvas de calibração empregadas na quantificação de ácido clorogênico (A), orientina (B) e isoorientina (C) por HPLC (n = 5).

A. LINEARIDADE

▪ Validade da regressão linear

Na TABELA 23, resumem-se os dados do teste de ANOVA para a regressão linear com $\alpha=0,05$, das três curvas de calibração elaboradas. Observa-se que, para as três curvas de calibração obtidas, o valor de F calculado é muito maior que o valor crítico indicando que estas curvas seguem um comportamento linear, no intervalo de concentrações avaliado.

TABELA 23. RESULTADOS DE ANOVA PARA A REGRESSÃO LINEAR DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO ELABORADAS ($\alpha = 0,05$)

ÁCIDO CLOROGÊNICO					
	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	Valor crítico de F
Regressão	1	2,69 E+14	2,69 E+14	4,36 E+03	1,22 E-36
Resíduos	34	2,09 E+12	6,16 E+10		
Total	35	2,71 E+14			

ORIENTINA					
	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	Valor crítico de F
Regressão	1	1,16 E+13	1,16 E+13	2,17 E+04	4,18 E-48
Resíduos	34	1,82 E+10	5,34 E+08		
Total	35	1,16 E+13			

ISOORIENTINA					
	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	Valor crítico de F
Regressão	1	5,82 E+14	5,82 E+14	1,49 E+04	2,02 E-45
Resíduos	34	1,32 E+12	3,90 E+10		
Total	35	5,83 E+14			

▪ Passagem das retas pela origem

Os intervalos de confiança para o intercepto com a origem incluíam o zero (TABELA 24). Assim, para as curvas definitivas ajustou-se a passagem pela origem. A inclusão do zero nos intervalos de confiança para os interceptos com a origem indica que não foi detectado nenhum deslocamento da reta, e que o

desvio observado pode ser atribuídos ao erro aleatório (QUATTROCCHI, ABELAIRA & LABA 1992).

TABELA 24. INTERCEPTOS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO ANTES DE SER AJUSTADA A PASSAGEM PELA ORIGEM

PARÂMETRO	SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA		
	ÁCIDO CLOROGÊNICO	ORIENTINA	ISOORIENTINA
Intercepto (μg)	1967,0 \pm 141423,2 (-139456,2 a 143390,2)	10595,4 \pm 11381,8 (-786,4 a 21977,2)	- 47323,8 \pm 111243,8 (-158567,6 a 63920,0)

▪ **Inclinação da reta**

Para as três curvas de calibração elaboradas obtiveram-se valores de inclinação da reta significativamente maiores que zero, uma vez que os intervalos de confiança calculados não incluem o zero. Este resultado indica que há uma correlação entre os valores de concentração e os valores de área obtidos para cada uma das curvas de calibração elaboradas.

A maior sensibilidade é observada para a isoorientina, cuja curva de calibração apresentou o maior valor de inclinação (774806,6). Já o ácido clorogênico e a orientina, com sensibilidades da mesma ordem de magnitude, conduziram a retas com valores de inclinação próximos a 500000.

▪ **Teste do coeficiente de correlação linear.**

Os resultados dos testes dos coeficientes de correlação linear (TABELA 25), confirmam que as três curvas de calibração elaboradas seguem um comportamento linear, pelo menos nos intervalos de concentração avaliados, uma vez que para as três curvas o valor de t calculado no teste é muito maior que o valor de t tabelado, rejeitando-se, assim, a hipótese nula de não correlação entre x e y.

TABELA 25. RESULTADOS DO TESTE PARA OS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO LINEAR DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO ELABORADAS

PARÂMETRO	PADRÃO		
	ÁCIDO CLOROGÊNICO	ORIENTINA	ISOORIENTINA
Coeficiente de correlação linear (r)	0,996126	0,999219	0,998864
t calculado ($\alpha = 0,05$)	65,07	145,24	120,40
t tabela ($\alpha = 0,05$, gl= 33)	2,03	2,03	2,03

B. PRECISÃO

▪ Repetibilidade

Considerando que foram injetados volumes crescentes de uma mesma solução padrão, a precisão calculada pela repetibilidade corresponde à precisão do sistema. Os valores dos coeficientes de variação (CV) encontrados foram menores que 3,5%, em todos os casos, e menores que 2,5% na maioria deles (TABELA 26).

Na Farmacopéia dos Estados Unidos o coeficiente de variação máximo permitido, na maioria das monografias, é 2,0%, mas em algumas delas se permitem valores maiores, por exemplo 2,5% para alprostadil, e 3,0% para alopurinol, dexamentasona e fosfato de primaquina. Esta farmacopéia indica que para este cálculo devem ser feitas cinco injeções da substância padrão, quando o CV máximo é 2%, e seis, quando maior que 2%.

Análises empregando concentrações diluídas de analito podem conduzir a maior variação nas respostas, e, nestes casos, pode-se aceitar coeficientes de variação maiores do que aqueles convencionalmente utilizados. Nesse sentido, QUATTROCCHI, ABELAIRA & LABA (1992) relatam a relação:

$$CV(\%) = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

onde C é a concentração do analito em g/mL.

Os coeficientes de variação máximos aceitáveis, calculados para as concentrações trabalhadas, e mostrados na TABELA 27, foram muito maiores que aqueles obtidos com os dados das curvas de calibração.

TABELA 26. MÉDIAS E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO CALCULADOS PARA AS ÁREAS OBTIDAS DURANTE A ELABORAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO.

SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	VOLUME DE INJEÇÃO (µL)	MASSA (µg)	n	MÉDIA DAS ÁREAS	CV (%)
Ácido clorogênico	0,4	2	0,8	5	447790,4	3,20
		5	2,0	5	1016839,4	0,89
		10	4,0	10	2104697,3	2,55
		20	8,0	5	4189935,2	1,96
		30	12,0	5	6945578,6	1,35
		40	16,0	5	8235224,4	0,98
Orientina	0,04	5	0,2	5	103019,2	2,27
		10	0,4	10	208289,2	2,98
		20	0,8	5	419850,6	1,43
	0,12	10	1,2	5	582433,2	2,37
		20	2,4	5	1205227,2	2,55
		30	3,6	5	1776087,6	2,37
Isoorientina	0,4	2	0,8	5	596268,4	2,51
		5	2,0	5	1522480,8	1,08
		10	4,0	10	3064472,9	1,33
		20	8,0	5	6458759,0	1,05
		30	12,0	5	9170569,0	0,84
		40	16,0	5	12634870,8	3,32

TABELA 27. COEFICIENTES DE VARIAÇÃO MÁXIMOS ACEITÁVEIS CALCULADOS PARA AS CONCENTRAÇÕES DE ANALITO UTILIZADAS

SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	CV (%) MÁXIMO
Ácido clorogênico	0,4	6,5
Orientina	0,04	9,2
	0,12	7,8
Isoorientina	0,4	6,5

▪ PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Os resultados das concentrações de ácido clorogênico, orientina e isoorientina presentes na amostra SP-S-8-M, preparada e injetada em cinco dias diferentes, são apresentados na TABELA 28, onde se pode verificar que o coeficiente de variação calculado é inferior a 1,5 para a isoorientina, e de 5,6 e 5,8 para o ácido clorogênico e a orientina, respectivamente.

TABELA 28. AVALIAÇÃO DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA O ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO EM CINCO DIAS DIFERENTES

PADRÃO	TEOR (%)	MÉDIA DOS TEORES (% ± IC _{95%})	CV (%)
Ácido clorogênico	0,695 0,594 0,657 0,650 0,664	0,652 ± 0,045	5,61
Orientina	0,167 0,187 0,190 0,178 0,169	0,178 ± 0,013	5,81
Isoorientina	0,775 0,787 0,764 0,786 0,768	0,776 ± 0,013	1,35

Amostra: SPS-8-M. Análise realizada em cinco dias diferentes.

Sabe-se que a complexidade da matriz influencia a precisão das análises, sendo que em alguns casos como, por exemplo, análise em fluidos biológicos, coeficientes de variação de 5 a 10%, ou ainda maiores, são aceitáveis (QUATTROCCHI, ABELAIRA & LABA, 1992; DE NIGRINIS, 1995). Os extratos de plantas e os produtos fitoterápicos são matrizes complexas e usualmente com índices terapêuticos amplos, o que permitiria maiores faixas de limites de aceitação, por exemplo, 90-110% da quantidade declarada. QUATTROCCHI, ABELAIRA & LABA (1992) apresentam uma relação entre os limites de aceitação

e o coeficiente de variação máximo permitido (TABELA 29). Os autores sugerem maior dispersão dos dados para limites de aceitação mais amplos.

Os valores de coeficiente de variação para os teores de ácido clorogênico e orientina, próximos de 6, aparentemente altos, seriam aceitáveis, se consideramos a TABELA 29 onde, para o método, em análise em duplicata, no mesmo dia, para uma amostra com intervalo de aceitação de 90-110% se recomenda um CV= 5,5%.

TABELA 29. COEFICIENTES DE VARIAÇÃO MÁXIMOS RECOMENDADOS PARA UM MÉTODO ANALÍTICO EM FUNÇÃO DOS LIMITES DE ACEITAÇÃO.

LIMITES DE ACEITAÇÃO	SIMPLES		DUPLICADO	
	CV (%) MÉTODO	CV (%) SISTEMA	CV (%) MÉTODO	CV (%) SISTEMA
98,5 – 101,5	0,6	0,4	0,8	0,6
97-103	1,2	0,8	1,6	1,2
95-105	1,9	1,4	2,7	1,9
93-107	2,7	1,9	3,8	2,7
90-110	3,9	2,8	5,5	3,9

Fonte: QUATTROCCHI, ABELAIRA & LABA, 1992.

C. SELETIVIDADE

Durante a definição das condições cromatográficas, empregaram-se diferentes sistemas de eluição em gradiente, não sendo observado mais de um pico em nenhum dos casos, para os picos identificados como correspondentes ao ácido clorogênico, orientina e isoorientina. Isto sugere que o método cromatográfico empregado é seletivo.

Na FIGURA 29 estão representados dois cromatogramas obtidos nas condições cromatográficas empregadas nos ensaios de quantificação, variando somente o comprimento de onda utilizado, 280 e 350 nm. Ainda com resolução inadequada para o pico da orientina, no cromatograma a 280 nm, pode-se observar que se mantém a relação das áreas dos picos de ácido clorogênico (2), orientina (5) e

isoorientina (6), nos dois cromatogramas, sugerindo que cada um destes picos corresponde a um único composto (SNYDER, KIRKLAND & GLAJCH, 1997).

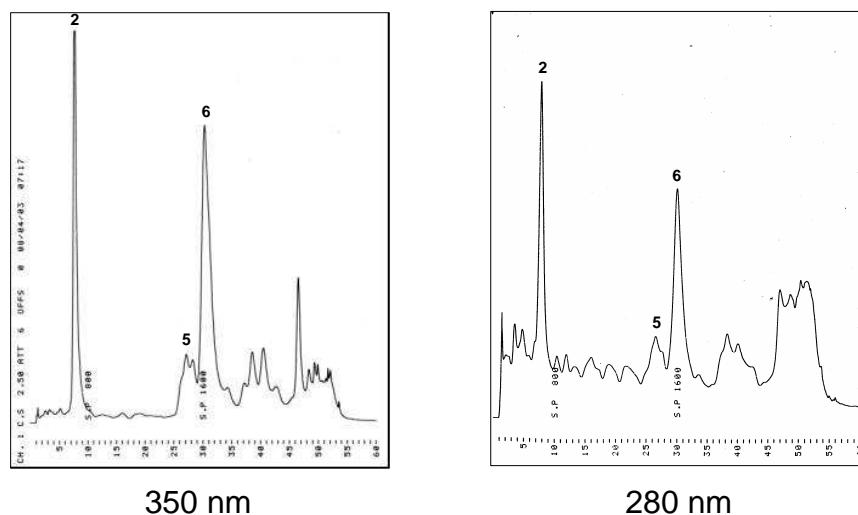


FIGURA 29. Cromatogramas obtidos por HPLC para a amostra SP-S-M-8 - Sistema Cromatográfico 6 e detecção no UV-Vis a 280 e 350nm. Metabólitos: ácido clorogênico (2), orientina (5), isoorientina (6).

D. CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DETECTÁVEL

De acordo com os cromatogramas obtidos com quantidades decrescentes de cada um dos metabólitos secundários quantificados (FIGURA 30), pode-se estabelecer que o ácido clorogênico é detectado até 0,05 μg , mas o pico está claramente definido acima de 0,1 μg . A orientina é detectada facilmente a 0,2 μg , sendo que quantidades menores levam a picos pouco diferenciáveis da linha base. O pico da isoorientina é observado para quantidades maiores que 0,1 μg , mas é claramente diferenciável acima de 0,2 μg .

Considerando a complexidade das amostras a serem analisadas e que, pelo sistema de gradiente utilizado, a linha de base está sujeita a flutuações, escolheram-se como concentrações mínimas detectáveis aquelas que permitissem a obtenção de um pico claramente diferenciável (TABELA 30). Nesta

tabela registram-se massas, uma vez que dependendo do volume injetado, diferentes soluções podem corresponder às mesmas massas.

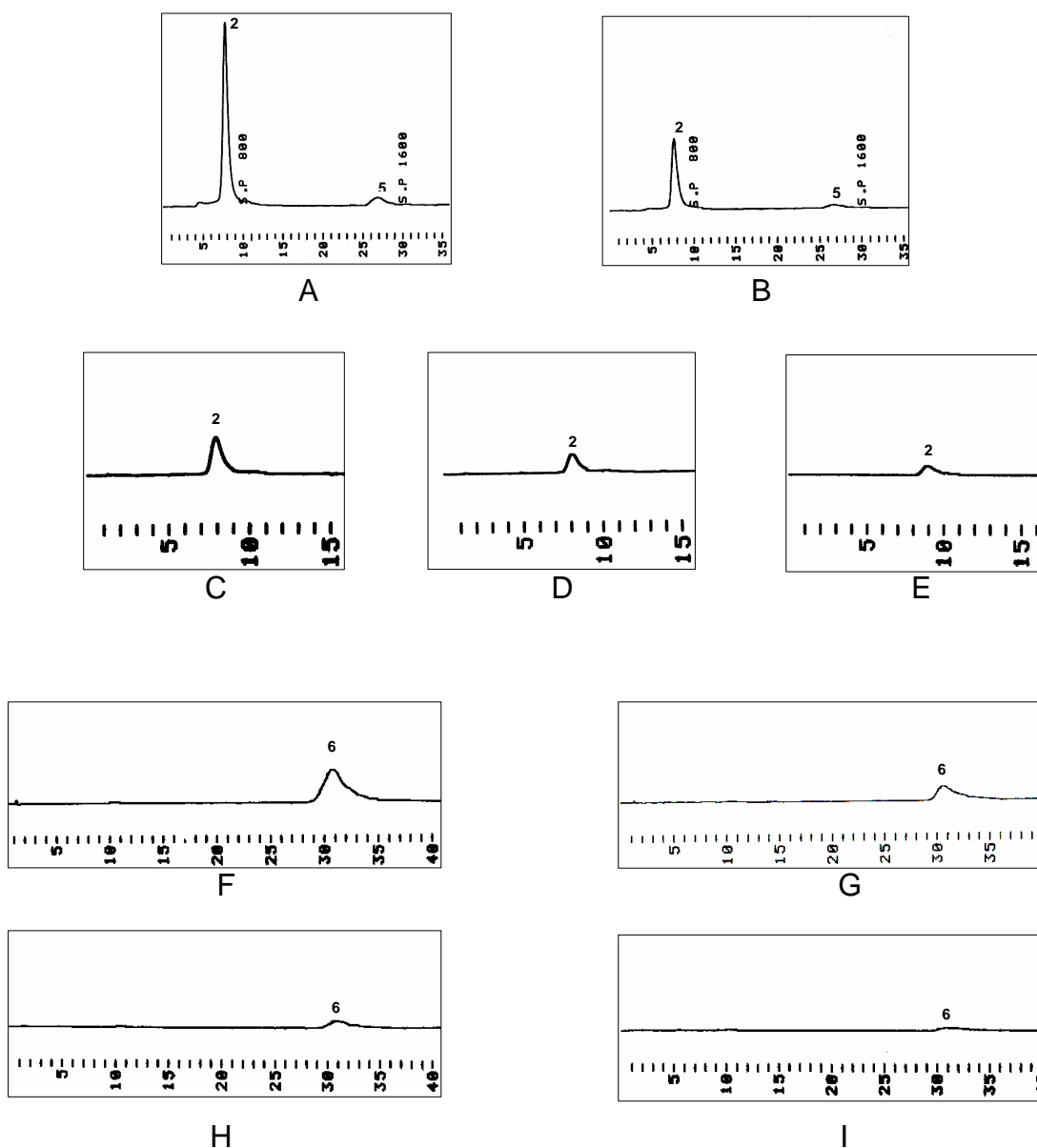


FIGURA 30. CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA DETERMINAR AS QUANTIDADES MÍNIMAS DETECTÁVEIS DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ORIENTINA E ISOORIENTINA

Sistema Cromatográfico 6. Detecção no UV-Vis 350nm.

A: ácido clorogênico (2) 2 μg , orientina (5) 0,2 μg . B: ácido clorogênico (2) 0,8 μg , orientina (5) 0,08 μg . C: ácido clorogênico (2) 0,2 μg . D: ácido clorogênico (2) 0,1 μg . E: ácido clorogênico (2) 0,05 μg . F: isoorientina (6) 0,5 μg . G: isoorientina (6) 0,2 μg . H: isoorientina (6) 0,1 μg . I: isoorientina (6) 0,05 μg .

E. CONCENTRAÇÃO MÍNIMA QUANTIFICÁVEL

Como mencionado na metodologia, consideraram-se quantidades mínimas quantificáveis as menores utilizadas nas curvas de calibração elaboradas: 0,8 μ g para ácido clorogênico e isoorientina e 0,2 μ g para orientina, já que, ainda para estas quantidades, se mantém a linearidade das curvas de calibração. Estes valores são maiores ou iguais àqueles de massas mínimas detectáveis (TABELA 30) assegurando-se, assim, que serão produzidos picos claramente diferenciáveis da linha base.

TABELA 30. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC PARA OS METABÓLITOS ANALISADOS

SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA	MASSA MÍNIMA DETECTÁVEL (μg)	MASSA MÍNIMA QUANTIFICÁVEL (μg)
Ácido clorogênico	0,1	0,8
Orientina	0,2	0,2
Isoorientina	0,2	0,8

5.5.5.2. QUANTIFICAÇÃO POR HPLC DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ORIENTINA E ISOORIENTINA EM FOLHAS DE *CECROPIA GLAZIOVII*

Os teores de ácido clorogênico, orientina e isoorientina determinados por HPLC, de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.4.6. para lâminas foliares de folhas maduras e novas provenientes de árvores nativas, cultivadas e clones estão mostrados na TABELA 31. Estes resultados estão representados graficamente nas FIGURAS 31-33, onde as barras correspondem à média e o limite de confiança a 95% para cada amostra ou grupo de amostras. O teor de ácido clorogênico variou de 0,03% a 2,39%, o de orientina, de 0,01% a 0,42%, e o de isoorientina, de 0,08% a 1,16%, nos diferentes indivíduos analisados. Por outro lado, para as populações, os teores estiveram entre 0,15 e 2,21% de ácido clorogênico, 0,02 e 0,16% de orientina e 0,23 a 0,73% de isoorientina (TABELA 31).

TABELA 31. TEORES DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ORIENTINA E ISOORIENTINA DETERMINADOS POR HPLC EM LÂMINAS FOLIARES DE *CECROPIA GLAZIOVII*.

ORIGEM	ÉPOCA	TIPO DE FOLHA	n	TEOR MÉDIO (% \pm IC _{95%})		
				ÁCIDO CLOROGÊNICO	ORIENTINA	ISOORIENTINA
ESPÉCIMENS NATIVOS	Chuvosa	M	5	0,15 \pm 0,12	0,02 \pm 0,01	0,26 \pm 0,19
		N	5	0,21 \pm 0,16	0,02 \pm 0,01	0,23 \pm 0,20
	Seca	M	4	0,51 \pm 0,19	0,12 \pm 0,16	0,67 \pm 0,42
		N	4	0,81 \pm 0,57	0,16 \pm 0,29	0,58 \pm 0,40
ESPÉCIMENS CULTIVADOS	Chuvosa	M	4	0,46 \pm 0,24	0,05 \pm 0,02	0,49 \pm 0,27
		N	0	n.d.	n.d.	n.d.
	Seca	M	4	0,85 \pm 0,46	0,06 \pm 0,03	0,54 \pm 0,25
		N	4	2,19 \pm 0,37	0,04 \pm 0,04	0,41 \pm 0,27
CLONES	Chuvosa	M	2	0,57 \pm 0,38	0,06 \pm 0,18	0,62 \pm 0,79
		N	0	n.d.	n.d.	n.d.
	Seca	M	2	0,75 \pm 0,04	0,07 \pm 0,22	0,70 \pm 1,02
		N	2	2,21 \pm 1,43	0,07 \pm 0,09	0,73 \pm 0,68

IC: intervalo de confiança, M: folhas maduras, N: folhas novas, n: número de espécimens, n.d.: não determinado. As folhas maduras e folhas novas avaliadas provinham dos mesmos espécimens. Os espécimens cultivados foram dois femininos e dois masculinos.

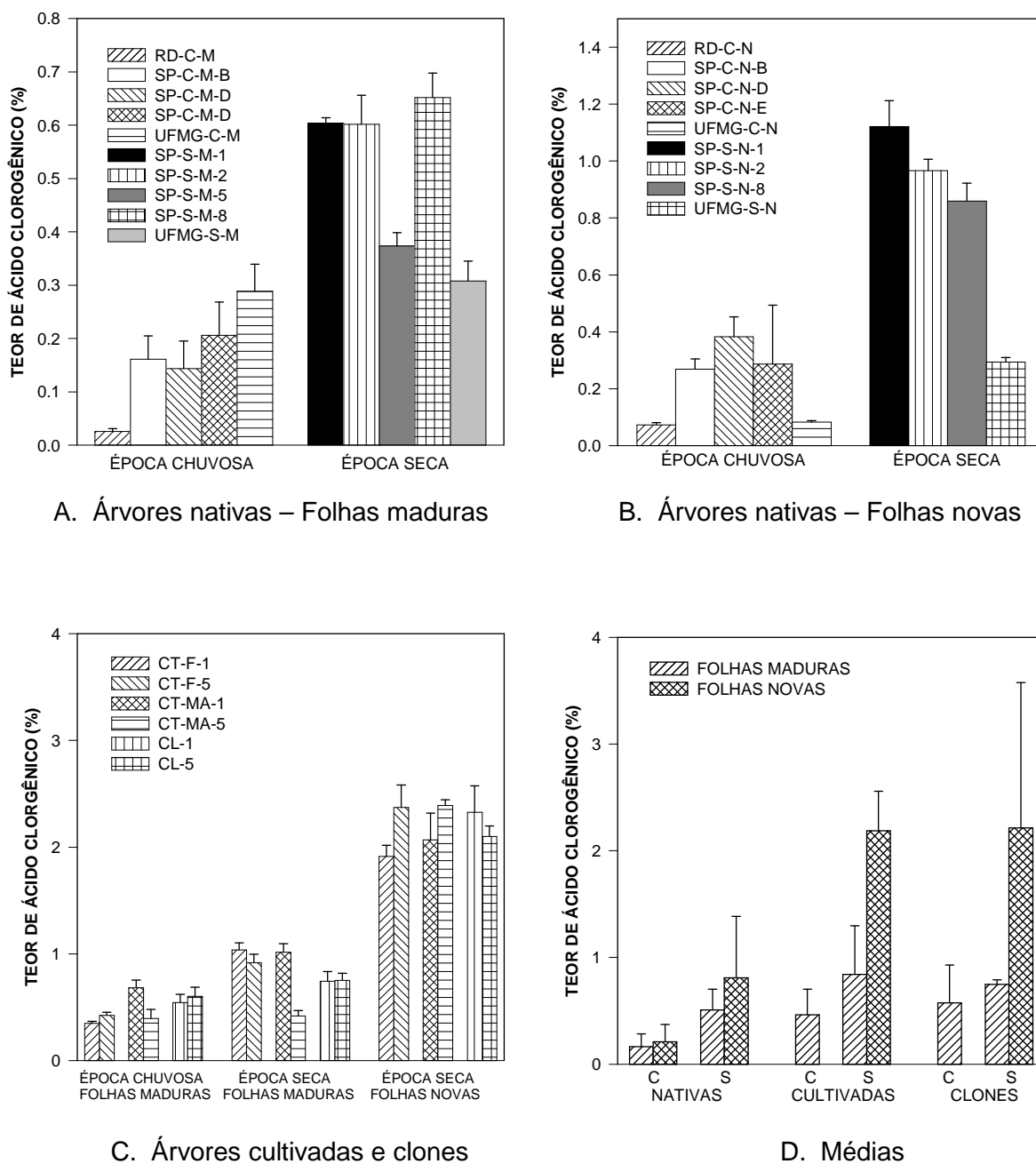


FIGURA 31. Teor de ácido clorgênico em lâminas foliares de *Cecropia glaziovii* provenientes de árvores nativas cultivadas e clones, coletadas nas épocas chuvosa e seca.

C: época chuvosa, S: época seca, RD: Parque Estadual do Rio Doce, SP: Serra da Piedade, UFMG: *Campus* da UFMG, CT: árvores cultivadas, CL: clones, f: árvores femininas, MA: árvores masculinas, M: folhas maduras, N: folhas novas.

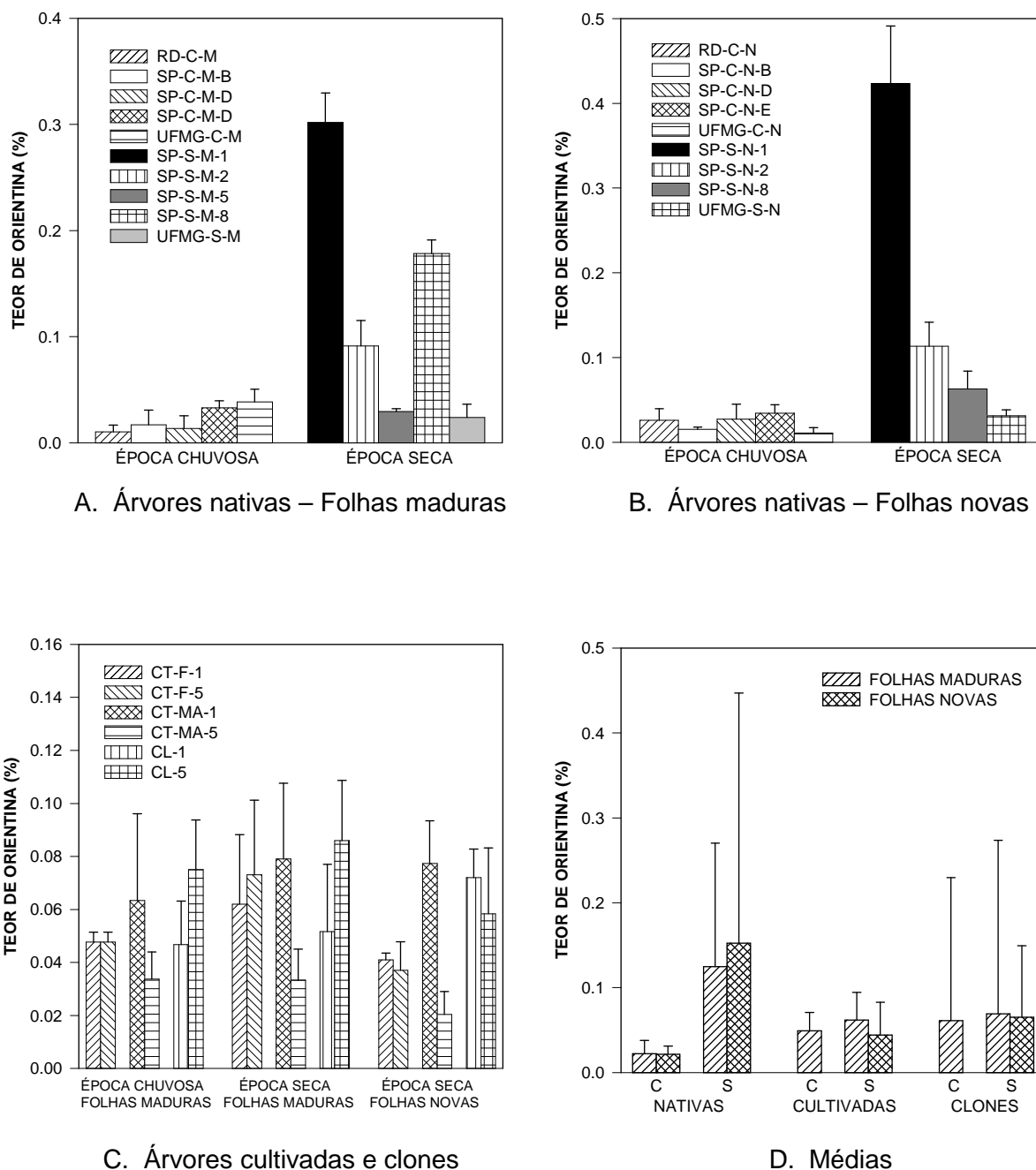


FIGURA 32. Teor de orientina em lâminas foliares de *Cecropia glaziovii* provenientes de árvores nativas cultivadas e clones, coletadas nas épocas chuvosa e seca.

C: época chuvosa, S: época seca, RD: Parque Estadual do Rio Doce, SP: Serra da Piedade, UFMG: Campus da UFMG, CT: árvores cultivadas, CL: clones, f: árvores femininas, MA: árvores masculinas, M: folhas maduras, N: folhas novas.

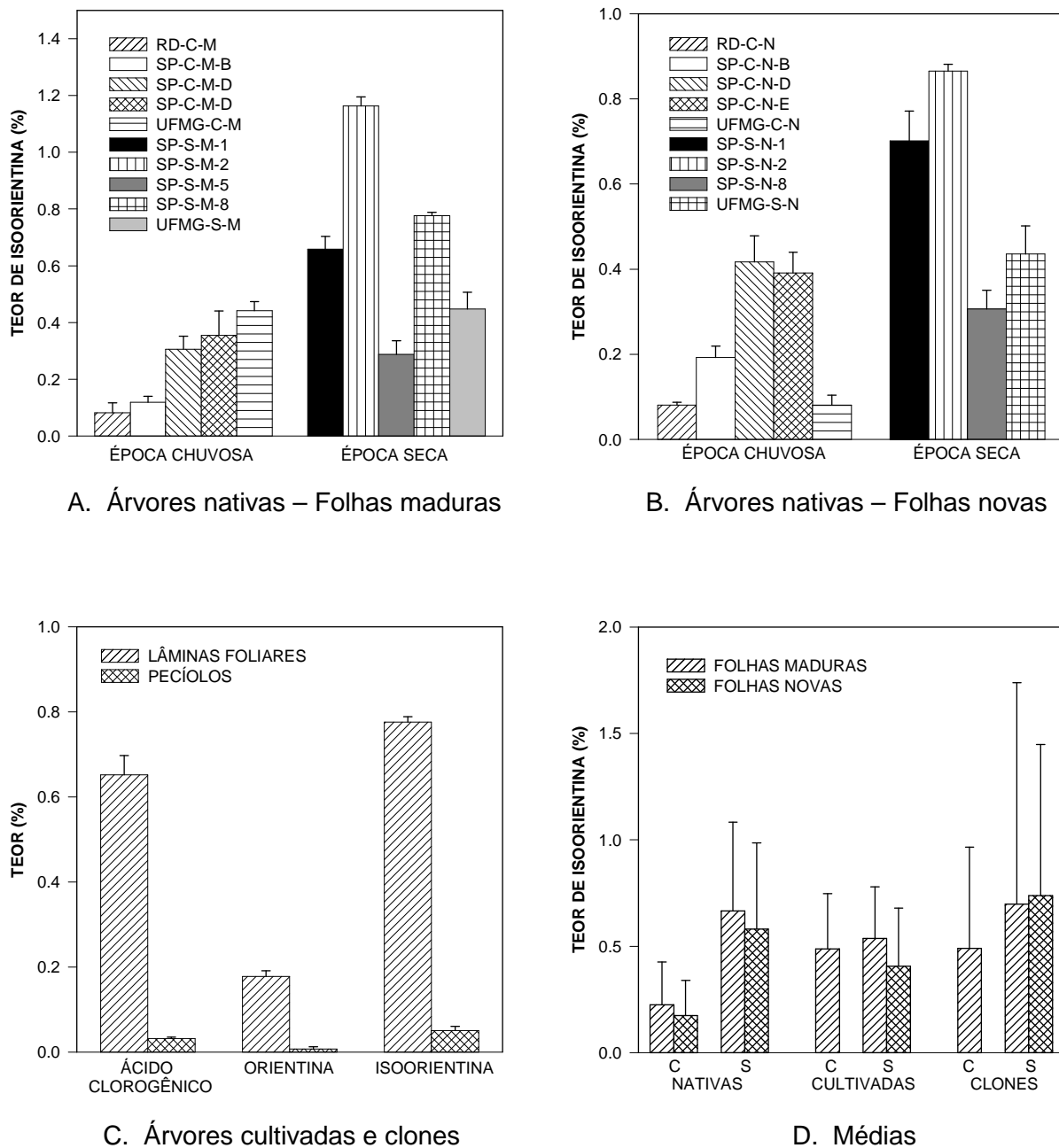


FIGURA 33. Teor de isoorientina em lâminas foliares de *Cecropia glaziovii* provenientes de árvores nativas cultivadas e clones, coletadas nas épocas chuvosa e seca.

C: época chuvosa, S: época seca, RD: Parque Estadual do Rio Doce, SP: Serra da Piedade, UFMG: *Campus* da UFMG, CT: árvores cultivadas, CL: clones, f: árvores femininas, MA: árvores masculinas, M: folhas maduras, N: folhas novas.

Para a análise dos resultados compararam-se os teores obtidos para folhas maduras e folhas novas, avaliando-se, também, a influência da época de coleta e da origem das amostras, considerando-se árvores nativas, cultivadas ou clones.

FOLHAS NOVAS VS FOLHAS MADURAS

Tanto na época seca como na época chuvosa não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os teores de ácido clorogênico, orientina e isoorientina em folhas novas e folhas maduras, provenientes de árvores nativas ($p > 0,05$). Da mesma forma, não houve diferenças entre os teores de orientina e isoorientina em folhas novas e maduras de árvores cultivadas coletadas na época seca ($p > 0,05$). No entanto, na época seca, o teor de ácido clorogênico foi 2,6 e 3,1 vezes maior em folhas novas coletadas de árvores cultivadas e clones, que nas respectivas folhas maduras. Para as amostras de cultivo não se dispunha de folhas novas da época chuvosa, inviabilizando a comparação para este período do ano (TABELA 31, FIGURAS 31-33).

ÉPOCA CHUVOSA VS ÉPOCA SECA

Tanto em folhas novas como maduras, provenientes de árvores nativas, os teores dos três metabólitos quantificados, ácido clorogênico, orientina e isoorientina, foram maiores na época seca que na época chuvosa ($p < 0,05$). Os teores médios de ácido clorogênico, orientina e isoorientina, em folhas novas foram respectivamente 3,4; 7,0 e 2,6 vezes maiores na época seca. Já para as folhas maduras, obtiveram-se teores 3,2 - 6,0 e 2,6 vezes maiores na época seca, para os mesmos metabólitos (TABELA 31, FIGURAS 31-33).

Para as amostras de folhas maduras, provenientes de cultivo e clones, não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos teores de orientina e isoorientina ($p > 0,05$), nas folhas maduras coletadas nas duas épocas do ano. No entanto, o teor de ácido clorogênico foi maior na época seca que na chuvosa, sendo de 1,8 vezes para as amostras de cultivo e de 1,3 vezes para as dos clones. (TABELA 31, FIGURAS 31-33).

ORIGEM DAS AMOSTRAS

Tanto na época seca como na chuvosa, os teores de ácido clorogênico, orientina e isoorientina nas folhas maduras de árvores nativas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos teores destes metabólitos nas amostras provenientes de cultivo ($p > 0,05$). Nas folhas novas, os teores de orientina e isoorientina não foram diferentes nos dois tipos de amostra, nativas e cultivadas ($p > 0,05$), já o teor de ácido clorogênico foi 2,7 vezes maior, nas folhas de árvores cultivadas (TABELA 31, FIGURAS 31-33).

Quando se compararam os resultados para amostras provenientes de cultivo e de clones não foram detectadas diferenças significativas entre os teores de ácido clorogênico, orientina e isoorientina nas folhas maduras (épocas seca e chuvosa), nem entre os teores de ácido clorogênico e orientina em folhas novas (época seca) ($p > 0,05$). No entanto, as folhas novas de clones continham 1,8 vezes mais isoorientina que as folhas novas de árvores cultivadas (TABELA 31, FIGURAS 31-33).

Na época chuvosa, as folhas maduras coletadas de clones apresentaram maiores teores que as de árvores nativas: 3,9 vezes para ácido clorogênico, 3,1 vezes para orientina e 2,4 vezes para isoorientina ($p < 0,05$). Na época seca não foram detectadas diferenças significativas entre os teores de orientina e isoorientina em folhas novas e maduras de amostras nativas e clones, nem entre os teores de ácido clorogênico em folhas maduras. No entanto, o teor de ácido clorogênico foi 2,7 vezes maior nas folhas novas de clones que nas folhas de árvores nativas ($p < 0,05$) (TABELA 31, FIGURAS 31-33).

Para as determinações quantitativas por HPLC foram selecionadas amostras com teores extremos (inferiores e superiores) de flavonóides, determinados colorimetricamente, o que explica a alta variação entre as concentrações das diferentes amostras de cada grupo (TABELA 31, FIGURAS 29-31).

PECÍOLOS VS LÂMINAS FOLIARES

Como se pode constatar na FIGURA 34, o teor dos três metabólitos analisados foi muito menor nos pecíolos que nas lâminas foliares, seguindo a tendência observada para os teores de flavonóides obtidos pelo método colorimétrico (item 5.4.2.2.). Os teores de ácido clorogênico, orientina e isoorientina foram, respectivamente, 21, 25 e 15 vezes maiores nas lâminas foliares ($p < 0,05$).

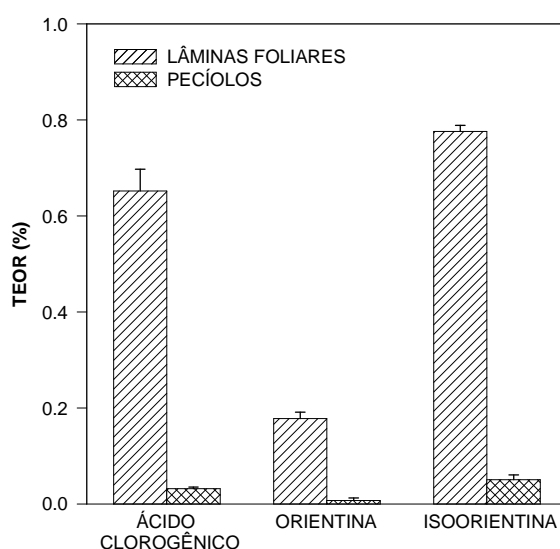


FIGURA 34. Teores de ácido clorogênico, orientina e isoorientina em pecíolos e lâminas foliares de folhas maduras de *Cecropia glaziovii*, determinados por HPLC. Amostra: SP-S-M-8.

RECOMENDAÇÕES PARA A COLETA DAS FOLHAS DE *CECROPIA GLAZIOVII*

Considerando que os três metabólitos quantificados em folhas de *C. glaziovii*, ácido clorogênico, orientina e isoorientina devem estar envolvidos na atividade anti-hipertensiva (FRANCK, et al. 1996; FRANCK, 1998) parece vantajoso efetuar a coleta das folhas na época seca, uma vez que se observaram apresentaram teores de ácido clorogênico, orientina e isoorientina maiores ou equivalentes aos obtidos para a época chuvosa.

Tanto as folhas novas como as maduras são apropriadas para a coleta, uma vez que, de forma geral, não se observaram diferenças entre os teores dos compostos avaliados.

As amostras provenientes de cultivo apresentaram teores equivalentes aos observados para as folhas de árvores nativas, enquanto nas folhas de clones foram observados teores similares ou maiores que àqueles de árvores cultivadas ou nativas, indicando que os três tipos de amostras podem ser utilizadas como fonte dos compostos avaliados.

COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS DE QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO

Por tratar-se de metodologias diferentes a comparação entre os teores obtidos por HPLC e pelo método colorimétrico (itens 4.3.3.3 e 5.4.2.2.) é limitada, mas permite uma inferência quanto à contribuição dos flavonóides quantificados por HPLC, orientina e isoorientina, para o conjunto de flavonóides determinado colorimetricamente. Assim, os teores médios de isoorientina e a soma dos teores médios de orientina e isoorientina foram comparados com os teores médios de flavonóides determinados pelo método colorimétrico para cada grupo de amostras (TABELA 32). A soma dos teores destes dois flavonóides representa de 21 a 49% dos teores determinados colorimetricamente. Como se pode constatar nos resultados obtidos (TABELAS 31 e 32), o teor de isoorientina foi muito superior ao de orientina, indicando que, para o controle de qualidade, torna-se mais conveniente avaliar as concentrações de isoorientina que as de orientina, uma vez que o primeiro corresponde de 17 até 41% dos flavonóides determinados colorimetricamente, frente a proporções de 2 a 11% para orientina.

TABELA 32. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM FOLHAS DE *CECROPIA GLAZIOVII*, OBTIDOS POR HPLC E POR COLORIMETRIA.

ORIGEM	ÉPOCA	TIPO DE FOLHA	n	TEOR MÉDIO (%)		PROPORÇÃO COM RELAÇÃO AO TEOR DE FLAVONÓIDES (%)	
				FLAVONÓIDES (COLORIMÉTRIA)	ORIENTINA + ISOORIENTINA (HPLC)	ISOORIENTINA	ORIENTINA + ISOORIENTINA
ÁRVORES NATIVAS	Chuvosa	M	5	0,64	0,28	40,6	43,8
		N	5	0,90	0,25	25,6	27,8
	Seca	M	4	1,92	0,79	34,9	41,1
		N	4	1,50	0,74	38,7	49,3
ÁRVORES CULTIVADAS	Chuvosa	M	4	1,41	0,53	34,8	37,6
		N	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Seca	M	4	1,81	0,60	29,8	33,1
		N	4	2,39	0,45	17,2	18,8
ÁRVORES CLONES	Chuvosa	M	2	1,68	0,68	36,9	40,5
		N	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Seca	M	2	2,20	0,77	31,8	35,0
		N	2	3,80	0,80	19,2	21,1

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM TEORES RELATADOS PARA OUTRAS ESPÉCIES VEGETAIS E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DESCRITAS PARA ÁCIDO CLOROGÊNICO, ORIENTINA E ISOORIENTINA

Diversos trabalhos relatam a quantificação de ácido clorogênico, orientina e isoorientina em diferentes espécies vegetais, utilizando metodologias analíticas variadas. Os teores relatados na literatura para estes metabólitos encontram-se listados na TABELA 33. Os teores de ácido clorogênico, obtidos neste trabalho, em folhas de *Cecropia glaziovii*, estiveram entre 0,15 e 2,21%, os de orientina entre 0,02 e 0,16 %, e os de isoorientina entre 0,23 e 0,73%.

Ensaio biológico *in vitro* e *in vivo* em ratos demonstraram várias atividades para o ácido clorogênico, entre as quais atividade antioxidante (CHANG, CHEN & WONG, 2001; MORIDANI et al, 2001; ZHANG et al., 2001; NAKATANIM et al., (2000); YUAN et al, 2002; YEH & YEN, 2003; TAKEOKA & DÃO, 2003), proteção

contra carcinoma de cólon (MATSUNAGA, et al., 2002), citotoxicidade frente a linhagens celulares de tumores orais (JIANG et al, 2000), aumento da tolerância à glicose e diminuição de lípidos do plasma e do fígado (RODRIGUEZ & HADLEY, 2002).

Ensaio de atividade antioxidante total *in vitro* e *in vivo* em camundongos indicam que a orientina apresenta atividade antioxidante (captação de radicais livres) (HUGUET, MANEZ & ALCARAZ, 1990; BUDZIANOWSKI, 1991; UMA-DEVI, et al., 2000; MUN'IM, NEGISHI & OZAWA, 2003), antiviral (LI et al., 2002) e ansiolítica (OKUYAMA et al., 1996). Isoorientina tem revelado, em ensaios *in vitro*, atividades antioxidante (HUGUET, MANEZ & ALCARAZ, 1990; BUDZIANOWSKI, 1991) e hepatoprotetora (KRENN et al, 2003), entre outras. FRANCK (1999) relata a inibição *in vitro* da ECA de 20 e 48% para orientina e isoorientina, respectivamente, em soluções a 0,33 mg/mL. FU, et al. (2005) avaliaram a atividade vascular de orientina encontrando efeito vasorelaxante em anéis de aorta de coelhos, com $IC_{50} = 2,28 \mu M$ em anéis com endotélio intacto, e $IC_{50} = 7,27 \mu M$ em anéis sem endotélio. O principal mecanismo vasorelaxante da orientina envolve a inibição tanto da liberação de Ca^{2+} intracelular, como a entrada de Ca^{2+} extracelular.

Considerando que em folhas de *Cecropia glaziovii* estão presentes ácido clorogênico, orientina e isoorientina, e que para estes metabólitos foi relatada atividade antioxidante, pode-se conjecturar que a espécie tenha usos farmacológicos associados a esta atividade. Diversos relatos na literatura associam a atividade antioxidante de polifenóis, e em particular de flavonóides, à prevenção de doenças cardiovasculares, podem-se citar, como exemplos, os trabalhos de PACKER, RIMBACH & VIRGILI (1999); NIJVELDT et al. (2001); OLTHOF, HOLLMAN & KATAN (2001); GALISTEO et al. (2004); ARTS & HOLLMAN (2005) e SCALBERT, JOHNSON & SALTMARSCH, (2005). A associação entre o consumo regular de alimentos ricos em flavonóides e a diminuição de doenças cardiovasculares está bastante documentada (MIDDLETON et al., 2000; CALDERONE, et al., 2004; KEEN et al., 2005). Os inibidores da ECA, entre eles os flavonóides, têm a capacidade de modular

defesas antioxidantes e de regular a produção de NO mitocondrial (CAVANAGH et al. 2003). Neste sentido, tem-se especulado recentemente sobre a capacidade de flavonóides em regular as defesas antioxidantes, através de mecanismos que envolvem a ECA, enfatizando a participação de flava-3-ols e proantocianidinas na modulação do estresse oxidativo, da função vascular e das doenças cardiovasculares (ACTIS-GORETTA et al., 2003).

TABELA 33. TEORES DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ORIENTINA E ISOORIENTINA RELATADOS NA LITERATURA PARA DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS.

METABÓLITO	ESPÉCIE (FAMÍLIA)	PARTE DA PLANTA	TEOR	REFERÊNCIA
ÁCIDO CLOROGÊNICO	<i>Cecropia glaziovii</i> (Cecropiaceae)	Folhas	0,03 – 2,39%	OBTIDOS NO PRESENTE TRABALHO
	<i>Hypericum perforatum</i> (Clusiaceae)	Capítulos florais	0,08%	BRUNI et al. (2005)
	<i>Solanum lycopersicum</i> (Solanaceae)	Fruto	0,20 mg/100g	MINOGGIO et al. (2003)
	<i>Cynara scolymus</i> (Asteraceae)	Folhas (extratos comerciais)	0,20 – 2,41%	MULINACCI et al. (2003)
	<i>Prunus dulcis</i> (Rosaceae)	amêndoas	0,04%	TAKEOKA & DÃO (2003)
	<i>Smallanthus sonchifolius</i> (Asteraceae)	Folhas (frações ¹)	0,17; 0,99%	VALENTOVA et al. (2003)
	<i>Lonicera japonica</i> (Caprifoliaceae)	Flores ²	2,20%; 2,46%	ZHOU & TONG (2003)
	<i>Lonicera macrathoides</i> (Caprifoliaceae)	Flores ²	4,00%; 4,52%	ZHOU & TONG (2003)
	<i>Echinacea purpurea</i> (Asteraceae)	Flores ³	0,02-0,06%	LETCHANO et al. (1999)
	<i>Chrysanthemum morifolium</i> (Asteraceae)	Flores ⁴	0,06 – 0,47%	LI et al. (1999)
ORIENTINA	<i>Cecropia glaziovii</i> (Cecropiaceae)	Folhas	0,01 – 0,42%	OBTIDOS NO PRESENTE TRABALHO
	<i>Aspalathus linearis</i> (Fabaceae)	Folhas e caules	0,23%	BRAMATI, AQUILANO & PRIETA (2003)
ISOORIENTINA	<i>Cecropia glaziovii</i> (Cecropiaceae)	Folhas	0,08 – 1,16%	OBTIDOS NO PRESENTE TRABALHO
	<i>Aspalathus linearis</i> (Fabaceae)	Folhas e caules	0,36%	BRAMATI, AQUILANO & PRIETA (2003)

¹ Frações enriquecidas em compostos fenólicos e com potente atividade antioxidante.

² Coletadas em regiões diferentes.

³ Coletadas em diferentes estágios do desenvolvimento floral.

⁴ De 20 lotes comerciais diferentes.

5.6. OBTENÇÃO DE UM EXTRATO ENRIQUECIDO EM FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS

5.6.1. ESCOLHA DO SOLVENTE EXTRATOR

Popularmente, se recomenda a utilização de um decocto de duas folhas secas de *Cecropia glaziovii* (ca. 20 g), em meio litro de água, isto é, uma relação droga / solvente de 1: 25 (MATOS, 1994). Para avaliar a possibilidade de se utilizar uma quantidade menor de solvente, prepararam-se extratos aquosos nas proporções droga / solvente de 1: 25 (K1) e 3: 25 (K3), utilizando-se a amostra RD-C-M. Na TABELA 34 resumem-se os resultados de rendimento da extração, teor de flavonóides e teor de proantocianidinas dos extratos assim obtidos.

TABELA 34. INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO DROGA / SOLVENTE NA COMPOSIÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *CECROPIA GLAZIOVII*, PREPARADO POR DECOCCÃO

RELAÇÃO DROGA/SOLVENTE	RENDIMENTO (%)	TEOR DE FLAVONÓIDES (% \pm IC _{95%})	TEOR DE PROANTOCIANIDINAS (% \pm IC _{95%})
1 g / 25 mL (K1)	12,1	1,13 \pm 0,51	4,35 \pm 0,46
3 g / 25 mL (K3)	8,8	1,09 \pm 0,49	1,18 \pm 0,15

Constatou-se que a relação planta/solvente é um fator muito importante na extração de metabólitos secundários, uma vez que a relação 3 g / 25 mL (K3), ainda que com teores semelhantes de flavonóides, apresentou menor rendimento em extrativos e aproximadamente um terço do teor de proantocianidinas que o extrato preparado de acordo com o uso popular, 1 g / 25 mL (K1).

O extrato aquoso, principalmente por sua baixa estabilidade e pela dificuldade de concentração e secagem, não é uma alternativa de primeira escolha para a preparação de extratos em escala industrial. Por isso, como indicado na metodologia (item 4.3.5.1), visando selecionar um solvente adequado para a preparação industrial de extratos de *C. glaziovii*, enriquecidos em flavonóides e proantocianidinas, foram avaliados etanol, etanol-água (7:3) e acetona-água (7:3), para extração do material vegetal.

Inicialmente, utilizando-se pó de folhas maduras da amostra coletada no Parque do Rio Doce (RD-C-M) foram preparados, por percolação e sonicação, extratos em etanol, etanol-água 7:3 e acetona-água 7:3, nas proporções planta / solvente 1g / 45 mL e 1g / 33 mL, respectivamente. Na TABELA 35 comparam-se os rendimentos de extração e os teores de flavonóides e proantocianidinas nestes extratos.

TABELA 35. TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS OBTIDOS POR PERCOLAÇÃO E POR SONICAÇÃO A PARTIR DE FOLHAS DE *CECROPIA GLAZIOVII.**

MÉTODO DE EXTRAÇÃO	SOLVENTE EXTRATOR	RENDIMENTO (%)	TEOR DE FLAVONÓIDES (% \pm IC _{95%})	TEOR DE PROANTOCIANIDINAS (% \pm IC _{95%})
Percolação	Etanol 96%	7,1	2,74 \pm 0,34	5,56 \pm 0,73
	Etanol-Água 7:3	12,6	2,30 \pm 0,23	5,24 \pm 0,61
	Acetona-Água 7:3	15,6	2,11 \pm 0,10	8,93 \pm 0,45
Sonicação	Etanol 96%	3,2	2,63 \pm 0,34	5,49 \pm 0,81
	Etanol-Água 7:3	8,6	5,27 \pm 0,76	10,18 \pm 1,18
	Acetona-Água 7:3	10,8	4,63 \pm 0,71	19,02 \pm 2,16

*Proporção planta / solvente: percolação 1g / 45 mL, sonicação 1 g / 33 mL

Ao comparar os métodos de extração, utilizando-se os mesmos solventes, observa-se que, quando se emprega o etanol 96%, as médias dos teores de flavonóides e proantocianidinas nos extratos obtidos por percolação e por sonicação são semelhantes. No entanto, nos extratos hidroetanólicos e hidroacetônicos obtiveram-se maiores teores, tanto de flavonóides como de proantocianidinas, que quando os extratos foram preparados utilizando-se ultra-som.

Como a extração por sonicação foi tanto ou mais eficiente que a percolação e, considerando que é menos demorada, os extratos das outras amostras de material vegetal foram preparados empregando-se ultra-som e mantendo a

relação planta / solvente de 1 g / 33 mL. Para efeito de comparação prepararam-se, com as mesmas amostras de material vegetal, extratos aquosos, por decocção, seguindo a recomendação popular. Os extratos, inclusive o extrato aquoso, foram secos em rotavapor, para manter as condições experimentais uniformes (item 4.3.5.1.).

Na TABELA 37 resumem-se os rendimentos da extração para cada um dos extratos preparados. Como esperado, os menores e maiores rendimentos foram obtidos para os extratos das amostras RD-C-M e SP-S-M-2, as quais continham, respectivamente, os menores e maiores teores de flavonóides e proantocianidinas (itens 5.4.2 e 5.4.3.). Em todos os casos, o menor rendimento foi o do extrato etanólico, o qual apresentava um aspecto de pasta oleosa, brilhante, de cor verde escura. Os outros extratos tinham aspecto de pó, de cor marrom.

TABELA 36 – RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE FOLHAS MADURAS DE *CECROPIA GLAZIOVII* COM DIFERENTES SOLVENTES UTILIZANDO ULTRASOM E A PROPORÇÃO 1 g / 33 mL

AMOSTRA	SOLVENTE EXTRATOR			
	ETANOL 96%	ETANOL-ÁGUA 7:3	ACETONA-ÁGUA 7:3	ÁGUA QUENTE
RD-C-M	3,2	8,6	10,8	12,1
SP-S-M-2	12,7	29,1	29,8	25,5
SP-S-M-5	9,9	25,7	22,9	23,7
SP-S-M-8	8,6	15,0	21,1	20,1
UFMG-S-M	7,1	19,6	20,6	23,1
MÉDIA	8,3	19,6	21,0	20,9

RD: Parque Estadual do Rio Doce, SP: Serra da Piedade, UFMG: *Campus* da UFMG, C: época chuvosa, S: época seca, M: folhas maduras

Nas TABELAS 37 e 38 e nas FIGURAS 35 e 36, resumem-se os resultados obtidos nos ensaios de quantificação espectrofotométrica de flavonóides e de proantocianidinas realizados para cada um dos extratos preparados. Avaliou-se a influência do solvente extrator nos teores de flavonóides e proantocianidinas dos extratos obtidos, mediante análise fatorial e o teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

TABELA 37 – TEOR DE FLAVONÓIDES EM EXTRATOS DE *CECROPIA GLAZIOVII* OBTIDOS EMPREGANDO ULTRA-SOM E DIFERENTES SOLVENTES

AMOSTRA	TEOR DE FLAVONÓIDES (% ± IC _{95%}) VS SOLVENTE EXTRATOR			
	ETANOL 96%	ETANOL-ÁGUA 7:3	ACETONA-ÁGUA 7:3	ÁGUA QUENTE
RD-C-M	2,63 ± 0,34 ^{aw}	5,27 ± 0,76 ^{ax}	4,63 ± 0,71 ^{ay}	1,13 ± 0,51 ^{az}
SP-S-M-2	11,55 ± 0,80 ^{bw}	13,59 ± 0,09 ^{bx}	13,11 ± 0,96 ^{by}	10,89 ± 1,25 ^{bz}
SP-S-M-5	3,94 ± 0,80 ^{cw}	5,83 ± 0,61 ^{cx}	6,80 ± 0,81 ^{cy}	4,47 ± 0,41 ^{cz}
SP-S-M-8	5,95 ± 0,43 ^{dx}	9,92 ± 0,56 ^{dy}	10,13 ± 0,91 ^{dy}	10,48 ± 0,96 ^{dz}
UFMG-S-M	5,78 ± 0,65 ^{dx}	6,99 ± 0,66 ^{ey}	6,90 ± 1,01 ^{cy}	4,87 ± 0,82 ^{ez}
MÉDIA	5,57 ^x	8,32 ^y	8,32 ^y	6,37 ^z

Médias (n=3) indicadas pela mesma letra em uma mesma linha (w, x, y, z) ou em uma mesma coluna (a, b, c, d, e) não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

RD: Parque Estadual do Rio Doce, SP: Serra da Piedade, UFMG: Campus da UFMG, C: época chuvosa, S: época seca, M: folhas maduras. Proporção planta / solvente: 1 g / 33 mL.

TABELA 38 – TEOR DE PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS DE *CECROPIA GLAZIOVII* OBTIDOS EMPREGANDO ULTRA-SOM E DIFERENTES SOLVENTES

AMOSTRA	TEOR DE PROANTOCIANIDINAS (% ± IC _{95%}) VS SOLVENTE EXTRATOR			
	ETANOL 96%	ETANOL-ÁGUA 7:3	ACETONA-ÁGUA 7:3	ÁGUA QUENTE
RD-C-M	5,49 ± 0,81 ^{aw}	10,18 ± 1,18 ^{ax}	19,02 ± 2,16 ^{ay}	4,35 ± 0,46 ^{az}
SP-S-M-2	19,50 ± 1,00 ^{bx}	16,93 ± 1,17 ^{by}	20,07 ± 1,80 ^{bx}	8,66 ± 0,55 ^{bz}
SP-S-M-5	7,67 ± 0,83 ^{cw}	12,71 ± 0,39 ^{cx}	11,92 ± 0,71 ^{cy}	3,19 ± 0,26 ^{cz}
SP-S-M-8	18,60 ± 1,93 ^{dw}	14,13 ± 2,00 ^{dx}	21,66 ± 2,31 ^{dy}	7,41 ± 0,92 ^{dz}
UFMG-S-M	18,57 ± 1,64 ^{dw}	21,75 ± 2,50 ^{ex}	22,90 ± 2,70 ^{ey}	9,44 ± 1,32 ^{bz}
MÉDIA	13,97 ^w	15,14 ^x	19,11 ^y	6,61 ^z

Médias (n=3) indicadas pela mesma letra em uma mesma linha (x, y, z) ou em uma mesma coluna (a, b, c, d, e) não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

RD: Parque Estadual do Rio Doce, SP: Serra da Piedade, UFMG: Campus da UFMG, C: época chuvosa, S: época seca, M: folhas maduras. Proporção planta / solvente: 1 g / 33 mL.

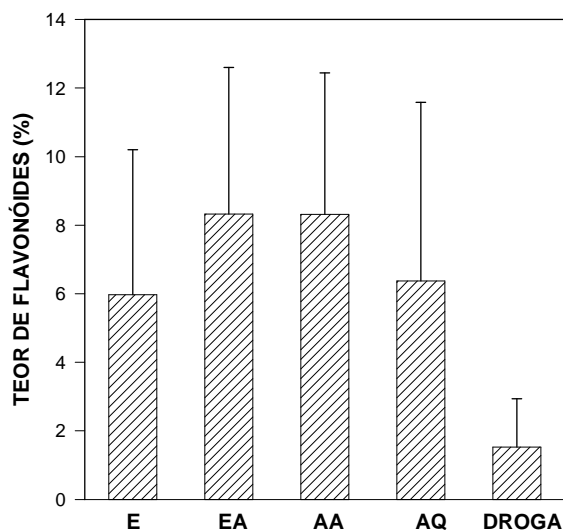


FIGURA 35. Teor de flavonóides em extratos etanólicos (E), etanol-água (7:3) (EA), acetona-água (7:3) (AA) e aquosos (AQ) e na droga vegetal empregada na sua preparação.

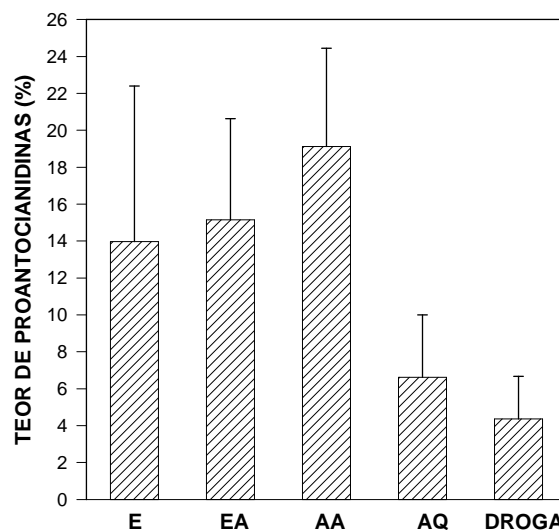


FIGURA 36. Teor de proantocianidinas em extratos etanólicos (E), etanol-água (7:3) (EA), acetona-água (7:3) (AA) e aquosos (AQ) e na droga vegetal empregada na sua preparação.

Os maiores teores de flavonóides foram obtidos para os extratos hidroetanólicos e hidroacetônicos, sendo que estes últimos continham os maiores teores de proantocianidinas. Os extratos aquosos, com rendimentos de extração da mesma ordem de magnitude que os extratos hidroacetônicos, apresentaram baixos teores de flavonóides e os menores teores de proantocianidinas.

Os extratos preparados com o mesmo solvente, a partir de amostras de material vegetal diferentes, mostraram diferentes teores de flavonóides e proantocianidinas, devido a que as folhas dos espécimes utilizados apresentavam teores destes metabólitos diferentes entre si (TABELA 38). Este fato ressalta a importância de se controlar o teor de flavonóides e proantocianidinas nas folhas de *C. glaziovii* a serem utilizadas para a preparação de extratos.

TABELA 39. TEOR DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS NAS AMOSTRAS DE DROGA VEGETAL UTILIZADAS PARA PREPARAR OS EXTRATOS DE *CECROPIA GLAZIOVII*

AMOSTRA	TEOR DE FLAVONÓIDES (% ± IC _{95%})	TEOR DE PROANTOCIANIDINAS (% ± IC _{95%})
RD-C-M	0,36 ± 0,01	2,29 ± 0,11
SP-S-M-2	3,41 ± 0,22	6,31 ± 0,99
SP-S-M-5	1,17 ± 0,03	2,76 ± 0,29
SP-S-M-8	1,53 ± 0,11	4,32 ± 0,60
UFMG-S-M	1,18 ± 0,23	6,13 ± 0,47

RD: Parque Estadual do Rio Doce, SP: Serra da Piedade, UFMG: Campus da UFMG, C: época chuvosa, S: época seca, M: folhas maduras

Para avaliar se maiores teores de flavonóides e/ou proantocianidinas na droga vegetal correspondiam a extratos com maiores teores destes metabólitos, dentro do ensaio do efeito do solvente na composição do extrato, calculou-se a relação:

$$R = \frac{\text{Teor no extrato}}{\text{Teor na droga vegetal}}$$

Os valores assim calculados para os teores de flavonóides e proantocianidinas estão resumidos nas TABELAS 40 e 41. Nas FIGURAS 37 e 38 estão representados os gráficos para as médias correspondentes.

Ainda, empregando-se a relação antes mencionada, observaram-se diferenças devidas à planta utilizada para a preparação dos extratos e mantiveram-se as diferenças devidas ao solvente extrator. Isto indica que o teor de flavonóides e proantocianidinas na droga vegetal influencia no resultado do processo extrativo.

TABELA 40. RELAÇÃO TEOR DE FLAVONÓIDES NO EXTRATO / NA DROGA VEGETAL PARA EXTRATOS DE *CECROPIA GLAZIOVII* PREPARADOS COM DIFERENTES SOLVENTES

AMOSTRA	SOLVENTE EXTRATOR			
	ETANOL 96%	ETANOL-ÁGUA 7:3	ACETONA-ÁGUA 7:3	ÁGUA QUENTE
RD-C-M	7,31 ^{aw}	14,67 ^{ax}	12,86 ^{ay}	3,15 ^{az}
SP-S-M-2	3,39 ^{by}	3,98 ^{bz}	3,85 ^{bz}	3,19 ^{ay}
SP-S-M-5	3,37 ^{bw}	4,99 ^{cx}	5,81 ^{cy}	3,82 ^{bz}
SP-S-M-8	3,89 ^{cx}	6,48 ^{dy}	6,62 ^{dyz}	6,85 ^{cz}
UFMG-S-M	4,90 ^{dx}	5,92 ^{ey}	5,85 ^{cy}	4,13 ^{bz}
MÉDIA	4,57 ^x	7,20 ^y	7,00 ^y	4,23 ^x

RD: Parque Estadual do Rio Doce, SP: Serra da Piedade, UFMG: Campus da UFMG, C: época chuvosa, S: época seca, M: folhas maduras. Proporção planta / solvente: 1 g / 33 mL.

TABELA 41. RELAÇÃO TEOR DE PROANTOCIANIDINAS NO EXTRATO / NA DROGA VEGETAL PARA EXTRATOS DE *CECROPIA GLAZIOVII* PREPARADOS COM DIFERENTES SOLVENTES

AMOSTRA	SOLVENTE EXTRATOR			
	ETANOL 96%	ETANOL-ÁGUA 7:3	ACETONA-ÁGUA 7:3	ÁGUA QUENTE
RD-C-M	2,40 ^{aw}	4,44 ^{ax}	8,31 ^{ay}	1,90 ^{az}
SP-S-M-2	3,09 ^{bx}	2,68 ^{by}	3,18 ^{bx}	1,37 ^{bz}
SP-S-M-5	2,78 ^{cw}	4,61 ^{ax}	4,32 ^{cy}	1,16 ^{dz}
SP-S-M-8	4,31 ^{dw}	3,27 ^{cx}	5,01 ^{dy}	1,71 ^{cz}
UFMG-S-M	3,03 ^{bw}	3,55 ^{dx}	3,74 ^{ey}	1,54 ^{bcz}
MÉDIA	3,12 ^w	3,71 ^x	4,91 ^y	1,54 ^z

RD: Parque Estadual do Rio Doce, SP: Serra da Piedade, UFMG: Campus da UFMG, C: época chuvosa, S: época seca, M: folhas maduras. Proporção planta / solvente: 1 g / 33 mL.

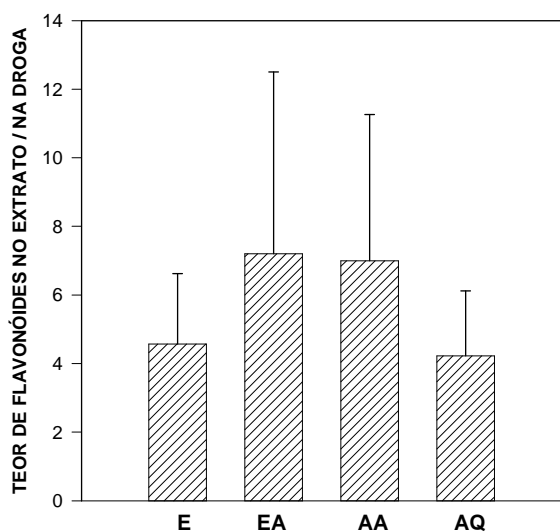


FIGURA 37. Relação entre o teor de flavonóides no extrato e na droga vegetal utilizada para prepará-lo.

Solventes extratores: (E) etanol 96%, (EA) etanol-água (7:3), (AA) acetona-água (7:3) e água (AQ).

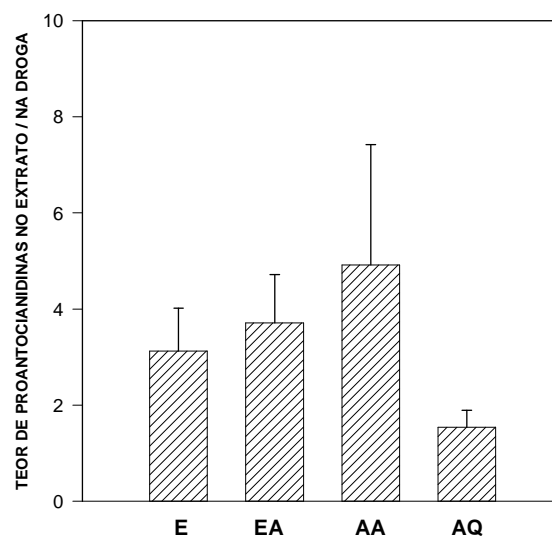


FIGURA 38. Relação entre o teor de proantocianidinas no extrato e na droga vegetal utilizada para prepará-lo.

Solventes extratores: (E) etanol 96%, (EA) etanol-água (7:3), (AA) acetona-água (7:3) e água (AQ).

As extrações com etanol-água (7:3) e acetona-água (7:3), com os maiores rendimentos, permitiram uma concentração de flavonóides entre 4 e 15 vezes e a concentração de proantocianidinas entre 3 e 8 vezes em relação ao teor presente na droga vegetal. As amostras com menores teores na droga vegetal foram as que apresentaram maior concentração destes metabólitos secundários nos extratos e aquelas com maiores quantidades na droga vegetal, as que conduziram a extratos com menor relação teor no extrato / teor na droga. Este fato sugere que o processo de extração poderia equilibrar as diferenças intra-individuais observadas para os teores de flavonóides e de proantocianidinas, se a amostra de droga vegetal não apresenta teores tão baixos, como se pode ver ao comparar os teores dos extratos obtidos com as amostras SP-S-2-M e SP-S-8-M, com diferenças de duas e três vezes nos teores de flavonóides e proantocianidinas, na droga vegetal, e com teores semelhantes destes metabólitos para cada classe de extrato. Quando as diferenças entre os teores na matéria prima são muito grandes como, por exemplo, entre as amostras SP-S-2-M e RD-C-M, ainda com maior concentração destes metabólitos pela extração, os

extratos obtidos com a amostra RD-C-M apresentam teores de flavonóides e proantocianidinas menores que os respectivos extratos preparados com a amostra SP-S-2-M.

Ainda, com maiores teores de flavonóides e proantocianidinas e maiores rendimentos de extração em algumas das amostras, para os extratos hidroacetônicos, levando-se em conta que as diferenças observadas, particularmente na quantidade de flavonóides totais (TABELA 40) e no ensaio de atividade vasorelaxante (item 5.8.1.), entre os extratos hidroetanólico e hidroacetônico foram pequenas, e que o etanol é menos tóxico, mais barato e apresenta menor risco de formação de artefatos, optou-se por continuar os ensaios utilizando-se misturas etanol-água. A extração com etanol 96% foi descartada por apresentar baixos rendimentos, produzir extratos difíceis de manipular e com baixos teores de flavonóides e proantocianidinas, além de menor atividade vasorelaxante que os respectivos extratos hidroetanólicos ou hidroacetônicos. A extração aquosa produziu extratos menos enriquecidos em flavonóides e proantocianidinas e com menor rendimento que os extratos hidroetanólicos e hidroacetônicos e, por isso, foi também descartada.

5.6.2. ESCOLHA DA PROPORÇÃO DE ETANOL E ÁGUA

Na TABELA 42 resumem-se os resultados de rendimento da extração, teor de flavonóides e teor de proantocianidinas para os extratos hidroetanólicos, preparados por sonicação, mudando-se a proporção de etanol e água. Como explicado na metodologia, (item 4.3.5.2.), foi feito um ensaio, para cada proporção de solvente, filtrando-se o extrato após sua concentração parcial, visando retirar os compostos de menor polaridade, que pudessem precipitar após a remoção do etanol, para serem comparados com os extratos preparados da forma convencional.

Os extratos preparados empregando-se etanol-água (7:3) apresentaram cor marrom, fortemente esverdeada, e eram triturados facilmente depois de secos. Já os extratos em etanol-água (3:7), de cor marrom, foram bastante difíceis de

triturar. Os extratos hidroetanólicos (1:1), de cor marrom, ligeiramente esverdeada, apresentaram uma dificuldade de trituração intermediária. Na proporção 7:3, extraiu-se uma quantidade significativa de clorofilas, por isso a cor esverdeada das soluções. Ainda assim, a diferença em rendimento (2,3%), entre o extrato obtido concentrando-se parcialmente e filtrando-se, e aquele levado à secura, sem filtração, não é muito grande. Este fato, além da facilidade na pulverização do extrato seco e a diferença dos extratos etanólicos, previamente obtidos, com aspecto oleoso, indica que a presença de água no solvente extrator contribui para diminuir a presença destes compostos, o que fica mais claro ainda quando se aumenta a proporção de água. A maior da dificuldade para triturar os extratos secos, com o aumento da proporção de água, pode estar relacionada à maior extração de mucilagens, com maior afinidade pela água que pelo etanol, e que não seriam extraídas com altos teores deste no solvente extrator.

TABELA 42 – TEORES DE FLAVONÓIDES E DE PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS HIDRO-ETANÓLICOS DE *C. GLAZIOVII* PREPARADOS POR SONICAÇÃO E COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE ÁGUA E ETANOL

EXTRATO	RENDIMENTO (%)	TEOR DE FLAVONÓIDES		TEOR DE PROANTOCIANIDINAS	
		% ± IC 95%	RELAÇÃO EXTRATO/PLANTA	% ± IC 95%	RELAÇÃO EXTRATO/PLANTA
AQ-Liof	17,6	10,00 ± 0,49	4,9	8,70 ± 0,92	2,1
EA 3:7 F	24,6	10,81 ± 0,85	5,3	16,00 ± 1,37	3,8
EA 1:1 F	26,6	11,20 ± 1,34	5,5	15,10 ± 1,17	3,6
EA 7:3 F	20,9	11,34 ± 0,87	5,6	15,70 ± 1,18	3,7
EA 3:7 SF	25,2	10,56 ± 1,09	5,2	14,86 ± 2,41	3,5
EA 1:1 SF	25,3	11,03 ± 0,89	5,4	15,37 ± 1,42	3,6
EA 7:3 SF	23,2	11,11 ± 1,32	5,5	15,23 ± 0,77	3,6

DROGA VEGETAL (SP-Jun-M): 2,03 ± 0,38% FLAVONÓIDES
4,23 ± 0,12% PROANTOCIANIDINAS

AQ-Liof: Extrato aquoso preparado por decocção e liofilizado, EA:extrato etanol-água, F: com tratamento de concentração parcial e filtração, SF: sem tratamento de concentração parcial e filtração.

Proporção planta / solvente: AQ: 1 g / 25 mL, EA: 1 g / 33 mL.

Os rendimentos de extração, nos diferentes ensaios, foram da mesma ordem de magnitude. A pequena diferença entre os extratos (7:3) filtrados e sem filtrar, se deve às clorofilas e demais compostos menos polares que precipitaram durante a concentração. Para os outros extratos, mais polares, não se evidencia diferença no processo de concentração e filtração, uma vez que não apresentaram precipitação durante a concentração.

A semelhança nos resultados obtidos para os diferentes extratos indica que a proporção de água-etanol no solvente extrator não é um fator determinante nos teores de flavonóides e proantocianidinas extraídos, pelo menos no intervalo de proporções avaliadas.

Na FIGURA 39, são mostrados os perfís cromatográficos, a 280nm, para os seis extratos EA 3:7, 1:1 E 7:3, com e sem tratamento de concentração parcial e filtração. Estes são bastante semelhantes, o que está de acordo com os resultados previamente analisados (TABELA 42). De igual forma, os perfís dos extratos hidroetanólicos apresentam características semelhantes àqueles dos extratos aquosos liofilizados (FIGURA 41), onde a principal diferença é a menor área dos picos mais polares, no caso dos extratos hidroetanólicos.

Na FIGURA 40, tem-se o perfil cromatográfico por CCD, para os extratos etanólico, hidroetanólicos nas proporções 3:7, 1:1 e 7:3, e hidroacetônico 7:3 obtidos empregando ultra-som, e o para o extrato aquoso obtido por decocção e liofilizado. Os perfís dos extratos hidroetanólicos são muito semelhantes entre si. O extrato aquoso apresenta um perfil semelhante aos dos extratos hidroetanólicos, mas a zona correspondente ao ácido clorogênico é mais intensa. O perfil para o extrato etanólico apresenta um menor número de bandas e estas são menos intensas que nos perfís dos outros extratos avaliados. O perfil do extrato hidroacetônico, ainda que semelhante aos dos extratos hidroetanólicos, parece conter um maior número de flavonóides. Vale a pena ressaltar a complexidade dos extratos avaliados, uma vez que foram detectados vários compostos com NP/PEG, um revelador especial para a detecção de flavonóides e ácidos orgânicos.

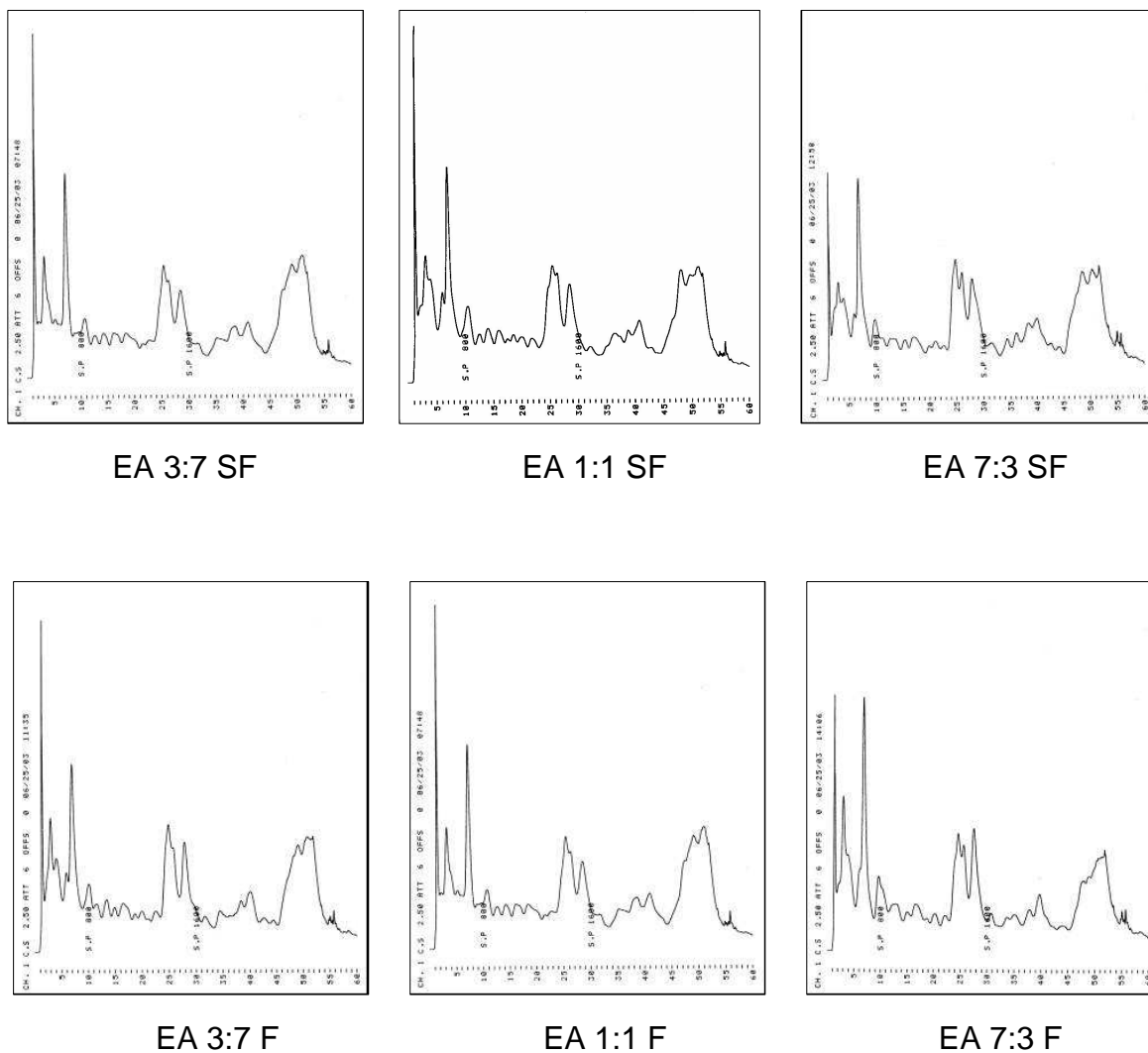
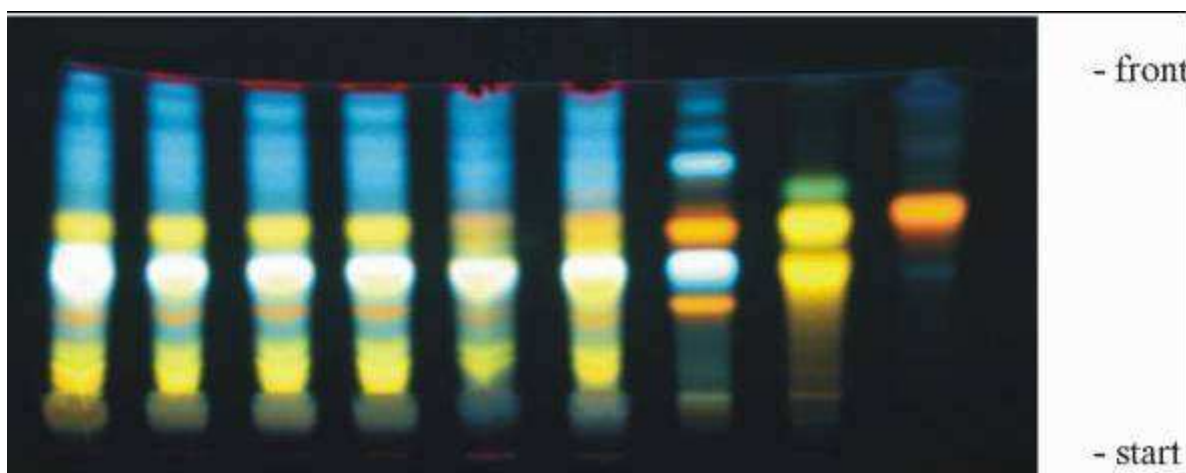


FIGURA 39. Perfís cromatográficos, obtidos por HPLC, para os extratos etanol-água 3:7 (EA 3:7), etanol-água 1:1 (EA 1:1) e etanol-água 7:3 (EA 7:3) com (F) e sem (SF) tratamento de concentração parcial e filtração, preparados por sonicação, a partir de folhas maduras de *Cecropia glaziovii*. Indivíduo SP-Jun. Sistema cromatográfico 6 – Detecção no UV-280 nm.



AQ-LIOF EA 3:7 EA 1:1 EA 7:3 E AA 7:3 T1 T2 T3

FIGURA 40. Perfis cromatográficos, obtidos por CCD, para o extrato aquoso preparado por decocção e liofilizado (AQ-LIOF) e os extratos etanol-água 3:7 (EA 3:7), etanol-água 1:1 (EA 1:1), etanol-água 7:3 (EA 7:3) e acetona água 7:3 (AA 7:3) preparados por sonicação, a partir de folhas maduras de *Cecropia glaziovii*.

FASE ESTACIONÁRIA: Placa de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck)

FASE MÓVEL: Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (80:11:11:70), fase superior.

REVELADOR: Reagente NP/PEG e observação no UV₃₆₅.

SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA:

T1: rutina (Rf ~ 0,40), ácido clorogênico (Rf ~ 0,51) e hiperosídeo (Rf ~0,59)

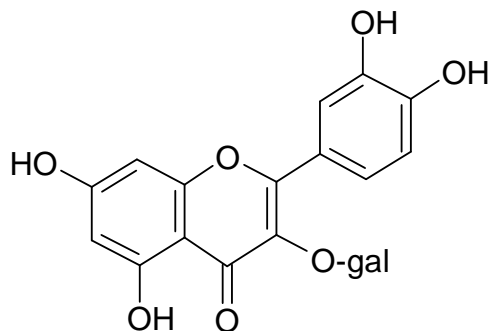
T2: isoorientina (Rf ~ 0,48) e orientina (Rf ~0,61)

T3: isoquercitrina (Rf ~0,65) e catequina (Rf ~0,95)

As zonas azuis na região de altos Rfs podem ser ácidos triterpênicos, inclusive ácido protocatéquico. Nesta área se localizam, também, a catequina e a epicatequina.

As três zonas amarelas de baixo Rf podem ser di/triglicerídeos de canferol.

Cromatograma obtido no Instituto de Biologia Farmacêutica, Universidade de Munique, Alemanha, por cortesia do Prof. H. Wagner.



(39) Hiperosídeo

Uma vez analisados os diferentes resultados e considerando que nos ensaios quantitativos e nos perfís cromatográficos não se evidenciaram grandes diferenças entre os extratos, escolheu-se, para os ensaios seguintes, a proporção de etanol-água (1:1). A mistura hidroetanólica, nesta proporção, não extrai compostos apolares tais como clorofilas, e resulta em um extrato com menor dificuldade de trituração que na proporção 3:7. Não se empregará o procedimento de concentração parcial e filtração, uma vez que este envolve mais etapas, sem apresentar vantagens no que diz respeito à concentração e secagem, sem filtração.

VIÉRLING et al. (2003) avaliaram extratos comerciais de *Crataegus* preparados por percolação exaustiva, à temperatura ambiente, utilizando água e misturas metanol-água e etanol-água, em proporções de 40, 55 e 70 % do álcool. A quantificação espectrofotométrica de flavonóides e proantocianidinas e o relaxamento em anéis de aorta pré-contraídos foram alguns dos parâmetros avaliados. Os resultados mostraram que os extratos hidroalcoólicos avaliados apresentaram composição e atividade semelhantes. Para o extrato aquoso observaram-se menores teores das substâncias avaliadas e menor potência no teste de vasorelaxação, que pode ser compensada mediante o incremento da concentração. Estes resultados coincidem com os obtidos no presente trabalho para *Cecropia glaziovii*.

VIÉRLING et al. (2003) relatam, nos extratos hidroetanólicos comerciais de *Crataegus*, teores de flavonóides entre 1,8 e 3,4% e de proantocianidinas, entre 11,7 e 13,5%. O extrato aquoso de *Crataegus* apresentou teores de 0,7 e 8,0% de flavonóides e proantocianidinas, respectivamente. No presente trabalho foram obtidos extratos com teores de proantocianidinas ligeiramente maiores e teores de flavonóides substancialmente maiores que aqueles relatados para *Crataegus* (TABELA 41).

5.6.3. ESCOLHA DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO

As proporções droga / solvente empregadas neste ensaio tiveram como base a quantidade de solvente necessária para a percolação da amostra RD-C-M (item 4.3.5.1.). Para a extração exaustiva de 200 g daquele material vegetal foram necessários 9 L de cada um dos solventes avaliados, sendo que, após 6 L de solvente, os percolatos resultavam em pequena massa de resíduo seco. Estes dados sugerem que uma relação de 1 g de droga / 30 mL de solvente extrairia a maior parte dos constituintes da amostra, sendo que a relação 1 g de droga / 40 mL, empregada nos ensaios, deveria levar a uma extração praticamente exaustiva do material vegetal.

Os maiores teores de flavonóides foram observados nos extratos obtidos por percolação contínua e sonicação. No entanto, a percolação contínua, com menor rendimento, levou a extratos com menor teor de proantocianidinas (TABELA 43). A metodologia de extração por sonicação, adequada para escala de laboratório, resulta em extratos com alto teor de flavonóides e proantocianidinas.

A maceração permitiu a extração de proantocianidinas na mesma proporção que a percolação descontínua. No entanto, o teor de flavonóides foi menor no extrato obtido por maceração. Estes resultados indicam que, para a relação droga/solvente empregada, não se alcança a saturação das proantocianidinas, mas sim a dos flavonóides.

Os resultados obtidos para os extratos obtidos por percolação mostram que, quando se emprega etanol-água 1:1 como solvente extrator de folhas de *C. glaziovii*, os flavonóides são mais facilmente extraídos que as proantocianidinas, uma vez que no processo contínuo, onde há menor tempo de contato entre o solvente e o material vegetal, foi extraído um maior teor de flavonóides e um menor teor de proantocianidinas que quando se realizou o processo descontínuo. Pelos resultados obtidos, o aumento do tempo de contato entre droga vegetal e solvente favorece a extração das proantocianidinas, mas reduz a extração dos flavonóides.

O extrato obtido por maceração foi o mais ativo no teste de relaxação em anéis de aorta pré-contraídos (item 5.8.1.), seguido do extrato obtido por percolação descontínua. Estes resultados indicam que, no processo extrativo, deve-se favorecer a extração das proantocianidinas sobre a extração dos flavonóides. De acordo com os resultados obtidos, as metodologias de maceração e percolação descontínua são as mais adequadas para processos industriais.

TABELA 43 – TEOR DE FLAVONÓIDES E DE PROANTOCIANIDINAS TOTAIS EM EXTRATOS HIDROETANÓLICOS (1:1) DE *CECROPIA GLAZIOVII* PREPARADOS POR DIFERENTES METODOLOGIAS

MÉTODO DE EXTRAÇÃO	RELAÇÃO DROGA / SOLVENTE	RENDIMENTO (%)	TEOR DE FLAVONÓIDES (% \pm IC _{95%})	TEOR DE PROANTOCIANIDINAS (% \pm IC _{95%})
MACERAÇÃO	1 g / 43 mL	25,6	7,35 \pm 1,34	37,92 \pm 3,77
PERCOLAÇÃO CONTINUA	1 g / 43 mL	24,7	10,50 \pm 1,43	29,93 \pm 4,14
PERCOLAÇÃO DESCONTÍNUA	1 g / 43 mL	28,7	8,27 \pm 0,61	35,11 \pm 2,45
SONICAÇÃO	1 g / 43 mL	28,4	10,57 \pm 0,96	36,17 \pm 4,62

DROGA VEGETAL (SP-S-8-M): 1,53 \pm 0,11% FLAVONÓIDES
4,32 \pm 0,60% PROANTOCIANIDINAS

Na fase de padronização da metodologia, a nível piloto e industrial, deverão estabelecer-se, para os equipamentos a serem empregados, o tempo mínimo necessário para se obter uma boa eficiência na extração. Outro fator que deve ser otimizado é a relação droga-solvente e a quantidade de solvente necessária para cada etapa da percolação descontínua.

5.7. OBTENÇÃO E SEMIPURIFICAÇÃO DE UM EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO

5.7.1. OBTENÇÃO DE EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO PREPARADO POR DECOCCÃO

Como foi mencionado na revisão bibliográfica, de acordo com MATOS (1994), *Cecropia adenopus* e outras espécies, são popularmente empregadas como diurético e anti-hipertensivo, na forma de decocto, preparado na proporção de uma a duas folhas secas (aproximadamente 20 g), em meio litro de água. Por isso, trabalhou-se com um extrato aquoso preparado por decocção, numa proporção droga / solvente 1: 25, seguindo as recomendações do uso popular. O extrato aquoso obtido, de cor marrom escura, foi liofilizado. O extrato aquoso apresenta a vantagem de não conter clorofilas e é o extrato que mais se assemelha ao modo do uso popular.

O liofilizado obtido se apresentava como um pó bege escuro, muito volumoso, e de fluidez não uniforme, uma vez que continha pequenos aglomerados de baixa densidade. Na TABELA 44 resumem-se os dados correspondentes ao rendimento da extração, de forma independente para lâminas foliares de folhas novas e maduras, observando-se que, apesar de se utilizar a mesma metodologia e as mesmas quantidades de material vegetal e água, as folhas novas renderam menor quantidade de extrato aquoso liofilizado. Cabe lembrar que os 360 g de pó de folhas maduras foi repartido em quatro porções de 90 g que foram extraídas independentemente. A diferença em rendimento não pode ser explicada pelas quantidades de flavonóides e proantocianidinas presentes na droga vegetal, uma vez que a amostra de material vegetal empregada, SP-Jun, continha teores de flavonóides totais semelhantes nas folhas maduras ($2,03 \pm 0,38\%$) e nas folhas novas ($2,23 \pm 0,11\%$), e as folhas novas apresentaram maior teor de proantocianidinas totais ($5,01 \pm 0,18\%$) que as folhas maduras ($4,23 \pm 0,12$). É possível que a diferença seja devida a mucilagens e açúcares, compostos altamente solúveis em água.

TABELA 44 – RENDIMENTO NA OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO DE FOLHAS DE *CECROPIA GLAZIOVII*

EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO A PARTIR DE LÂMINA FOLIAR DE	DROGA VEGETAL	EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO	RENDIMENTO
Folhas novas	90 g	11,1 g	12,3%
Folhas maduras	360 g	63,3 g	17,6%

As médias obtidas para o teor de flavonóides nos extratos aquosos liofilizados de lâminas foliares de folhas novas e maduras foram da mesma ordem de magnitude, no entanto o extrato de folhas novas apresentou maior teor de proantocianidinas que o de folhas maduras ($p < 0,05$). Já o grau de concentração da droga vegetal para o extrato foi duas vezes maior para os flavonóides que para as proantocianidinas (TABELA 45).

TABELA 45 – TEOR DE FLAVONÓIDES E DE PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS AQUOSOS LIOFILIZADOS DE *C. GLAZIOVII*

EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO A PARTIR DE LÂMINA FOLIAR DE	TEOR DE FLAVONÓIDES (%)			TEOR DE PROANTOCIANIDINAS (%)		
	DROGA VEGETAL	EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO	RELAÇÃO EXTRATO/PLANTA	DROGA VEGETAL	EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO	RELAÇÃO EXTRATO/PLANTA
Folhas novas	2,23 ± 0,11	9,43 ± 1,36	4,2	5,01 ± 0,18	10,44 ± 0,69	2,1
Folhas maduras	2,03 ± 0,38	10,00 ± 0,49	4,9	4,23 ± 0,12	8,70 ± 0,92	2,1

Nos perfís a 280 nm (FIGURA 41) pode-se observar que as amostras de planta e extrato aquoso liofilizado apresentam os mesmos grupos de picos, um primeiro grupo de compostos altamente polares, que são eluídos antes de 10 minutos, um segundo grupo de picos, com tempos de retenção menores que 30 minutos e um grupo de picos de compostos de baixa polaridade que são eluídos entre 45 e 55 minutos.

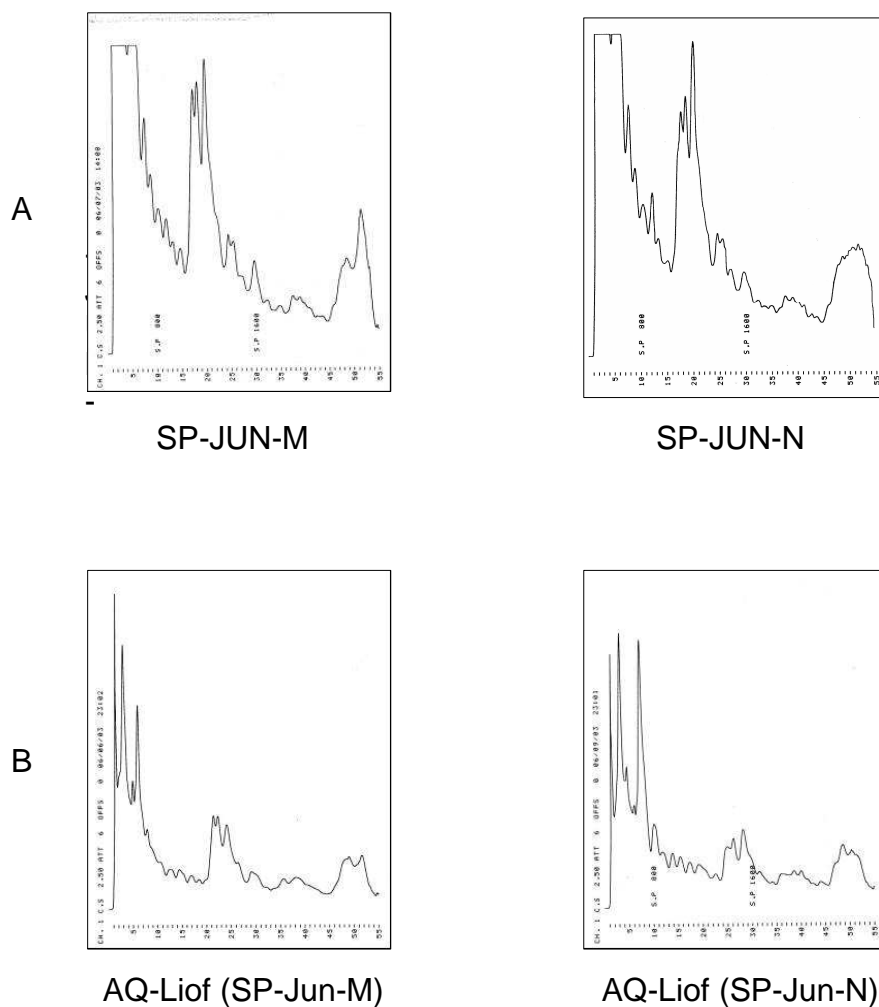


FIGURA 41. Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, de extratos etanol-água (7:3, ultra-som) de lâminas foliares de folhas maduras provenientes de SP-Jun-M e SP-Jun-N (A) e dos seus extratos aquosos (AQ) preparados por decocção e liofilizados (B).

Sistema cromatográfico 5. Detecção no UV - 280 nm.

5.7.2. PARTIÇÃO COM SOLVENTES IMISCÍVEIS

Foram realizados dois experimentos. No primeiro, foram utilizados acetato de etila e *n*-butanol e, no segundo, utilizou-se apenas *n*-butanol (FIGURA 42). Na partição entre solventes imiscíveis, verifica-se que o extrato aquoso liofilizado é

constituído, predominantemente, por compostos altamente polares, uma vez que as frações aquosas (FAQ2 e FAQ3) representam porcentagens relativas superiores a 50%, como se pode visualizar na FIGURA 42, que resume as médias das porcentagens relativas para cada uma das frações obtidas considerando em todos os casos, a quantidade de liofilizado de partida.

A fração acetato de etila corresponde a uma porção pequena do extrato aquoso (4,7%) e seus componentes podem ser extraídos por *n*-butanol, uma vez que a soma das porcentagens relativas das frações FAE e FB1 (26,4%) é muito semelhante à da FB2 (26,7%). Por corresponder a uma fração com massa relativa pequena, esta não seria uma fração de interesse industrial a não ser que apresente uma atividade farmacológica marcante ou que sua composição não seja tão complexa.

As frações acetato de etila e butanólicas tinham aspecto de pó marrom claro e as aquosas eram de cor marrom escura. As frações aquosas foram difíceis de pulverizar, por formarem massas compactas, possivelmente pela presença de mucilagens. Para o cálculo de porcentagem relativa de massas consideraram-se as massas das diferentes frações secas, antes de serem trituradas, para evitar erros por perda de amostra durante o processo.

Na TABELA 46 pode-se observar que os flavonóides e proantocianidinas presentes no extrato aquoso de lâminas foliares de folhas de *C. glaziovii* se concentraram, principalmente, nas frações acetato de etila (FAE) e butanólicas (FB1 e FB2). O teor de flavonóides totais na fração FB1 é 2,7 vezes maior que na FAE, enquanto que o teor de proantocianidinas totais é somente 1,1 vezes maior em FB1 que em FAE, indicando que os flavonóides são mais solúveis no *n*-butanol e que as proantocianidinas apresentam solubilidades semelhantes em acetato de etila e *n*-butanol. Ainda assim, cabe lembrar que o acetato de etila extrai principalmente proantocianidinas diméricas, mas pode extrair, também, proantocianidinas oligoméricas, até tetrâmeros, e o *n*-butanol extrai, principalmente, proantocianidinas monoméricas e diméricas (HARBORNE, 1989).

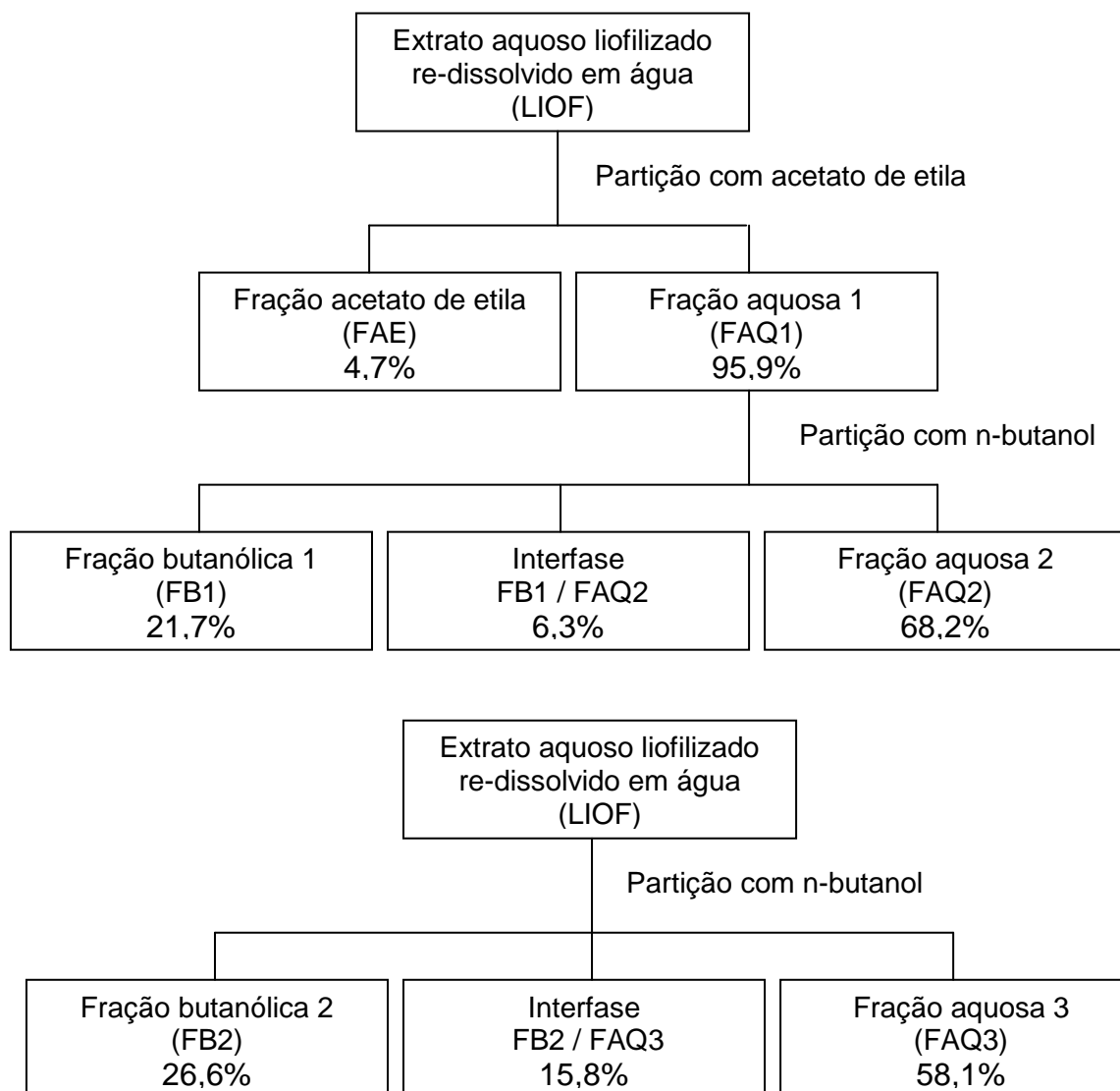


FIGURA 42: FLUXOGRAMA DAS PARTIÇÕES DO EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO DE *CECROPIA GLAZIOVII* COM SOLVENTES IMISCÍVEIS E PORCENTAGENS RELATIVAS DAS FRAÇÕES

Os cromatogramas em camada delgada (CCD) das diferentes frações obtidas (FIGURA 43) mostram que as frações acetato de etila (FAE) e butanólicas (FB1 e FB2) apresentam compostos claramente diferenciáveis. As frações aquosas não apresentaram nenhum composto predominante. Como esperado FAQ1 contém alguns dos compostos presentes em FB1, uma vez que deu origem a esta. FAE, FB1 e FB2 contêm uma mancha com Rf semelhante ao da catequina e da epicatequina. Além disso, apresentam outra mancha marrom, com Rf menor que os das catequinas, a qual pode corresponder a uma ou mais proantocianidinas.

A interfase FB1/FAQ2 apresenta uma composição bastante semelhante àquela das frações aquosas.

TABELA 46 – TEOR DE FLAVONÓIDES E DE PROANTOCIANIDINAS EM FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÃO COM SOLVENTES IMISCÍVEIS DE EXTRATO AQUOSO DE *CECROPIA GLAZIOVII*

FRAÇÃO	TEOR DE FLAVONÓIDES % ± IC _{95%}	TEOR DE PROANTOCIANIDINAS % ± IC _{95%}
EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO (SP-Jun-M)	10,00 ± 0,49	8,70 ± 0,92
FAE	12,21 ± 1,03	13,55 ± 1,11
FAQ1	7,31 ± 0,77	7,56 ± 0,77
FB1	32,37 ± 3,01	15,00 ± 1,25
FAQ2	2,28 ± 0,41	6,36 ± 0,85
Interfase FB1/FAQ2	1,85 ± 0,23	4,08 ± 0,36
FB2	29,81 ± 1,32	17,71 ± 2,41
FAQ3	6,16 ± 0,29	2,75 ± 0,53

Os cromatogramas obtidos por HPLC (FIGURA 44) mostram que o *n*-butanol extrai flavonóides glicosilados da solução aquosa, uma vez que picos com tempo de retenção entre 20 e 35 minutos aparecem claramente nos cromatogramas de FB1 e FB2 e apresentam áreas relativamente pequenas nos cromatogramas das frações aquosas (FAQ2 e FAQ3). O acetato de etila não extrai estes flavonóides da solução aquosa, como pode-se deduzir a partir das áreas semelhantes dos picos da região entre 20 e 35 min., nos cromatogramas do extrato aquoso liofilizado e da FAQ1, e pelas áreas pequenas destes picos no cromatograma de FAE. Os cromatogramas das interfases FAQ / FB são bastante semelhantes aos das frações aquosas, o que sugere que a emulsão formada durante a partição contém maior proporção da fase aquosa do que da fase butanólica.

A partir destes resultados, decidiu-se continuar a semipurificação com as frações FAE e FB1. Não se trabalhou com FB2 uma vez que a sua composição,

ainda que semelhante à de FB1, era um pouco mais complexa, por não ter tido a extração prévia com acetato de etila.

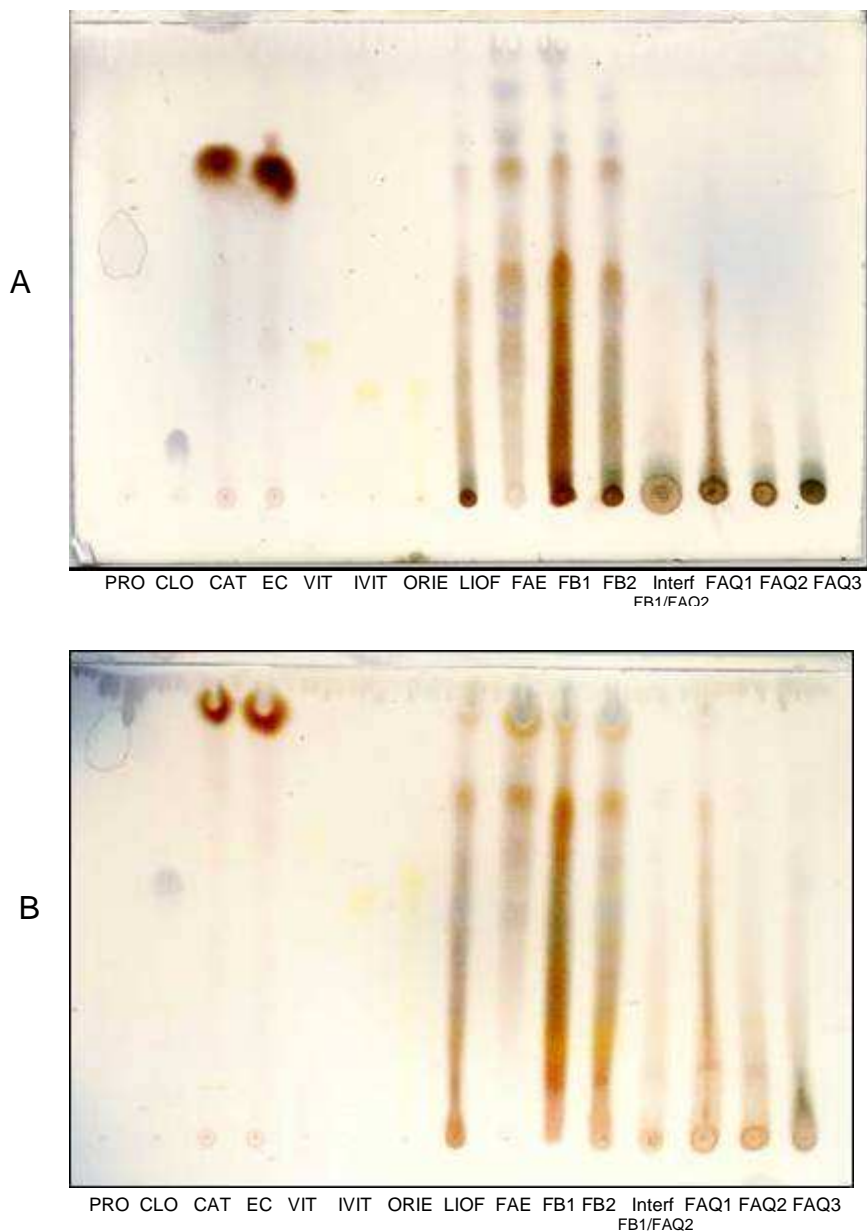


FIGURA 43. CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CCD, PARA FRAÇÕES ORIUNDAS DO EXTRATO AQUOSO DE *CECROPIA GLAZIOVII* POR PARTIÇÃO ENTRE SOLVENTES IMISCÍVEIS

FASE ESTACIONÁRIA: Placas de gel de sílica 60 G (Merck)

FASE MÓVEL- A: Acetato de etila - metanol- ac. acético - água (90:5:5:5)

B: Acetato de etila - ac. fórmico - ac. acético - água (100:11:11:27)

REVELADOR: Aspersão com anisaldeído / ácido sulfúrico e visualização no visível e no UV₃₆₅

SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA: PRO: ácido protocatéuico, CLO: ácido clorogênico, CAT: catequina, EC: epicatequina, VIT: vitexina, IVIT: isovitexina, ORIE: orientina

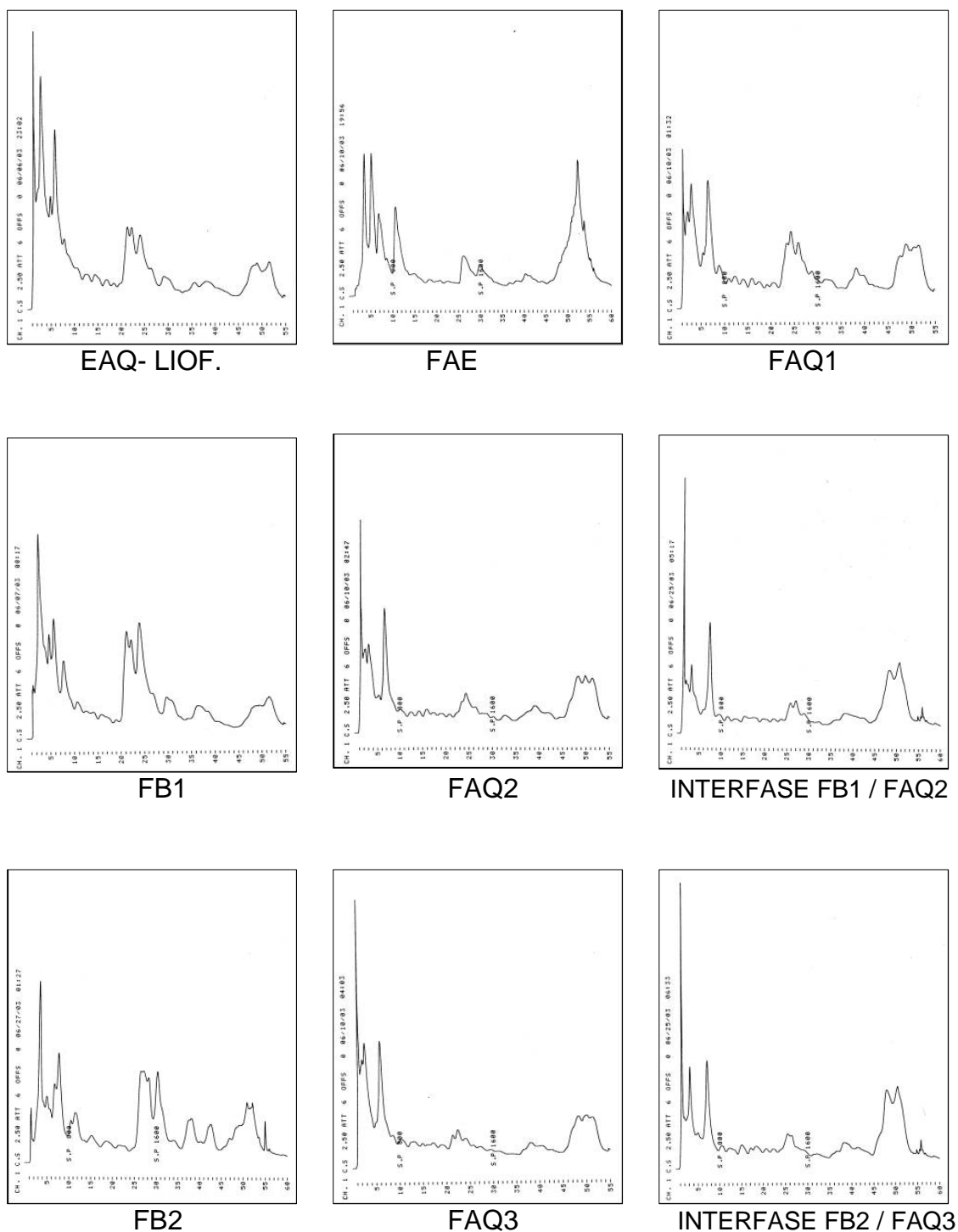


FIGURA 44: Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, para frações oriundas do extrato aquoso de *Cecropia glaziovii* (amostra SP-Jun-M) por partição entre solventes imiscíveis

Sistema cromatográfico 5. Detecção no UV 280 nm.

EAQ LIOF.: Extrato aquoso liofilizado, FAE: fração acetato de etila, FB: fração butanólica, FAQ: fração aquosa.

5.7.3. FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20

5.7.3.1. FRAÇÃO FAE

O fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 foi realizado com três porções de 500 mg. Após reunir as frações de cada coluna obtiveram-se quatro grupos. As sub-frações FAE-A e FAE-C foram as de maior massa (TABELA 47). As sub-frações FAE-A e FAE-B evidenciaram, por CCD, presença de flavonóides, já FAE-B continha tanto flavonóides como proantocianidinas e/ou catequinas, e em FAE-D somente foram detectadas proantocianidinas e/ou catequinas. A presença de flavonóides foi mais evidente em FAE-B e FAE-C. A sub-fração FAE-A apresentou-se bastante complexa, com manchas numerosas e de cores variadas; já nos cromatogramas das outras sub-frações observaram-se poucas manchas e houve predominância de tons amarelos (flavonóides) e marrons (catequinas e/ou proantocianidinas).

TABELA 47 – MASSAS E PORCENTAGENS RELATIVAS À FAE DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS POR FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20

Massa de FAE: 1503,5 mg

SUB-FRAÇÃO	MASSA (mg)	%
FAE-A	397,4	26,4
FAE-B	128,5	8,5
FAE-C	385,4	25,6
FAE-D	198,9	13,2
TOTAL	1110,2	73,7

Os cromatogramas obtidos por HPLC (FIGURA 45) mostram picos com TRs semelhantes ao da quercetina e do canferol, na sub-fração FAE-A, o que faz supor a presença de flavonóides livres (agliconas). A sub-fração FAE-B, além de apresentar picos de agliconas de flavonóides, contém flavonóides glicosilados (TR 20-35 min), e compostos altamente polares como ácidos orgânicos, catequinas e

proantocianidinas (TR < 20 min.). A subfração FAE-C mostrou um perfil semelhante ao da FAE-B, mas a área dos picos de compostos de menor polaridade é pequena. Na sub-fração FAE-D predominam os picos correspondentes aos compostos altamente polares, mas com áreas menores que as observadas para a FAE-C.

Por co-injeção com soluções de substâncias de referência foi possível identificar alguns picos na região de compostos altamente polares. Em FAE-B foram detectados os ácidos protocatéuico e clorgênico. Já a presença de (+)-catequina e (-)-epicatequina foi duvidosa, uma vez que os picos com TR equivalentes são muito pequenos. Em FAE-C e FAE-D foram detectados picos dos quatro padrões avaliados.

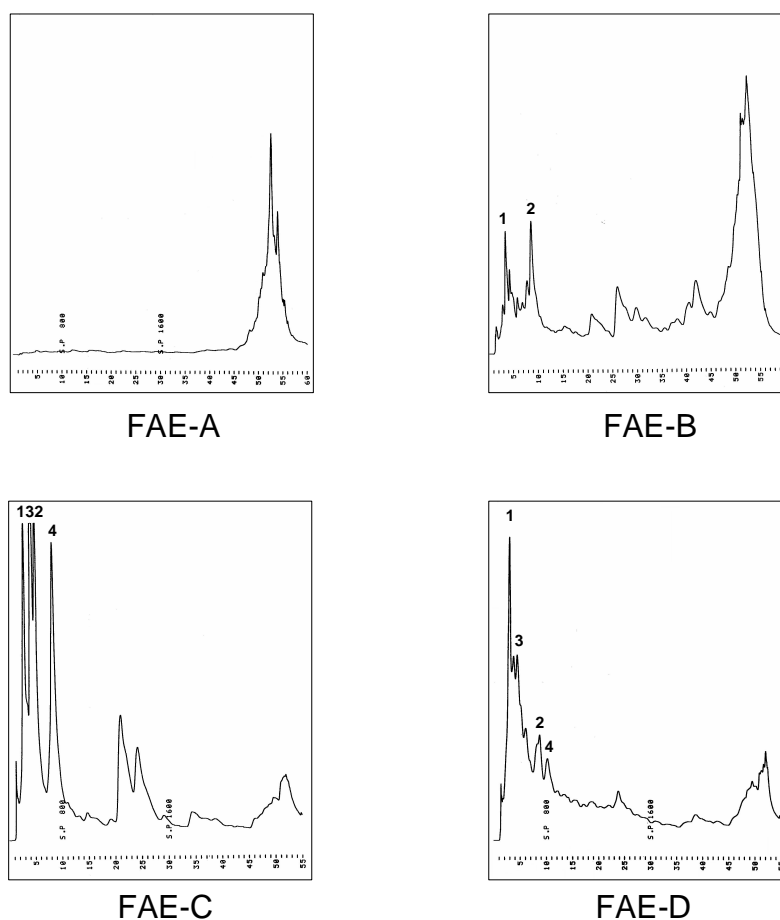


FIGURA 45. Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, para as sub-frações obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 da fração acetato de etila (FAE).

Sistema cromatográfico 6 – Detecção no UV 280 nm.

5.7.3.2. FRAÇÃO FB1

FB1 se dissolvia bem, mas não totalmente, em metanol, permitindo seu fracionamento em coluna de Sephadex LH-20, que foi eluída com metanol. Realizaram-se, de forma independente, seis colunas com 1 g de FB1 por coluna, obtendo-se uma boa separação. Após a reunião das frações coletadas, a FB1 originou cinco sub-frações (FIGURA 46). Como se pode ver na TABELA 48, que reúne as porcentagens de cada uma delas, em relação a FB1, recuperaram-se 89,5% da fração FB1, os 10,5 % restantes podem ter-se perdido, principalmente durante a dissolução, filtração e adição da amostra na coluna e uma pequena proporção pode ter ficado retida, por isso a coluna foi lavada com metanol, antes de ser novamente utilizada. Ainda assim a quantidade de resíduo obtido foi muito pequena.



FIGURA 46. CROMATOGRAMA POR CCD DE FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE FB1 EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20

FASE ESTACIONÁRIA: Placas de gel de sílica 60 G (Merck)

FASE MÓVEL: Acetato de etila - ac. fórmico - ac. acético - água (100:11:11:27)

REVELADOR: Aspersão com anisaldeído /ácido sulfúrico e visualização no visível e no UV ³⁶⁵

A sub-fração FB1-C, de cor amarela, apresentou um teor de flavonóides de quase 90% (TABELA 49) indicando que nesta sub-fração se concentraram a maior parte dos flavonóides da amostra. As sub-frações FB1-D e FB1-E, de cor

marrom e ricas em proantocianidinas, também contêm flavonóides, mas em proporção muito menor que a sub-fração FB1-C. As sub-frações FB1-A e FB1-B apresentam teores muito baixos tanto de flavonóides como de proantocianidinas.

TABELA 48 – MASSAS E PORCENTAGENS RELATIVAS A FB1 DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS POR FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20

Massa de FB1: 8284 mg

SUB-FRAÇÃO	MASSA (mg)	%
FB1-A	870,5	10,6
FB1-B	948,4	11,5
FB1-C	2170,9	26,4
FB1-D	1135,3	13,8
FB1-E	2236,7	27,2
TOTAL	7361,8	89,5

TABELA 49 – TEOR DE FLAVONÓIDES E DE PROANTOCIANIDINAS NAS SUB-FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA DE FB1 EM SEPHADEX LH-20

FRAÇÃO	TEOR DE FLAVONÓIDES % \pm IC _{95%}	TEOR DE PROANTOCIANIDINAS % \pm IC _{95%}
FB1	32,37 \pm 3,01	15,00 \pm 1,25
FB1-A	0,44 \pm 0,08	1,58 \pm 0,34
FB1-B	2,70 \pm 0,28	1,85 \pm 0,34
FB1-C	89,74 \pm 3,66	5,55 \pm 0,37
FB1-D	11,35 \pm 0,34	19,99 \pm 1,90
FB1-E	8,99 \pm 0,27	31,02 \pm 0,60

Os perfís por HPLC, a 280 nm (FIGURA 47), mostram que a FB1-A é constituída por flavonóides livres, uma vez que eluíram na mesma região que a

quercetina e o canferol. FB1-B apresenta um perfil com picos em todo o cromatograma, predominando o grupo de picos correspondentes às agliconas de flavonóides. Em FB1-C predominam os picos correspondentes aos glicosídeos de flavonóides (TR 18-35 min), e o pico do ácido clorogênico. FB1-D é constituída, principalmente, por compostos altamente polares, com tempos de retenção inferiores a 10 min. Ainda que pequenos, reconhecem-se, também, os picos correspondentes aos glicosídeos de flavonóides. FB1-E apresenta perfil semelhante a FB1-D, mas com menos picos na região de compostos altamente polares, e com picos muito pequenos na região dos glicosídeos de flavonóides.

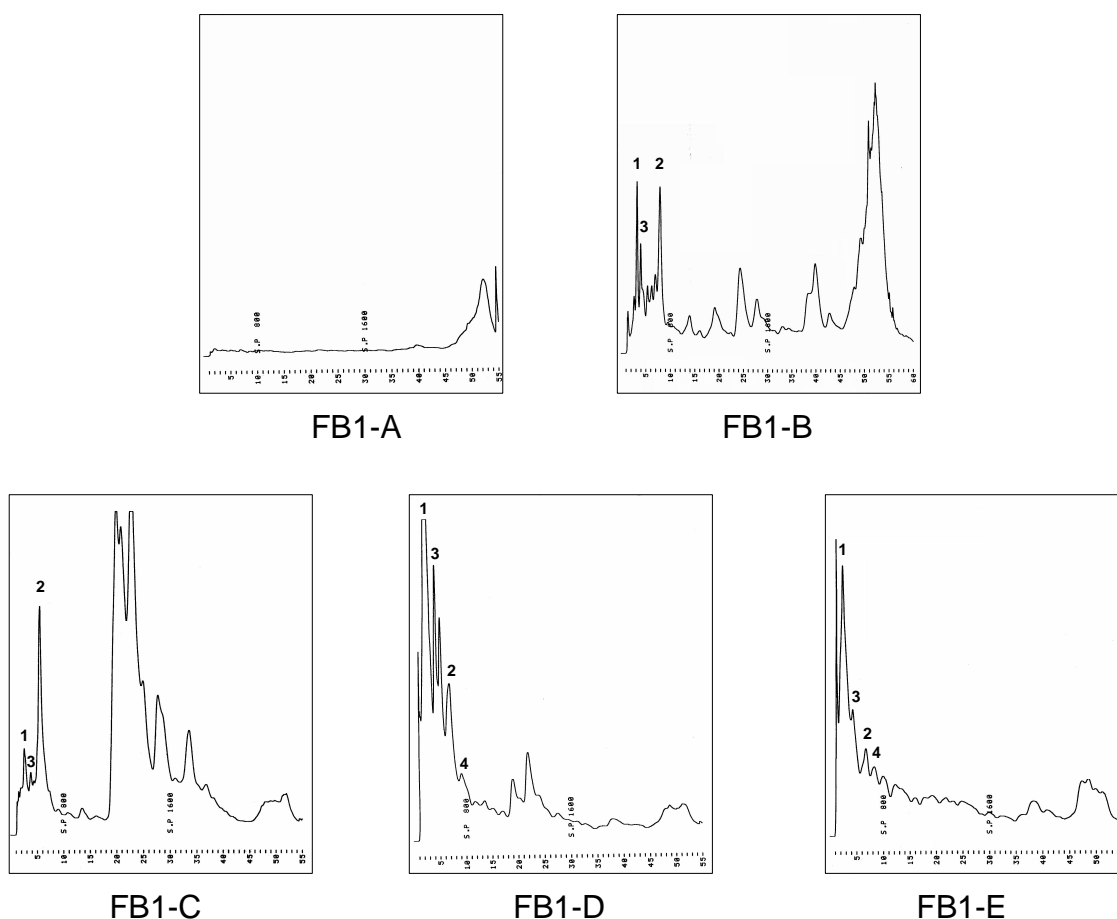


FIGURA 47. Perfís cromatográficos por HPLC das sub-frações obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 da fração butanólica (FB1). Sistema cromatográfico 6 – Detecção no UV 280 nm.

1: ácido protocatéquico, 2: ácido clorogênico, 3: (+)-catequina, 4: (-)-epicatequina

Tanto em FB1 como nas sub-frações FB1-D e FB1-E identificaram-se, na região de compostos de alta polaridade, por co-injeção com soluções padrões, ácido protocatéuico, ácido clorogênico, (+)-catequina e (-)-epicatequina, nas sub-frações FB1-B e FB1-C não foi detectada a (-)-epicatequina.

5.7.3.3. FRACIONAMENTO DA SUB-FRAÇÃO FB1-C EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20

Fez-se uma nova cromatografia em Sephadex LH-20, empregando-se metanol como eluente, visando uma melhor separação dos flavonóides presentes na sub-fração FB1-C. Para não saturar a coluna, dividiu-se a amostra em quatro porções de 500 mg, que foram cromatografadas separadamente. Após reunir as frações, obtiveram-se cinco grupos, cujas porcentagens relativas à quantidade de FB1-C são apresentados na TABELA 50.

TABELA 50 – MASSAS E PORCENTAGENS RELATIVAS A FB1 DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS POR FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20

Massa de FB1-C: 1505,3 mg

SUB-FRAÇÃO	MASSA (mg)	%
FB1-C-1	500,5	33,2
FB1-C-2	170,5	11,3
FB1-C-3	328,4	21,8
FB1-C-4	204,6	13,6
FB1-C-5	106,6	7,1
TOTAL	1310,6	87,0

Os cromatogramas obtidos por HPLC (FIGURA 48) mostram predominância de picos correspondentes a glicosídeos de flavonóides nas subfrações FB1-C-3 e FB1-C-4. A subfração FB1-C-5 contém compostos polares dentre os quais pode-

se identificar ácido protocatéquico, ácido clorogênico e catequina, e picos pequenos de glicosídeos de flavonóides. As subfrações FB1-C-1 e FB1-C-2, mais complexas continham tanto ácido clorogênico como vários picos na região dos glicosídeos de flavonóides.

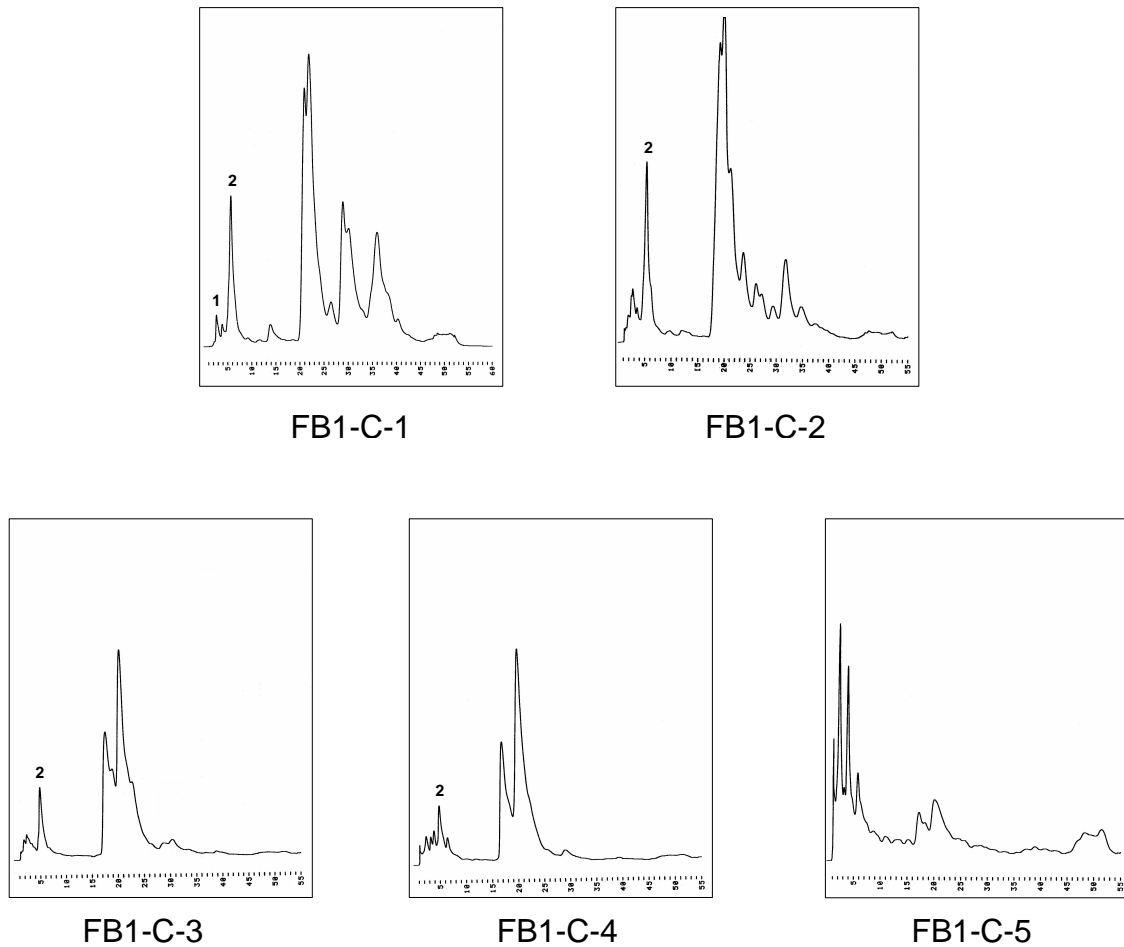


FIGURA 48. Perfís cromatográficos, por HPLC, das sub-frações obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 da subfração FB1-C.

Sistema cromatográfico 6 – Detecção no UV 280 nm.

1: ácido protocatéquico, 2: ácido clorogênico.

5.7.3.4. RE-CROMATOGRAFIA DE FB1-D EM SEPHADEX LH-20

A sub-fração FB1-D foi re-cromatografada em coluna de Sephadex LH-20 com eluição por gradiente metanol-água (1:1), metanol-água (75:25) e metanol (100%), dando origem, depois de reunir as frações coletadas da coluna, a 14 sub-frações. Análise por CCD evidenciou, pelo menos, duas manchas correspondentes a flavonóides e, no mínimo, cinco manchas definidas, atribuídas a catequinas e/ou proantocianidinas, com R_fs diferentes. Não foi possível obter nenhuma substância pura. Ainda assim, pelos perfís por CCD e HPLC, evidenciou-se a predominância de catequinas e/ou proantocianidinas.

A sub-fração FB1-E, não foi recromatografada, uma vez que pela semelhança com FB1-D, deveria apresentar um comportamento de separação semelhante.

5.8. ATIVIDADE VASODILATADORA EM ANÉIS DE AORTA PRÉ-CONTRAÍDOS COM FENILEFRINA

5.8.1. EXTRATOS

Inicialmente compararam-se as atividades de extratos aquosos preparados por decocção (AQ) e etanólicos (E), etanol-água 7:3 (EA) e acetona-água (7:3) preparados por sonicação, a partir de duas amostras de folhas de *Cecropia glaziovii*, RD-C-M e SP-S-M-2. Observaram-se diferenças significativas nas atividades, sendo que extratos mais ricos em flavonóides e proantocianidinas foram mais ativos, confirmando a atividade vasorelaxante relatada para estas classes de metabólitos. Os extratos RD-C-M-AA e SP-S-M-2-E, com teores semelhantes de proantocianidinas, mas com diferentes teores de flavonóides apresentaram diferentes atividades vasorelaxantes o que confirma a importância dos flavonóides nesta atividade. Evidenciou-se, também o efeito do extrato em função do solvente de extração, sendo que os extratos hidroacetônicos e hidroetanólicos apresentaram as maiores porcentagens de relaxamento (FIGURA 49, TABELA 51).

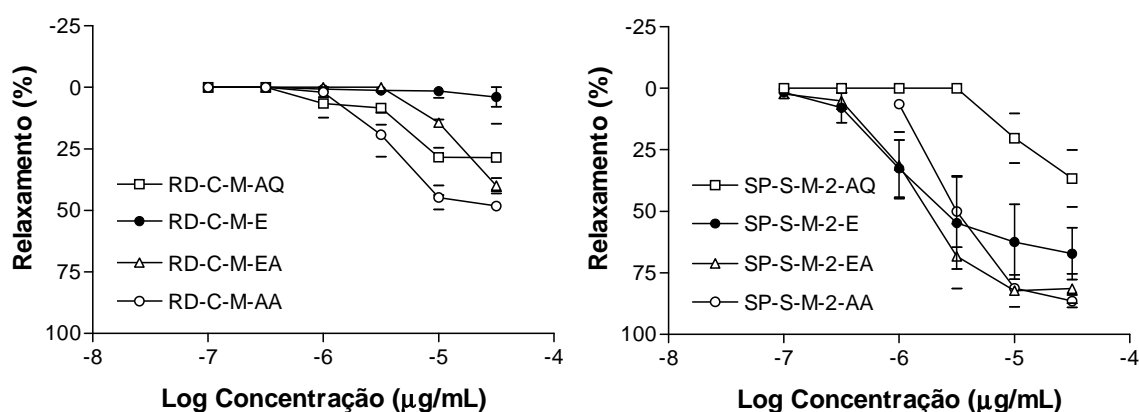


FIGURA 49. Porcentagem de relaxamento de anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina para extrato aquoso preparado por decocção (AQ) e etanólico (E), etanol-água 7:3 (EA) e acetona-água (7:3) preparados por sonicação a partir de folhas de *Cecropia glaziovii*.

RD: Parque Estadual do Rio Doce, SP: Serra da Piedade, C: época chuvosa, S: época seca, M: folhas maduras. n = 5.

TABELA 51. TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS DE *CECROPIA GLAZIOVII* PREPARADOS COM DIFERENTES SOLVENTES VS VASORELAXAÇÃO DE ANÉIS DE AORTA

EXTRATOS *	TEOR DE FLAVONÓIDES (% ± IC _{95%})	TEOR DE PROANTOCIA -NIDINAS (% ± IC _{95%})	RELAXAMENTO (% ± IC _{95%}) n = 5		CI ₅₀ (µg/mL ± IC _{95%})
			Concentração 10 ^{-4,5} µg/mL	Concentração 10 ^{-4,0} µg/mL	
RD-C-M-E	2,6 ± 0,3	5,5 ± 0,8	4,0 ± 5,0	22,6 ± 15,1	n.d
RD-C-M-EA	5,3 ± 0,8	10,2 ± 1,2	40,1 ± 3,8	53,6 ± 6,7	n.d
RD-C-M-AA	4,6 ± 0,7	19,0 ± 2,2	48,3 ± 0,6	34,9 ± 16,0	n.d
RD-C-M-AQ	1,1 ± 0,5	4,4 ± 0,5	28,5 ± 18,6	64,7 ± 7,2	n.d
SP-S-M-2-E	11,6 ± 0,8	19,5 ± 1,0	67,3 ± 13,2	n.d.	1,9 ± 0,1
SP-S-M-2-EA	13,6 ± 0,1	16,9 ± 1,2	81,5 ± 7,4	91,7 ± 10,3	1,2 ± 0,2
SP-S-M-2-AA	13,11 ± 1,0	20,1 ± 1,8	86,6 ± 3,1	n.d.	3,0 ± 0,3
SP-S-M-2-AQ	10,9 ± 1,3	8,7 ± 0,6	36,7 ± 14,4	46,3 ± 26,9	n.d

* Preparados por sonicação na proporção 1g / 33 mL com etanol 96% (E), etanol-água (7:3) (EA), acetona-água (7:3) e por decocção na proporção 1g / 25 mL com água (AQ).
n.d.: não determinado.

Compararam-se extratos de pecíolos e lâminas foliares do mesmo espécimen (SP-S-M-8), preparados por sonicação com etanol-água 7:3, na proporção droga - solvente de 1g / 33 mL. Observou-se que o extrato de pecíolo, com menor teor de flavonóides e maior teor de proantocianidinas que o extrato de lâmina foliar, apresentou maior porcentagem de vasorelaxação (FIGURA 50, TABELA 52). Este resultado se deve a que as proantocianidinas são mais ativas que os flavonóides e indica que, para se preparar extratos com potencial atividade anti-hipertensiva convém utilizar os pecíolos da folhas de *C. glaziovii*.

Os resultados obtidos para os extratos de lâminas foliares de folhas maduras de *C. glaziovii* (espécimen: SP-Jun-M) preparados com diferentes misturas hidroetanólicas, utilizando-se ultra-som e a proporção droga - solvente de 1 g / 33 mL, e do extrato aquoso liofilizado preparado por decocção na proporção de 1 g / 25 mL estão representados na FIGURA 51 e na TABELA 53.

O extrato aquoso liofilizado (AQ-Liof) e o extrato etanol-água 3:7 (EA 3:7), com teores de flavonóides semelhantes (10,0 e 10,6%, respectivamente), apresentam

diferentes perfis de vasorelaxação. O extrato EA 3:7 apresenta vasorelaxação completa enquanto o AQ-LIOF produz somente 77% de relaxação. O menor teor de proantocianidinas (8,7%) no extrato aquoso, em relação ao EA 3:7 (14,9%) deve ser um fator responsável pela diferença observada.

O extrato etanol-água 1:1 (EA 1:1) apresentou a menor porcentagem de relaxamento, 51%, apesar de apresentar teores de flavonóides e proantocianidinas semelhantes aos outros extratos hidroetanólicos, sugerindo que além do teor de flavonóides e proantocianidinas, outros compostos presentes influenciam a atividade vasorelaxante ou que a natureza dos flavonóides e proantocianidinas presentes nestes extratos seja distinta.

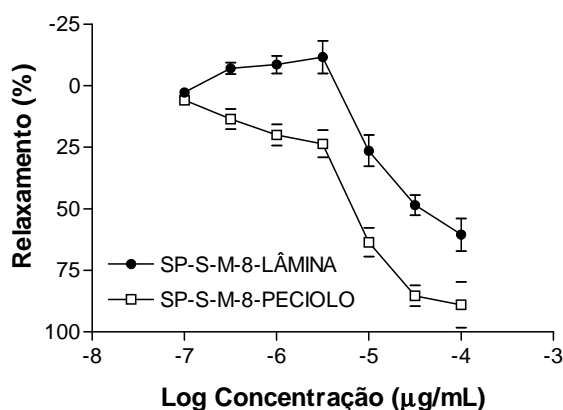


FIGURA 50. Porcentagem de relaxamento de anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina para extratos etanol-água 7:3 (EA) de pecíolos e lâminas foliares de folhas maduras de *Cecropia glaziovii* do mesmo espécimen (SP-S-M-8). n = 5.

TABELA 52. TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS DE PECÍOLO E LÂMINA FOLIAR DE FOLHAS MADURAS DE *CECROPIA GLAZIOVII* VS VASORELAXAÇÃO EM ANÉIS DE AORTA

EXTRATOS *	TEOR DE FLAVONÓIDES (% ± IC _{95%})	TEOR DE PROANTOCIA- -NIDINAS (% ± IC _{95%})	RELAXAMENTO (% ± IC _{95%}) n = 5		CI ₅₀ (µg/mL ± IC _{95%})
			Concentração 10 ^{-4,5} µg/mL	Concentração 10 ^{-4,0} µg/mL	
LÂMINA	9,9 ± 0,6	14,1 ± 2,0	48,6 ± 5,1	60,6 ± 5,3	n.d.
PECÍOLO	0,4 ± 0,1	17,8 ± 1,9	85,5 ± 8,2	89,1 ± 11,5	7,8 ± 0,9

* Preparados por sonicção na proporção 1 g / 33 mL com etanol-água (7:3) a partir de folhas maduras de SP-S-M-8.
n.d.: não determinado.

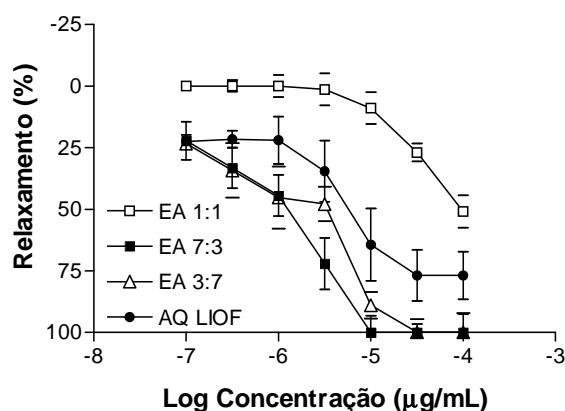


FIGURA 51. Porcentagem de relaxamento de anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina para extratos aquoso liofilizado (AQ-LIOF) e etanol-água (EA) de lâminas foliares de folhas maduras de *Cecropia glaziovii*.

Amostra: SP-Jun-M. n = 5.

TABELA 53. TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS DE *CECROPIA GLAZIOVII* PREPARADOS COM ÁGUA E MISTURAS HIDROETANÓLICAS VS VASORELAXAÇÃO EM ANÉIS DE AORTA

EXTRATOS *	TEOR DE FLAVONÓIDES (% ± IC _{95%})	TEOR DE PROANTOCIA -NIDINAS (% ± IC _{95%})	RELAXAMENTO (% ± IC _{95%}) n = 5		CI ₅₀ (µg/mL ± IC _{95%})
			Concentração 10 ^{-4,5} µg/mL	Concentração 10 ^{-4,0} µg/mL	
AQ-LIOF	10,0 ± 0,5	8,7 ± 0,9	76,9 ± 12,9	76,9 ± 12,0	6,4 ± 0,9
EA 3:7	10,6 ± 1,1	14,9 ± 2,4	100,0 ± 6,4	100,0 ± 9,7	4,6 ± 0,4
EA 1:1	11,0 ± 0,9	15,4 ± 1,4	27,0 ± 4,6	51,0 ± 8,2	n.d.
EA 7:3	11,1 ± 1,3	15,2 ± 0,8	100,0 ± 4,1	100,0 ± 9,2	1,8 ± 0,1

* Preparados por sonicção na proporção 1g / 33 mL com etanol-água e por decocção na proporção 1g / 25 mL com água (AQ-LIOF). Amostra SP-Jun-M n.d.: não determinado.

Para avaliar o efeito da metodologia extrativa, prepararam-se extratos etanol-água (1:1), por maceração, percolação contínua, percolação com repouso e ultrasom (item 4.3.5.3.), na proporção de 1 g / 43 mL de solvente. Maiores atividades vasorelaxantes foram obtidas para os extratos preparados por maceração e por percolação com repouso, nessa ordem (FIGURA 52, TABELA 54). Comparando-

se os resultados para os extratos EA 1:1 preparados por sonicação, nas proporções de 1 g / 33 mL e de 1 g / 43 mL (FIGURAS 51 e 52, TABELAS 53 e 54) observa-se que, um incremento de duas vezes no teor de proantocianidinas gerou somente um incremento de 10% na vasorelaxação sugerindo, uma vez mais, que a atividade vasorelaxante dos anéis de aorta não depende somente do teor de proantocianidinas, como também do tipo estrutural destas.

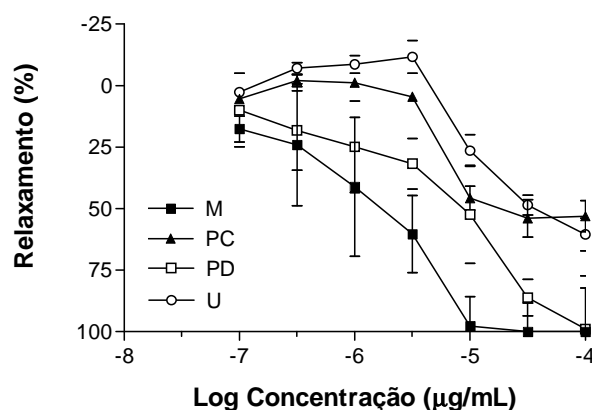


FIGURA 52. Porcentagem de relaxamento de anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina para extratos em etanol-água (1:1) de lâminas foliares de folhas maduras de *Cecropia glaziovii*, preparados por maceração (M), percolação contínua (PC), percolação descontínua (PD) e com ultra-som (U). Amostra: SP-Jun-M. n = 5.

TABELA 54. TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS EM EXTRATOS ETANOL-ÁGUA (1:1) DE *CECROPIA GLAZIOVII* PREPARADOS EMPREGANDO DIFERENTES METODOLOGIAS EXTRATIVAS VS VASORELAXAÇÃO EM ANÉIS DE AORTA

MÉTODO *	TEOR DE FLAVONÓIDES (% ± IC _{95%})	TEOR DE PROANTOCIANIDINAS (% ± IC _{95%})	RELAXAMENTO (% ± IC _{95%}) n = 5		CI ₅₀ (µg/mL ± IC _{95%})
			Concentração 10 ^{-4,5} µg/mL	Concentração 10 ^{-4,0} µg/mL	
MACERAÇÃO	7,4 ± 1,3	37,9 ± 3,8	100,0 ± 6,4	100,0 ± 9,8	2,4 ± 0,9
PERCOLAÇÃO CONTÍNUA	10,5 ± 1,4	29,9 ± 1,1	54,0 ± 9,4	53,1 ± 7,8	n.d.
PERCOLAÇÃO DESCONTÍNUA	8,3 ± 0,6	35,1 ± 2,5	86,2 ± 4,1	99,0 ± 12,0	13,6 ± 1,0
ULTRA-SOM	10,6 ± 1,0	36,2 ± 4,6	48,6 ± 5,1	60,6 ± 8,2	n.d.

* Extratos preparados na proporção 1 g / 43 mL. n.d.: não determinado.

5.8.2. FRAÇÕES

Os resultados das frações obtidas por partição entre solventes imiscíveis mostram que a maioria das frações não alcançou a atividade vasorelaxante observada para o extrato aquoso liofilizado que lhes deu origem, apesar de algumas delas terem apresentado maiores teores de flavonóides e proantocianidinas. Este resultado pode dever-se a efeitos sinérgicos entre as substâncias presentes no extrato. A maior atividade vasorelaxante foi observada para FB1, sendo superior, inclusive, àquela observada para FB2, fração obtida diretamente do extrato aquoso, sem a pré-extração com acetato de etila. FB1 foi a única fração que apresentou maiores porcentagens de relaxamento que o extrato aquoso liofilizado (AQ-LIOF), concluindo-se que nesta fração se concentraram as substâncias ativas. Estes resultados sugerem que o acetato de etila extrai, além das substâncias ativas, compostos antagonistas da atividade vasorelaxante, presentes no extrato aquoso. FAQ2 e FAQ3 causaram as menores porcentagens de relaxamento confirmando que os solventes orgânicos empregados nas partições extraíram eficientemente os compostos ativos. (FIGURA 53, TABELA 55).

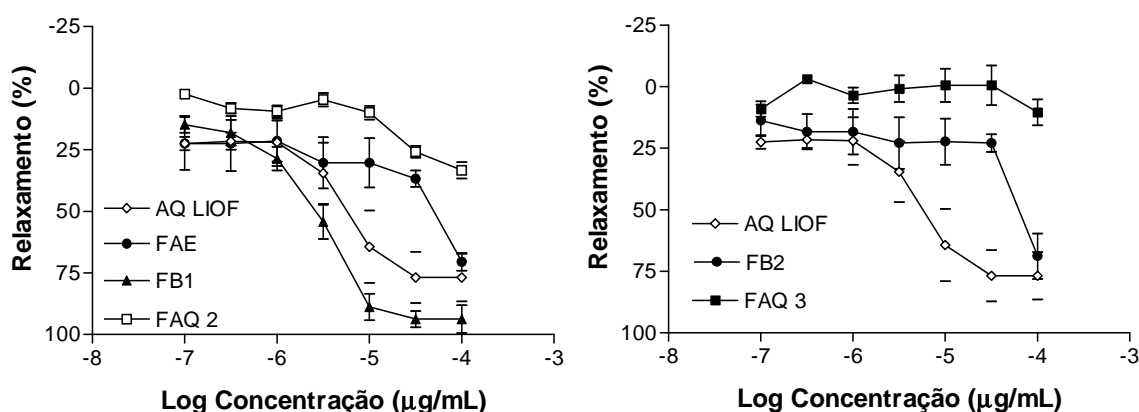


FIGURA 53. Atividade vasorelaxante de anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina para frações obtidas por partição entre solventes imiscíveis de extrato aquoso liofilizado (AQ-LIOF) de folhas maduras de *Cecropia glaziovii*.

FAE: fração acetato de etila, FB: fração butanólica, FAQ: fração aquosa (Para o fluxograma das partições vide: FIGURA 3) n = 5.

TABELA 55. TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS VS PORCENTAGEM DE RELAXAMENTO DE ANÉIS DE AORTA PRÉ-CONTRAÍDOS COM FENILEFRINA PARA FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÃO ENTRE SOLVENTES IMISCÍVEIS DO EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO (AQ-LIOF) DE FOLHAS MADURAS DE *CECROPIA GLAZIOVII*.

FRAÇÕES *	TEOR DE FLAVONÓIDES (% ± IC _{95%})	TEOR DE PROANTOCIA -NIDINAS (% ± IC _{95%})	RELAXAMENTO (% ± IC _{95%}) n = 5		CI ₅₀ (µg/mL ± IC _{95%})
			Concentração 10 ^{-4,5} µg/mL	Concentração 10 ^{-4,0} µg/mL	
AQ-LIOF	10,0 ± 0,5	8,7 ± 0,9	76,9 ± 12,9	76,9 ± 12,0	6,4 ± 0,9
FAE	12,2 ± 1,0	13,6 ± 1,1	36,8 ± 4,1	70,6 ± 4,3	n.d.
FB1	32,4 ± 3,0	15,0 ± 1,3	93,8 ± 4,1	93,8 ± 7,1	2,9 ± 0,3
FAQ2	2,3 ± 0,4	6,4 ± 0,9	25,9 ± 3,0	33,4 ± 4,1	n.d.
FB2	29,8 ± 1,3	17,7 ± 2,4	23,0 ± 4,5	68,9 ± 11,4	n.d.
FAQ3	6,2 ± 0,3	2,8 ± 0,5	8,1 ± 10,1	5,3 ± 6,6	n.d.

*vide Figura 2 e itens 4.3.6.2. e 5.5.6.2 n.d.: não determinado.

5.8.3. SUB-FRAÇÕES

Na FIGURA 54 e na TABELAS 56 e 57 estão os resultados dos ensaios de relaxação em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina para as sub-frações resultantes da cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 de FAE e FB1. As sub-frações mais ativas, FAE-C, FAE-D, FB1-D e FB1-E têm, em comum, a predominância de proantocianidinas. Já a subfração FB1-C, fortemente enriquecida em flavonóides, apresenta maior atividade que FB1-A e FB1-B, com baixos teores de flavonóides e proantocianidinas, mas menor atividade que as sub-frações FB1-D e FB1-E, ricas em proantocianidinas. Estes resultados confirmam que tanto flavonóides como proantocianidinas estão envolvidos na atividade vasorelaxante de folhas de *Cecropia glaziovii*, sendo mais intenso o efeito das proantocianidinas.

Das sub-frações analisadas, a mais ativa foi FB1-E. Ainda assim, vale a pena ressaltar que FB1-D com 20% de proantocianidinas, apresentou uma porcentagem de relaxação (86%) igual a de FB1-E, com 31% de proantocianidinas, apenas pelo aumento da concentração de 10^{-4,5} µg/mL para

$10^{-4.0}$ $\mu\text{g/mL}$. Para estas concentrações, FB1-E apresentou porcentagens de inibição muito próximas 85,6 e 87,0%, respectivamente. FB1-D foi eluída do Sephadex LH-20 antes de FB1-E, o que poderia indicar que contém compostos de menor volume molecular o que, no caso das proantocianidinas significaria menos unidades catéquicas. Estes resultados sugerem que proantocianidinas com diferentes números de unidades catéquicas apresentam diferentes propriedades vasorelaxantes, mas que, com ajustes de concentração adequados, podem produzir o mesmo efeito vasorelaxante das mais potentes. Cabe lembrar que o Sephadex LH-20 age, em parte, como adsorvente, assim, além do volume molecular, a polaridade das moléculas influencia a ordem de eluição.

Nenhuma das sub-frações de FB1 alcançou a porcentagem de relaxação da fração original e somente uma das sub-frações de FAE superou a porcentagem de relaxamento da fração mãe. Estes fatos indicam que a atividade não se deve, unicamente, a um grupo de compostos, mas a um possível sinergismo.

As FIGURAS 45 e 47 (item 5.5.7.3.) mostram que FAE-A e FB1-A estão constituídas, principalmente, por compostos com tempos de retenção semelhantes aos da quecetina e do canferol, pelo que se deduz que contenham flavonóides livres. Estas sub-frações, ainda que com baixos porcentagens de relaxação, apresentam atividade, indicando que os flavonóides livres também participam do efeito vasorelaxante das folhas de *C. glaziovii*.

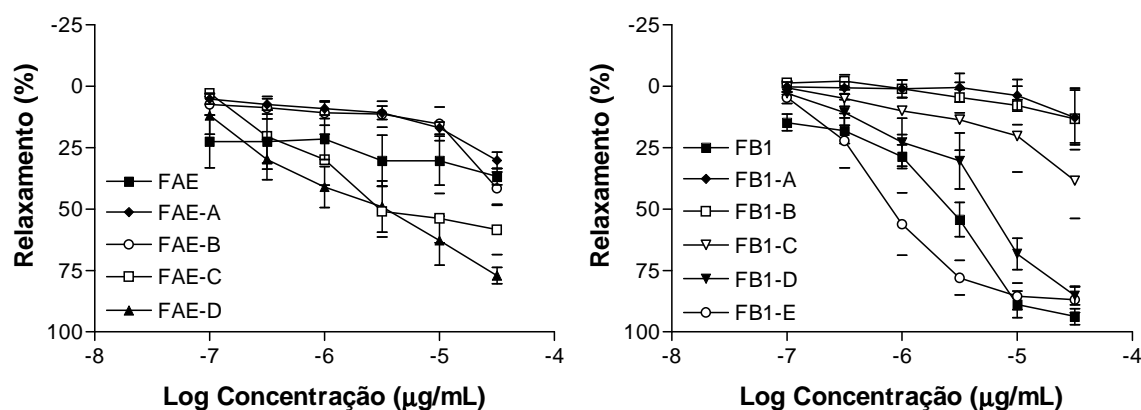


FIGURA 54. Atividade vasorelaxante em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina para sub-frações obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 FAE: fração acetato de etila, FB1: fração butanólica 1. $n = 5$.

TABELA 56. PORCENTAGEM DE RELAXAMENTO EM ANÉIS DE AORTA PRÉ-CONTRAÍDOS COM FENILEFRINA PARA SUB-FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20 A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE)

SUB-FRAÇÕES *	RELAXAMENTO (% ± IC _{95%}) n = 5		CI ₅₀ (µg/mL ± IC _{95%})
	Concentração 10 ^{-4,5} µg/mL	Concentração 10 ^{-4,0} µg/mL	
FAE	36,8 ± 4,1	70,6 ± 4,3	n.d.
FAE-A	17,1 ± 3,0	30,3 ± 4,1	n.d.
FAE-B	41,6 ± 8,2	n.d.	n.d.
FAE-C	53,9 ± 12,5	58,5 ± 12,5	7,0 ± 1,2
FAE-D	62,9 ± 12,4	77,2 ± 4,2	2,6 ± 0,4

*vide itens 4.3.6.2. e 5.5.6.3. n.d.: não determinado.

TABELA 57. PORCENTAGEM DE RELAXAMENTO EM ANÉIS DE AORTA PRÉ-CONTRAÍDOS COM FENILEFRINA PARA SUB-FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20 A PARTIR DA FRAÇÃO BUTANÓLICA 1 (FB1)

SUB-FRAÇÕES *	TEOR DE FLAVONÓIDES (% ± IC _{95%})	TEOR DE PROANTOCIA-NIDINAS (% ± IC _{95%})	RELAXAMENTO (% ± IC _{95%}) n = 5		CI ₅₀ (µg/mL ± IC _{95%})
			Concentração 10 ^{-4,5} µg/mL	Concentração 10 ^{-4,0} µg/mL	
FB1	32,4 ± 3,0	15,0 ± 1,3	93,8 ± 4,1	93,8 ± 7,1	2,9 ± 0,3
FB1-A	0,4 ± 0,1	1,6 ± 0,3	3,8 ± 6,4	12,8 ± 13,9	n.d.
FB1-B	2,7 ± 0,3	1,9 ± 0,3	7,9 ± 9,6	13,2 ± 15,5	n.d.
FB1-C	89,7 ± 3,7	5,6 ± 0,4	20,3 ± 18,2	93,8 ± 7,9	n.d.
FB1-D	11,4 ± 0,3	20,0 ± 1,9	38,4 ± 19,1	85,3 ± 3,7	6,5 ± 0,9
FB1-E	9,0 ± 0,3	31,0 ± 0,6	85,6 ± 6,7	87,0 ± 6,5	0,5 ± 0,1

* vide itens 4.3.6.2. e 5.5.6.3. n.d.: não determinado.

A recromatografia de FB1-C levou a cinco sub-frações (item 5.5.7.3.-C). Duas delas, FB1-C-1 e FB1-C-4 foram analisadas quanto à sua atividade vasorelaxante. FB1-C-4, com um menor número de picos no cromatograma obtido por HPLC (FIGURA 48), apresentou maior porcentagem de vasorelaxação que FB1-C-1, subfração mais complexa (FIGURA 55, TABELA 58). No

cromatograma de FB1-C-4 observam-se picos na região dos flavonóides glicosilados (TR: 15-25 min.), sendo um deles, possivelmente, da isoorientina. FB1-C-4 apresentou maior atividade vasorelaxante que FB1-A (FIGURA 54, TABELA 57), que é constituída principalmente por flavonóides livres, sugerindo que os flavonóides glicosilados apresentam maior atividade que as agliconas. Cabe ressaltar que assim como FB1-C apresentou uma atividade vasorelaxante muito menor que FB1, até a concentração de $10^{-4,5}$, se mantinha essa tendência para FB1-C-1 e FB1-C-4. No entanto, constata-se que um aumento da concentração de $10^{-4,5}$ $\mu\text{g/mL}$ a $10^{-4,0}$ $\mu\text{g/mL}$ aumenta 2,5 vezes a atividade de FB1-C e três vezes a porcentagem de atividade de FB1-C-4, o que sugere, novamente, que pequenas variações nesta faixa, podem influenciar de forma marcante a atividade vasodilatadora.

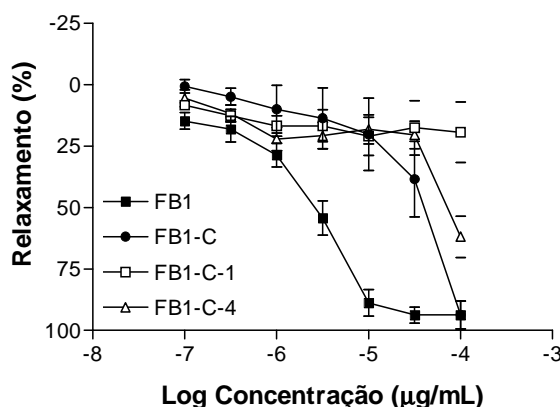


FIGURA 55. Atividade vasorelaxante em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina para sub-frações obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 a partir de FB1-C. $n = 5$.

TABELA 58. PORCENTAGEM DE RELAXAMENTO DE ANÉIS DE AORTA PRÉ-CONTRAÍDOS COM FENILEFRINA PARA SUB-FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRÁFIA EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20 A PARTIR DE FB1-C

SUB-FRAÇÕES *	RELAXAMENTO (% \pm IC _{95%}) $n = 5$		CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL} \pm$ IC _{95%})
	Concentração $10^{-4,5}$ $\mu\text{g/mL}$	Concentração 10^{-4} $\mu\text{g/mL}$	
FB1-C	38,4 \pm 17,6	93,8 \pm 7,9	n.d.
FB1-C-1	17,6 \pm 15,4	19,4 \pm 17,1	n.d.
FB1-C-4	20,5 \pm 7,8	62,0 \pm 11,7	n.d.

* vide itens 4.3.6.2. e 5.5.6.3. n.d.: não determinado.

Os extratos e frações mais ativos apresentaram CI_{50} entre 0,5 e 14 $\mu\text{g/mL}$ (FIGURA 56, TABELAS 51-57). A literatura registra valores de CI_{50} entre 1 e 10 μM para proantocianidinas e CI_{50} entre 1 e 100 μM para os flavonóides (HERRERA, et al., 1996; ANDRIAMBELOSON, et al., 1998; HOLLMAN & KATAN, 1999; LEMOS et al., 1999).

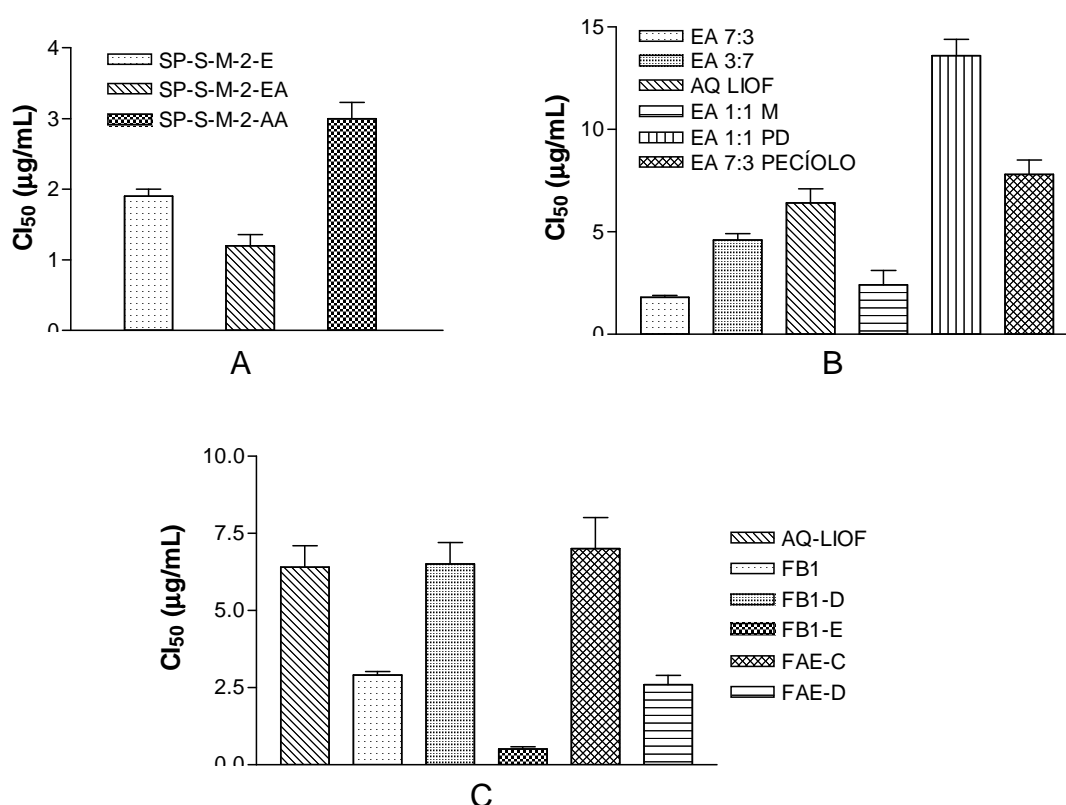


FIGURA 56. Valores de CI_{50} obtidos para os extratos e frações, de folhas de *Cecropia glaziovii*, mais ativos.

Extratos e/ou frações das amostras: A: SP-S-M-2 B,C: SP-Jun-M

SP: Serra da Piedade, S: época seca, E: etanol 96%, EA: etanol-água, AA: acetona-água. AQ-LIOF: extrato aquoso liofilizado obtido por decocção, M: maceração, PD: percolação descontínua, FB1: fração *n*-butanólica 1, FAE: fração acetato de etila.

Avaliaram-se extratos alcoólicos e frações enriquecidas em proantocianidinas de *Crataegus*, *Musanga cecropioides* e de 3 espécies de *Cecropia* quanto ao relaxamento de anéis de aorta de ratos, pré-contraídos com noradrenalina. Os teores de proantocianidinas e os valores de CI_{50} encontrados estão resumidos na TABELA 59 (FRANCK et al., 1996; FRANCK, 1998). CÔRTEZ et al. (2002) encontraram CI_{50} $3,5 \pm 0,8$ $\mu\text{g/mL}$ para uma fração acetato de etila de *Ouratea*

semiserrata contendo $21,8 \pm 1,5\%$ de proantocianidinas, no ensaio de relaxamento de anéis de aorta de ratos, pré-contraídos com fenilefrina. VIERLING et al.(2003) observaram nos ensaios de relaxamento de anéis de aorta de cobaias, pré-contraídos com noradrenalina, com extratos hidrometanólicos e hidroetanólicos de *Crataegus*, valores de CI_{50} entre 4,16 e 9,8 $\mu\text{g/mL}$. Estes extratos continham teores de flavonóides entre 0,7 e 3,4% e teores de proantocianidinas entre 8,0 e 13,5%.

TABELA 59. ATIVIDADE VASORELAXANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE CRATAEGUS, MUSANGA CECROPIOIDES, CECROPIA HOLOLEUCA, C. PACHYSTACHAYA, C. GLAZIOVII E FRAÇÕES ENRIQUECIDAS EM PROANTOCIANIDINAS.

AMOSTRAS	CI_{50} ($\mu\text{g/mL} \pm \text{s.e.m.}$) n = 6	TEOR DE PROANTOCIANIDINAS (%)
<i>Crataegus</i> (folhas e flores) Extrato metanólico	$4,3 \pm 0,3$	11,7
<i>Musanga cecropioides</i> (folhas) Extrato metanólico	$0,55 \pm 0,04$	13,5
<i>Cecropia hololeuca</i> (folhas) Extrato etanólico	$7,6 \pm 0,5$	10,7
<i>Cecropia pachystachya</i> (folhas) Extrato metanólico	$0,94 \pm 0,1$	11,4
<i>Cecropia glaziovii</i> (folhas) Extrato metanólico	$1,23 \pm 0,05$	n.d.
<i>Crataegus</i> Fração	$0,43 \pm 0,02$	c.a. 99
<i>Cecropia hololeuca</i> Fração	$1,97 \pm 0,07$	c.a. 95
<i>Cecropia glaziovii</i> Fração	$0,99 \pm 0,06$	c.a. 99

Fonte: FRANCK et al., (1996); FRANCK (1998).

5.8.4. CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS COM AS PORCENTAGENS DE RELAXAÇÃO EM ANÉIS DE AORTA

Para estabelecer a correlação entre os teores de flavonóides e proantocianidinas com as porcentagens de relaxação em anéis de aorta, calculou-se traçou-se a reta de melhor ajuste para cada caso, empregando vários modelos

matemáticos (FIGURAS 57-59; TABELA 60). Os coeficientes de determinação (r^2) obtidos quando se empregaram os teores de flavonóides ($r^2 = 0,03 - 0,21$) foram menores que os obtidos para as retas que consideraram os teores de proantocianidinas ($r^2 = 0,20 - 0,55$), observando-se, de forma geral, que os modelos logarítmicos apresentaram os melhores ajustes ao modelo de reta.

Os maiores valores obtidos para coeficiente de determinação (r^2) foram da ordem de 0,5. Ainda sem ter alcançado valores próximos à unidade para o coeficiente de determinação, estes valores permitem evidenciar que tanto flavonóides quanto proantocianidinas estão envolvidos na atividade vasorelaxante observada para os extratos e frações de folhas de *Cecropia glaziovii*, estando esta atividade relacionada em maior medida com o teor de proantocianidinas que com o teor de flavonóides, uma vez que os valores de r^2 foram maiores para as retas que consideraram os teores de proantocianidinas, que para aquelas que utilizaram os teores de flavonóides. No entanto, este resultado evidencia que os teores de flavonóides e proantocianidinas, por si só, não explicam a atividade vasorelaxante de folhas de *Cecropia glaziovii*, apesar destas classes de compostos estarem envolvidas nesta atividade. Além dos teores destes metabólitos nos extratos e frações, as características estruturais dos flavonóides e proantocianidinas devem ser relevantes.

Não há definição do requisito estrutural mínimo para a atividade vasodilatadora, sendo que compostos com estruturas químicas diversas apresentam atividades e compostos do mesmo grupo apresentam diferentes potências sendo alguns inativos e outros estruturalmente próximos, moderadamente ativos ou muito ativos. Têm-se relatado atividade vasodilatadora para proantocianidinas, catequinas, flavonóis, flavanonas, flavonas, xantonas, chalconas e antocianinas. (FRANCK et al., 1996; HERRERA et al., 1996; LEMOS et al., 1999; FRANCK, 1998, ANDRIAMBELOSON et al., 1998; HOLLMAN & KATAN, 1999; YU et al., 1999; CÔRTEZ, et al., 2002; GUERERO et al., 2002; ALVAREZ-CASTRO, CAMPOS-TOIMIL & ORALLO, 2004; CALDERONE et al., 2004 ; CHERICONI, et al., 2003; ROGHANI et al., 2004; FU et al., 2005). Sabe-se ainda que alguns compostos, por exemplo, a 3-galato(-)-epigallocatequina,

apresentam tanto atividade vasorelaxante como atividade contrátil (ALVAREZ-CASTRO, CAMPOS-TOIMIL & ORALLO, 2004). Na TABELA 61 encontram-se alguns resultados relatados na literatura para atividade vasodilatadora para alguns compostos isolados de plantas.

TABELA 60. EQUAÇÕES PARA AS RETAS DE MELHOR AJUSTE PARA A CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE FLAVONÓIDES E PROANTOCIANIDINAS E AS PORCENTAGENS DE RELAXAÇÃO OBSERVADAS PARA OS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHAS DE *CECROPIA GLAZIOVII* EMPREGANDO DIFERENTES MODELOS MATEMÁTICOS.

EQUAÇÃO DA RETA DE MELHOR AJUSTE	COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO (r^2)
FLAVONÓIDES	
$R = 0,618 F + 56,461$	0,130
$\log R = 0,006 F + 1,653$	0,097
$R = 25,765 (\log F) + 42,557$	0,205
$\log R = 0,268 (\log F) + 1,502$	0,187
$1/R = -0,0004 F + 0,033$	0,042
$R = 0,618 (1/F) + 56,461$	0,051
$1/R = 0,0095 (1/F) + 0,0244$	0,028
PROANTOCIANIDINAS	
$R = 1,493 P + 40,881$	0,286
$\log R = 0,017 P + 1,468$	0,298
$R = 53,397 (\log P) + 7,246$	0,455
$\log R = 0,636 (\log P) + 1,048$	0,545
$1/R = -0,0016 P + 0,053$	0,203
$R = -135,305 (1/P) + 81,917$	0,468
$1/R = 0,1698 (1/P) + 0,0054$	0,469
FLAVONOIDES E PROANTOCIANIDINAS	
$R = 0,917 (F+P) + 38,418$	0,369
$\log R = 0,009 (F+P) + 1,463$	0,326
$R = 57,500 [\log (F+P)] - 11,957$	0,527
$\log R = 0,626 [\log (F+P)] + 0,897$	0,528
$1/R = -0,0009 (F+P) + 0,086$	0,521
$R = -180,772 [1/(F+P)] + 77,678$	0,370
$1/R = 0,1767 [1/(F+P)] + 0,0145$	0,225

Onde:

R = Relaxação de anéis de aorta (%) - Concentração dos extratos e/ou frações: $10^{-4,0}$ $\mu\text{g/mL}$

F = Teor de flavonóides (%)

P = Teor de proantocianidinas (%)

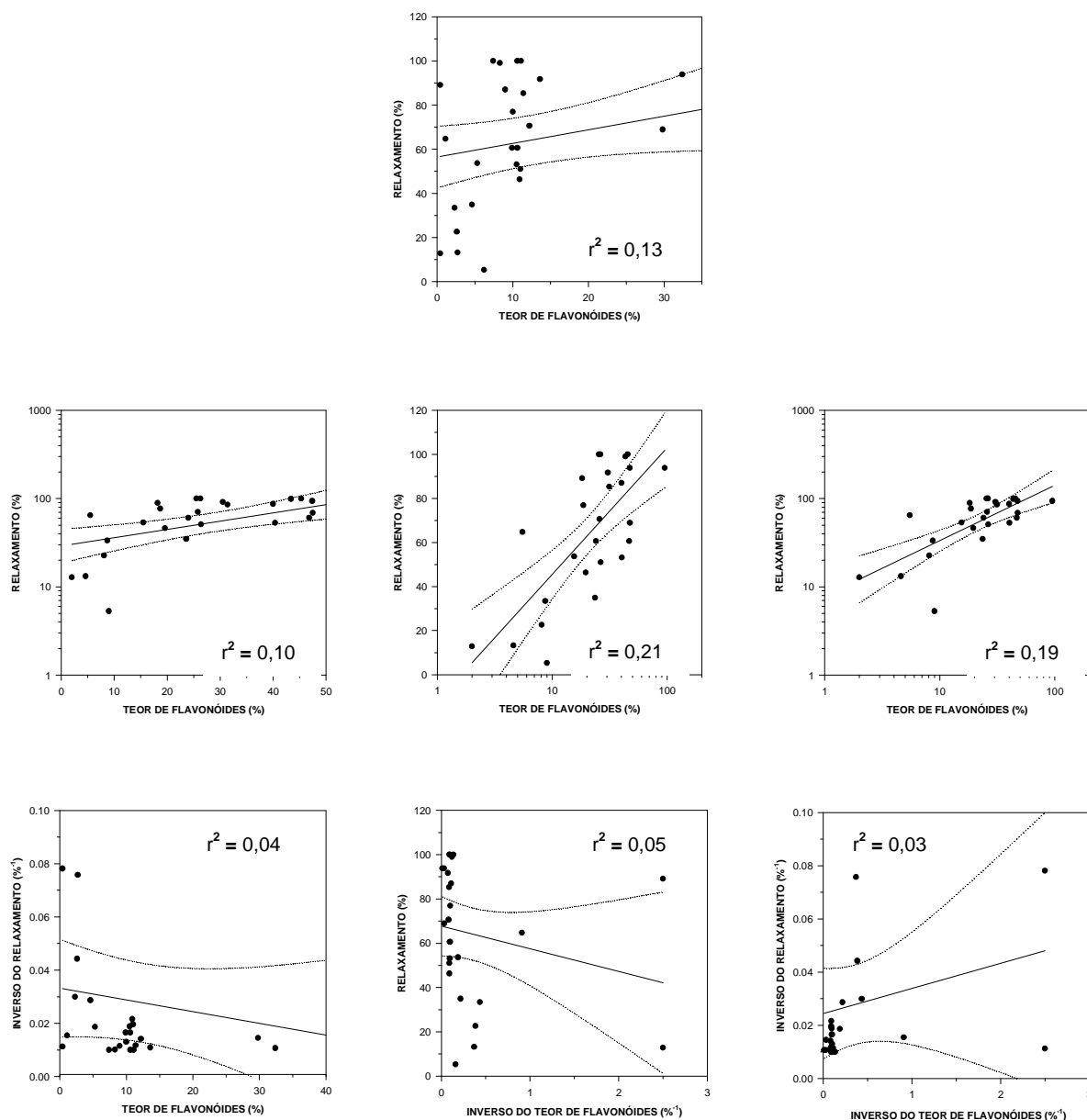


FIGURA 57. Retas de melhor ajuste para a regressão entre os teores de flavonóides e as porcentagens de relaxação observadas para os extratos e frações de folhas de *Cecropia glaziovii*.

Concentração dos extratos e/ou frações: $10^{-4,0}$ $\mu\text{g/mL}$

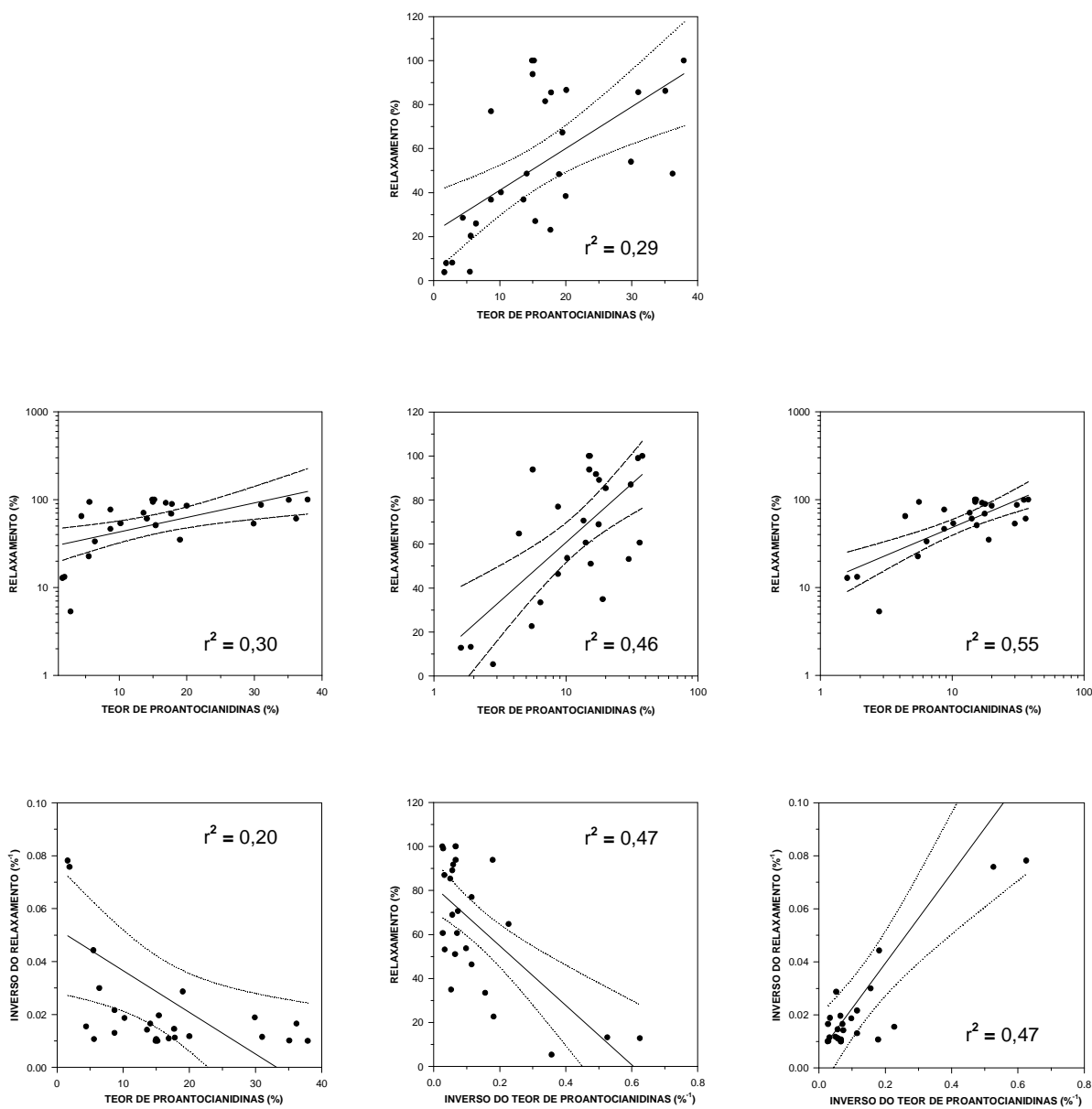


FIGURA 58. Retas de melhor ajuste para a regressão entre os teores de proantocianidinas e as porcentagens de relaxação observadas para os extratos e frações de folhas de *Cecropia glaziovii*. Concentração dos extratos e/ou frações: $10^{-4,0}$ $\mu\text{g/mL}$

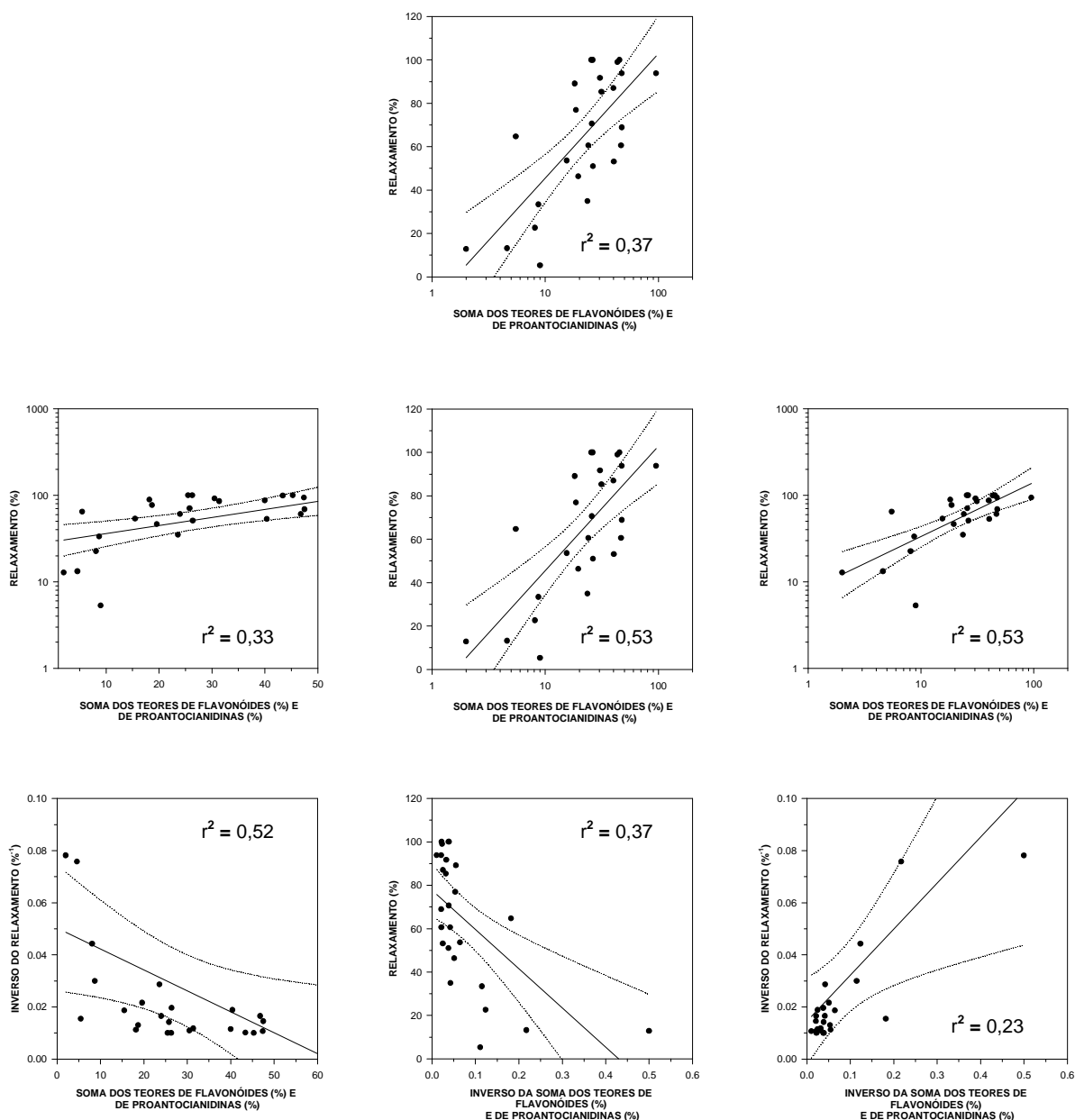


FIGURA 59. Retas de melhor ajuste para a regressão entre a soma dos teores de flavonóides e proantocianidinas e as porcentagens de relaxação observadas para os extratos e frações de folhas de *Cecropia glaziovii*.

Concentração dos extratos e/ou frações: $10^{-4,0}$ $\mu\text{g/mL}$

TABELA 61. ATIVIDADE VASODILATADORA DE ALGUNS CONSTITUINTES VEGETAIS

CLASSE	COMPOSTO	ATIVIDADE	REFERENCIA
Proantocianidinas	Diversos	Cl ₅₀ = 1-10 µg/mL	ANDRIAMBELOSON, et al., 1998
Proantocianidinas oligoméricas e antocianinas	frações enriquecidas de vinho tinto	Max. relaxamento 58-77%	ANDRIAMBELOSON, et al., 1998
Proantocianidinas poliméricas	frações enriquecidas de vinho tinto	Max. relaxamento 20-47%	ANDRIAMBELOSON, et al., 1998
Antocianinas	delfinina	Max. relaxamento 89%	ANDRIAMBELOSON, et al., 1998
Chalconas	buteína	Cl ₅₀ = 10,4 µg/mL	YU, et al., 1999
	gentiacauleina	Cl ₅₀ = 5,0 µg/mL	CHERICONI, et al., 2003
	gentiacochianina	Cl ₅₀ = 5,0 µg/mL	CHERICONI, et al., 2003
Flavonóis	quercetina	Cl ₅₀ = 10 µg/mL	HOLLMAN & KATAM, 1999
	quercetina	Cl ₅₀ = 4,0 µg/mL	GUERRERO et al., 2002
	3,7-dimetileter da quercetina	Cl ₅₀ = 4,7 µg/mL	GUERRERO et al., 2002
	3,4',7-trimetileter da quercetina (ayanina)	Cl ₅₀ = 3,6 µg/mL	GUERRERO et al., 2002
	3,3',4',7-tetrametileter da quercetina (obtido por semisíntese)	Cl ₅₀ = 3,1 µg/mL	GUERRERO et al., 2002
	canferol	Cl ₅₀ = 10 µg/mL	HOLLMAN & KATAM, 1999
Flavanonas	orientina	Cl ₅₀ = 2,3 µg/mL	FU et al., 2005
	narigenina	Cl ₅₀ ≈ 100 µg/mL	HERRERA et al., 1996
	hesperidina	Cl ₅₀ ≈ 100 µg/mL	HERRERA et al., 1996
	diocleina	Cl ₅₀ = 1,3 µg/mL	LEMOS et al., 1999

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

Realizou-se a caracterização farmacognóstica e fitoquímica de folhas de *Cecropia glaziovii* compreendendo ensaios gerais, determinação qualitativa das classes de metabólitos secundários, quantificação espectrofotométrica de polifenóis totais, taninos, flavonóides e proantocianidinas, quantificação por HPLC de ácido clorogênico, orientina e isoorientina e obtenção de perfis cromatográficos por CCD e HPLC.

Observou-se variação sazonal e intraespecífica nos teores de polifenóis totais, taninos, flavonóides e proantocianidinas em folhas de *C. glaziovii*. A variação foi maior entre os espécimens nativos que entre os cultivados e clones. Foram detectadas diferenças entre os teores destes metabólitos entre os pecíolos e as lâminas foliares. Nas lâminas foliares os teores de polifenóis totais variaram entre 1,9% e 4,8%, os de taninos entre 1,6% e 3,3%, os de flavonóides entre 0,3% e 3,8% e os de proantocianidinas entre 1,2% e 7,5%. Nos pecíolos os teores de polifenóis e taninos foram menores que 1%, os de flavonóides estiveram entre 0,01% e 0,3% e os de proantocianidinas entre 0,4% e 5,4%. Observou-se maior atividade vasodilatadora para extratos de pecíolos que de lâminas foliares indicando que no processo industrial convém a utilização de folhas completas.

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos teores de polifenóis totais, flavonóides e taninos em folhas novas e maduras de espécimens nativos de *C. glaziovii*. Folhas novas de indivíduos cultivados e clones apresentaram maiores teores de flavonóides ($p < 0,05$) e semelhantes teores de proantocianidinas ($p > 0,05$) que as folhas maduras.

Para espécimens nativos e cultivados observou-se maior teor de flavonóides e proantocianidinas na época seca em relação á época chuvosa ($p < 0,05$), sendo que a variação dos teores médios entre o período seco e chuvoso foi maior para as amostras nativas que para as cultivadas. No caso de folhas provenientes de clones não foram observadas diferenças nos teores de flavonóides e proantocianidinas entre as duas épocas do ano.

Comparadas às árvores nativas, as plantas cultivadas e clones apresentaram teores de flavonóides e proantocianidinas similares ou maiores, porém menor variação intraespecífica que os espécimens nativos. Cultivares de *C. glaziovii* podem prover matéria prima vegetal de qualidade uniforme, que pode ser coletada durante todo o ano, uma vez que as diferenças nos teores de flavonóides e proantocianidinas entre as épocas seca e chuvosa, ainda que presentes, foram pequenas.

Os perfís cromatográficos por HPLC a 240, 280 e 350 nm de extratos de folhas de *C. glaziovii* mostraram três regiões de picos, a primeira, com tempos de retenção de até 15 minutos, corresponde a compostos de alta polaridade, como ácidos orgânicos e catequinas, seguida da região dos flavonóides glicosilados, com TRs de 20 a 40 min., e finalmente, com maiores tempos de retenção, a região de eluição dos flavonóides livres (TRs de 45 a 55 min.). Co-injeções com substâncias de referência permitiram a identificação de ácido protocatéquico, ácido clorogênico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, orientina, isoorientina, isovitexina e isoquercetrina.

Estabeleceu-se e padronizou-se uma metodologia analítica, por HPLC, que permitiu a quantificação de ácido clorogênico, orientina e isoorientina em folhas de *C. glaziovii*. O teor de ácido clorogênico variou de 0,03% a 2,39%, o de orientina foi de 0,01% a 0,42% e o de isoorientina, de 0,08% a 1,16%, nos diferentes indivíduos analisados. O teor de ácido clorogênico foi maior nas folhas novas que nas maduras ($p < 0,05$) provenientes de espécimens cultivados, mas não houve diferença no caso de árvores nativas ($p > 0,05$). Os teores de orientina e isoorientina foram semelhantes ($p > 0,05$) em folhas novas e maduras tanto de árvores nativas como cultivadas. O teor de ácido clorogênico foi maior na época seca, independentemente da origem das folhas. No entanto, os teores de orientina e isoorientina foram maiores ($p < 0,05$) na época seca nas folhas de espécimens nativos, mas não houve diferenças ($p > 0,05$) no caso de árvores cultivadas. Nos clones, os teores de orientina foram maiores ($p < 0,05$) do que aqueles observados para espécimens nativos e semelhantes ou maiores aos

obtidos para folhas provenientes de cultivo. Os teores destes metabólitos foram menores nos pecíolos, em relação às lâminas foliares.

Observou-se que a concentração de flavonóides e proantocianidinas e a atividade vasodilatadora em anéis de aorta de ratos, pré-contráidos com fenilefrina, são influenciadas pela concentração destes metabólitos na planta, pelo solvente extrator, pela proporção droga / solvente e pelo método de extração. Os extratos aquosos e etanólicos apresentaram menores teores de flavonóides e proantocianidinas e menor atividade vasodilatadora que os extratos hidroacetônicos e hidroetanólicos. Os extratos hidroetanólicos 3:7, 1:1 e 7:3, semelhantes quanto aos teores de flavonóides e de proantocianidinas, e quanto aos perfis por CCD e HPLC, apresentaram diferenças nos perfís de atividade vasorelaxante em anéis de aorta. A maceração e a percolação com repouso mostraram ser metodologias adequadas para a preparação de extratos de *C. glaziovii* enriquecidos em flavonóides e proantocianidinas.

Por partição entre solventes imiscíveis do extrato aquoso de *C. glaziovii*, preparado por decocção e liofilizado foram obtidas frações em acetato de etila (FAE) e *n*-butanol (FB). Estas frações continham maiores teores de flavonóides e proantocianidinas e apresentaram maior atividade vasodilatadora que as correspondentes frações aquosas (FAQ). FB1 foi mais ativa do que o extrato aquoso original. FAE foi menos ativa que FB1 e FB2 (FB1 + FAE) apresentou menor atividade que FB1, sugerindo a presença de antagonistas em FAE. Em FAE e FB1 foram identificados, por HPLC, ácido protocatéquico, ácido clorogênico, (+)-catequina e (-)-epicatequina. As sub-frações de FAE, obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 e que mostraram maior atividade vasodilatadora, tinham em comum a presença de compostos altamente polares como ácidos orgânicos, catequinas e proantocianidinas. De FB obteve-se, por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, uma fração altamente enriquecida em flavonóides, a qual apresentou menor atividade vasodilatadora que as sub-frações enriquecidas em catequinas e/ou proantocianidinas.

Os ensaios de atividade vasodilatadora em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina confirmaram o efeito tanto de flavonóides quanto de proantocianidinas que devem contribuir para a atividade hipotensora de folhas de *C. glaziovii*. As proantocianidinas apresentam uma maior tendência a maiores potências que os flavonóides. Os teores destes metabólitos, por si só, não explicam a totalidade da atividade vasodilatadora de folhas de *C. glaziovii*. Os extratos e frações mais ativos apresentaram CI_{50} entre 0,5 e 14 $\mu\text{g/mL}$. Estes valores são coerentes com os relatados na literatura para flavonóides e proantocianidinas.

As semelhanças nos teores de flavonóides e proantocianidinas e na atividade vasodilatadora de folhas de *C. glaziovii* e *Crataegus* sugerem que *C. glaziovii* poderia ser um sucedâneo do *Crataegus oxyacantha* / *C. monogyna* cujo extrato padronizado é internacionalmente empregado para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva em pacientes que ainda não requerem terapia com glicosídeos carditônicos e que tem atividade confirmada no tratamento de sintomas do sistema simpático-adrenérgico como hipertensão, taquicardia e arritmia.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

270 PLANTAS MEDICINALES IBEROAMERICANAS, 1995. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello, p. 405-408.

ABREU, M. *Triagem química de plantas por cromatografia em camada delgada CCD*. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto. Apostila sem publicar.

ACTIS-GORETTA, L.; OTTAVIANI, J.I.; KEEN, C.L.; FRAGA, C.G., 2003. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Letters* **555**: 597-600.

ALVAREZ-CASTRO, E.; CAMPOS-TOIMIL, M.; ORALLO, F., 2004. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces contraction of rat aorta by a calcium influx-dependent mechanism. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **369** (5): 496-506.

ANDRADE-CETTO, A.; WIEDENFELD, H., 2001. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, **78** (2-3): 45-149.

ANDRIAMBELOSON, E.; MAGNIER, C.; HAAN-ARCHIPOFF, G.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R.; BERERTZ, A.; STOCLET, J.C.; ANDRIANTSITOHAINA, R., 1998. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J. Nutrition* **128** (12): 2324-2333.

ARAÚJO, J.E.S.; LUCAS, V., 1930. *Catálogo de Extractos Fluidos dos Laboratórios Silva Araújo*. Rio de Janeiro: Silva Araujo & Cia. Ltda., p.191.

ARTS, I.C.; HOLLMAN, P.C., 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**(1): 317S-325S.

AYOUB, S.M.H.; KINGSTON, D.G.I., 1982. Screening of plants used in Sudan folk medicine for anticancer activity (II). *Fitoterapia* **53** (4): 119-123.

BAHORUM, T.; TROTIN, F.; POMMERY, J.; VASSEUR, J.; PINKAS, M., 1990. Antioxidant activities of *Crataegus monogyna* extracts. *J. Pharm. Belg.* **45** (2): 120-124

BATE-SMITH, E.C. Phytochemistry of Proantocyanidins, 1975. *Phytochemistry* **14**: 1107-1113.

BAUER, R., 1998. Quality criteria and standarization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug standars be achieved? *Drug Information* **32**: 101-110.

BENITO, S., LOPEZ, D., SAIZ, M.P., BUXADERAS, S., SANCHEZ, J., PUIG-PARELLADA, P., MITJAVILA, M.T., 2002. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **135** (4), 910-916.

BENZI, G.; CECI, A., 1997. Herbal medicines in European regulation. *Pharm. Res.*, **35** (5): 355-362.

BERG, C.C., 1978. Cecropiaceae, a new family or Urticales, *Táxon*, **27** (1):399-344.

BERG, C.C., 1996. *Cecropia* (Cecropiaceae) no Brasil, ao sul da bacia amazônica. *Albertoa* **16** (4): 213-221.

BIODIVERSITY: Perspectives and Technological Opportunities. Pág. 10: Produtos Naturais em Saúde. Fitoterápicos Campinas: Base de Dados Tropical. Disponível na Internet, via <http://www.bdt.org.br/publicações/padct/bio/cap10>. Arquivo capturado em Fevereiro de 2000.

BLUMENTHAL, M., 1993. European/American Phytomedicines Group Moves to Expand FDA OTC Drug Policy. *HerbalGram*, **28**:36.

BONATI, A., 1991 How and why should we standarize phytopharmaceutical drugs for clinical validation. *J. Ethnopharmacology* **32**(1-3): 195-197.

BOTANICAL PATHWAYS, 1997. What are standardized extracts? *Information and Research on Botanical Medicine* 1: 4-5. Via <http://www.botanicalpathways.com>

BRAGA, F.C., 1997. *Variações intra-específicas de cardenólídeo de Digitalis lanata cultivada no maciço de Itatiaia e isolamento de cardenólídeos digitálicos por cromatografia em contracorrente de rotação locular*. Belo Horizonte: Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, 216 p. (Tese).

BRAGA, F.C.; KREIS, W.; RÉCIO.,; OLIVEIRA, A.B., 1997. Cardenolides variation with grown in a *Digitalis lanata* Brazilian cultivar. *Phytochemistry*, **45** (3): 473-476.

BRAGA, F.C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, A.B., 2000. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for *in vitro* angiotensine-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine*, **7** (3): 245-250.

BRAMATI, L.; AQUILANO, F.; PIETTA, P., 2003. Unfermented rooibos tea: quantitative characterization of flavonóides by HPLC-UV and determination of the total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **51** (25): 7472-7474.

BRAMATI, L.; MINOGGIO, M.; GARDANA, C.; SIMONETTI, P.; MAURI, P.; PIETTA, P., 2002. Quantitative characterization of flavonoid compounds in Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) by LC-UV/DAD. *J. Agric. Food Chem.* **50** (20): 5513-5519.

BRITISH Herbal Pharmacopoeia, 1996. Bourmemouth: The British Herbal Medicine Association.

BRITISH Pharmacopoeia, 1988. London: Her Majesty's Stationery Office. 1281p.

BRUNI, R.; PELLATI, F.; BELLARDI, M.GH.; BENVENUTI, S.; PALTRINIERI, S.; BERTACCINI, A.; BIANCHI, A., 2005. Herbal drug quality and phytochemical composition of *Hypericum perforatum* L. affected by ash yellows phytoplasma infection. *J. Agric. Food Chem.* **53** (4): 964-968.

BUDZIANOWSKI, J.; PAKULSKI, G.; ROBAK, J., 1991. Studies on antiioxidative activity of some C-glycosylflavones. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **43** (5): 395-401.

BUSSE, W., 2000. The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products. *Drug. Inf. J.*, 34: 15-23.

CALDERONE, V.; CHERICONI, S.; MARTINELLI, C.; TESTAI, L.; NARDI, A.; MORELLI, I.; BRESCHI M.C.; MARTINOTTI, E., 2004. Vasorelaxing effects of flavonóides: investigation on the possible involvement of potassium chanel. *Naunyn Schmiederbergs Arch. Pharmacol.* **370** (4):280-298.

CALIXTO, J.B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **33**(2): 179-189.

CALLEGARI-JACQUES, S.M., 2004. *Biostatística*. Princípios e aplicações. Porto alegre: Artmed. 255 p.

CAVANAGH, E.M.V.; PIOTRKOWSKI, B.; BASSO, N.; STELLA, I.; INSERRA, F.; FERDER, L.; FRAGA, C.G., 2003. Enalapril and losartan attenuate mitochondrial dysfunction in aged rats. *FASEB Journal* **17**: 1096-1098.

CHANG, C.; CHEN, J.; WONG, H., 2001. Protective effects of organic acids on human vascular endothelial cells. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, **35** (2): 79-82.

CHEN, C.H.; LIN, J.Y., 1992. Inibition of angiotensin-I- converting enzyme by tetrahydroxixantones isolated from *Tripterospermum lanceolatum*. *J. Nat. Prod.* **55** (5): 691-695.

CHERICONE, S.; TESTAI, L.; CALDERONE, V.; FLAMINI, G.; NIERI, P.; MORELLI I.; MARTONOTTI, E., 2003. The xanthones gentiacaulein and gentiakochianin are responsible for the vasodilator action of the roots of *Gentiana kochiana*. *Planta Med.*, 69 (8): 770-772.

CÔRTEZ, S.F., VALADARES, Y.M., DE OLIVEIRA, A.B., LEMOS, V.S., BARBOSA, M.P., BRAGA, F.C., 2002. Mechanism of endothelium-dependent vasodilation induced by a proanthocyanidin-rich fraction from *Ouratea semiserrata*. *Planta Med.* **68** (5), 412-415.

CRUZ, G.L., 1979. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministerio da Agricultura - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Forestal, p.199-200.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M., 2002. Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**: 2341-2348.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M., 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **39**: 1-15.

CYSNEIROS, R.M.; MESIA, S.V.; TERSARIOL, I.L.S.; LAPA, A.J., 1996. Evidências para ação anti-secretora ácida gástrica da *Cecropia glazioui*, Sneth. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996, Florianópolis. *Programa e resumos ...* Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, p. 103.

CYSNEIROS, R.M.; MESÍA, V.S.; BEZERRA, G.B.; MARCHI, R.; SOUCCAR, C., 1998. Efeito do extrato aquoso de *Cecropia glazioui*, Sneth. em lesões gástricas, aguda e crônica, e no esvaziamento gástrico. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1998, Águas de Lindóia. *Programa e resumos ...* São Paulo: Eventus, p.98.

DELARCINA JUNIOR, S., GONÇALO M.C., LAPA, A.L., 2000. Efeito broncodilatador do extrato aquoso de *Cecropia glazioui* Snethl. em cobaias. XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Recife.

DANIEL, W.W. *Bioestatistics: a foundation for analysis in the health sciences*. 3. ed. New York: John Willey and Sons, 1991. 504 p.

DE NIGRINIS, S.O., 1995. El método de análisis para los estudios de estabilidad y biodisponibilidad de medicamentos. *Rev.Col. Cienc. Quim. Pharm.*, vol **23**.

DE SMET, P.A.G.M., 1997. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. *Drugs*, **54** (6): 801-840.

DE SMET, P.A.G.M.; BONSE, G.; VAN DER KUY A.; HEKSTER, Y.A.; PRONK, M.H.; BRORENS, M.J.A.; LOCKEFEER, J.H.M.; NUIJTEN, M.J.C., 2000. Introduction on the pharmacoeconomics of herbal medicines. *Pharmacoeconomics*, **18**(1): 1-17.

DE YOUNG, S., 1994. *Introducción a la cromatografía*. Bogotá: Editorial Universidad Nacional de Colombia. 164 p.

DE FONSECA, E. , 1935. Umbauba ("imbauba", *Cecropia peltata*). *Rev. Flora Med.* 1: 289-296. apud *Chemical Abstracts*, **29**: 4901.

DIAZ, J.A. (Ed.), 2003. Informe Técnico: Caracterización del mercado colombiano de plantas medicinales y aromáticas. Bogotá: Instituto Alexander von Humboldt – Ministerio del ambiente, vivienda y desarrollo territorial. 111 p.

DI CARLO, J.; MASCOLO, N.; IZZO A.A.; CAPASSO, F. , 1997. Flavonoids; old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, **157** (24): 2413-2445.

DONGMO, A.B.; KAMANYI, A.; FRANCK, U.; WAGNER, H., 2002. Vasodilating properties of extracts from the leaves of *Musanga cecropioides* (R. Brown). *Phytother. Res.*, **16** (1): S 6-9.

DUARTE, J.; PEREZ, V.F.; UTRILLA, P.; JIMEMEZ, J.; TAMARGO, J.; ZARZUELO, A., 1993. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen. Pharmacology*, **24** (4): 857-862.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. *Fitoterapia na atenção primária à saúde*. São Paulo: Manole, 2001. 163 p.

ENDALE, A.; SCHMIDT, P.C.; GEBRE-MARIAM, T., 2004. Standardisation and physicochemical characterization of the extracts of seeds of *Glinus lotoides*. *Die Pharmazie* **59** (1): 34-38.

EUROPEAN Pharmacopoeia., 2002. Strasbourg: Council of Europe Publishing.

FARMACOPÉIA brasileira. 3. ed., 1977. São Paulo: Organização Andrei.

FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed. Parte I, 1988. São Paulo: Atheneu Editora.

FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed. Parte II. Primeiro Fascículo. 1996. São Paulo: Atheneu Editora.

FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed. Parte II. Segundo Fascículo. 2000. São Paulo: Atheneu Editora.

FARNSWORTH, N.R., 1966. Biological and phytochemical screening of plants. *J. Pharm. Sci.* **55** (3): 225-276.

FETROW, C.W.; AVILA, J.R., 2000. *Manual de medicina alternativa para o profissional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 743 p.

FRANCK, U.; GÜNTER, B.; VIERLING, W.; WAGNER, H., 1996. Investigation of *Cecropia* and *Crataegus* extracts for their angiotensin-converting enzyme inhibitory and vasorelaxant activities. *Phytomedicine*, **1**: 93.

FRANCK, U., 1998. *Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen der kardiovaskulären Wirkprinzipien von Cecropia hololueca Miq., Cecropia pachystachya Tréc., Cecropia glaziovii Sneth., *Musanga cecropioides* R. Brown und Crataegus L. monogyna/oxycantha*. Munich: Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München, 192 p. (Tese).

FREITAS, M.R.; CÔRTEZ, S.F.; THOMAS, G.; BARBOSA FILHO, J. M., 1996. Modification of Ca²⁺ metabolism in rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic activity of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Journal Pharm. Pharmacol.*, **48**: 332-36.

FU, X.C.; WANG, M.W.; LI, S.P.; ZHANG, Y.; WANG, H.L., 2005. Vasodilatation produced by orientin and its mechanism study. *Biol. Pharm. Bull.* **28** (1): 37-41.

GALISTEO, M.; GARCA-SAURA, M.F.; JIMÉNEZ, R.; VILLAR, I.C.; ZARZUELO, A.; VARGAS, F.; DUARTE, J., 2004. Effects of chronic quercetin treatment on antioxidant defense system and oxidative status of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Mol. Cell. Biochem.* **259** (1-2):91-99.

GARCIA, E.S., SILVA, A.C., GILBERT, P., CORRÊA, C.B., CAVALHEIRO, M.V., DOS SANTOS, R., TOMASSINI, T., 1997. Biodiversidade: Perspectivas e oportunidades tecnológicas. Capítulo 10: Fitoterápicos. Vía Base de Dados Tropical (www.bdt.org.br).

GUERRERO, M.F., PUEBLA, P., CARRON R., MARTIN, M.L., SAN ROMAN, L., 2002. Quercetin 3,7-dimethylether: A vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. *J. Pharm. Pharmacol.* **54**(10), 1373-1378.

GRÜNWARD, J., 1995. The European Phytomedicines Market: Figures, Trends, Analyses. *HerbalGram*, **34**: 60-65.

HANSEN, K.; NYMAN, U.; SMITT, U.W.; ADSERSEN, A.; GUDIENSEN, L.; RAJASEKHARAN, S.; PUSHANGADAN, P., 1995. *In vitro* screening of traditional medicines for an anti-hypertensive effect based on inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE). *J. Ethnopharm.* **48**: 43-51.

HARBORNE, J.B. (Ed.), 1989. *Methods in plant biochemistry*: Vol. 1. Plant phenolics. London: Academic Press, 552 p.

HARBORNE, J.B., 1998. *Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. 3 Ed. London: Chapman & Hall. 302 p.

HARNISCHFEGER, G., 1997. *Industrialization of Medicinal Plants*. Training Course on Phytomedicines, Panamá. Apostila sem publicar.

HEBERLÉ, G.; WEHRMANN, L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V.L.; PETROVICK, P.R., 1998. Desenvolvimento tecnológico de extratos aquosos de *Cecropia glaziovii* Sneth. - Moraceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1998, Águas de Lindóia. *Programa e resumos ...* São Paulo: Eventus, p. 184.

HERRERA, M.D.; ZARZUELO, A.; JIMÉNEZ, J.; MARHUENDA, E.; DUARTE, J., 1996. Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility: structure-activity relationships. *Gen. Pharmacology* **27** (2): 273-277.

HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, B., 1999. *Métodos espectroscópicos en química orgánica*. Madrid: Sintesis. 369 p.

HIERMANN, A.; KARTINIG, T.; AZZAM, S., 1986. Ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung der Procyanidine in *Crataegus*. *Sci. Pharm.* **54**: 331-337.

HOLLMANN, P.C.; KATAN., M.B., 1999. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic. Res., Suppl.* S75-80.

HOLMSTEDT, B.; LINDGREN, L.E.; RIVIER L.; PLOWMANT, T., 1978. Cocaine in blood of coca chewers. *Bot. Mus. Leaflet, Harv. Univ.*, **26** (5): 199-201 apud Chemical Abstracts, **90**: 133602c.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.L., 1997. The search for biologically active secondary metabolites. *Pesticides Science*, **51**: 471-474.

JIANG, Y.; KUSAMA, K.; SATOH, K.; TKAYAMA, E.; WATANABE, S.; SAKAGAMI, H., 2000. Induction of cytotoxicity by chlorogenic acid in human oral tumor cell lines. *Phytomedicine* **7** (6):483-491.

JORGE, L. I. F., MARKMAN, B.E.O., FERRO, V. DE O, 1997/98. Elementos histológicos característicos de *Cecropia pachystachya* (Embaúba). *Rev.Bras. Farmacognosia*, **7/8** (1/2): 35-40.

JURD, L.; HOROWITZ, R.M., 1957. *J. Org. Chem.* **22**: 1618.

KEEN, C.L.; HOLT, R.R.; OTEIZA, P.I.; FRAGA, C.G.; SCHMITZ, H.H., 2005. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *Am. J. Clin. Nutr.* **81** (1):298S-303S.

KING, N.M.; HADDOCK, N., 1959. The phytochemical investigation of *Cecropia peltata*. *J. Am. Pharm. Assoc.* **48**: 129-130.

KRENN, L.; MIRON, A.; PEMP, E.; KOPP, B., 2003. Flavonoids from *Achillea nobilis* L. *Z. Naturforsch. [C]*, **58** (1-2): 11-16.

HUGUET, A.I.; MANEZ, S.; ALCARAZ, M.J., 1990. Superoxide scavenging properties of flavonóides in a non enzymatic system. *Z. Naturforsch.* **45** (1-2): 19-24.

LACAILLE-DUBOIS, FRANCK, U., WAGNER, H., 2001. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine* **8** (1), 47-52.

LANÇAS, F.M., 2003. The role of the separation sciences in the 21th Century. *J. Braz. Chem. Soc.*, **14** (2): 183-197.

LAPA, A.J., LIMA-LANDMAN, M.T.R., CYSNEIROS, R.M., BORGES, C.R., SOUCCAR, C., BARETTA, I.P., DE LIMA, T.C.M., 1999. The brazilian folk medicine program to validate medicinal plants – A topic in new antihypertensive drug research. In: Hostettmann K., Gupta, M.P., Marston, A. (Eds.) Chemistry, biological and pharmacological properties of medicinal plants from the Americas. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 185-196.

LEITE, J.P.V., 2002. *Estudo fitoquímico de folhas de Maytenus ilicifolia Mart. ex. Reiss e variação sazonal e intra-específica de polifenóis em populações nativas.* Belo Horizonte: Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, 299 p. (Tese).

LEMOS, V.S.; FREITAS, M.R.; MULLER, B.; LINO, Y.D.; QUEIROGA, C.E.; CORTES, S.F., 1999. Dioclein, a new nitric oxide – and endothelium – dependent vasodilator flavonoid. *Eur. J. Pharmacol.* **386** (1):41-46.

LETCHAMO, W.; LIVESEY, J.; ARNASON, T.J.; BERGERON, C.; KRUTILINA, V.S. , 1999. Cichoric acid and isobutylamide content in *Echinacea purpurea* as influenced by flower development stages. In: JANICK, J. (Ed.) Perspectives on news crops and new uses. ASHS Press: Alexandria. p.494-498.

LI, Z.; CHEN, Z.; LIAO, L.; LIN, S., 1999. Determination of chlorogenic acid in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. flower. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **24** (6):326-330.

LI, Y.L.; MA, S.C.; YANG, Y.T.; YE, S.M.; BUT, P.P., 2002. Antiviral activities of flavonoides and organic acids from *Trollius chinensis* Bunge. *J. Ethnopharmacol.*, **79** (3) 365-368.

LÓPEZ-ABRAHAM, A.M.; ROJAS-HERNÁNDEZ, N.M.; JIMÉNEZ-MISAS, C.A., 1974. Plant extracts with cytostatic properties growing in Cuba. *Rev. Cubana Med. Trop.* 31 (2): 97-104.

LORENZI, H., 2000. Árvores brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Vol 2. Instituto Plantarum, Nova Odesa.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A., 2002. Plantas medicinais no Brasil – Nativas e exóticas. Instituto Plantarum, Nova Odesa.

MACHADO, E.C.; TUNES, R.A.; DELLE-MONANCHE, F., 1996. Triterpenos pentacíclicos da série ursano isolados de *Cecropia catharinensis* Quadrecasas, Moraceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996, Florianópolis: *Programa e resumos ...* Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, p. 177.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B., 1970. *The systematic identification of flavonoids*. New York: Springer-Verlag. 354 p.

MARINI-BETOLLO, G.B. Preliminary chemical screening of medicinal plants in field conditions. WHO, DPM/80.5 (Boletim da OMS).

MARKHAM, K.R., 1983. *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic Press. 113 p. (Coleção: Biological Techniques Series).

MARTINS, E.R.; CASTRO, D. M.; CASTELLIANI, D.C.; DIAS, J.E., 2000. *Plantas medicinais*. Viçosa: UFV, 220 p.

MATOS, F.J.A., 1994. *Farmacias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. 2 Ed. Fortaleza: EUFC, 180 p.

MATOS, F.J.A., 2000. *Plantas medicinais: Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil*. 2. Ed. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MATSUNAGA, K.; KATAYAMA, M.; SAKATA, K.; KUNO, T.; YOSHIDA, K.; YAMADA, Y.; HIROSE, Y.; YOSHIMI, N.; MORI, H., 2002. Inhibitory effects of chlorogenic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Asian pac. J. cancer Prev.* 3 (2):163-166.

MEYER, R.V., 1994. *Practical high-performance liquid chromatography*. 2 ed. Chichester: John Wiley & Sons.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C., 2000. The effects of plant flavonóides on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52: 673-751.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Nº 6 de 31 de janeiro de 1995. Institui e normaliza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – DIREITORIA COLEGIADA DA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC Nº 17 de 24 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – DIREITORIA COLEGIADA DA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC Nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

MINOGGIO, M.; BRAMATI, L.; SIMONETTI, P.; GARDANA, C.; IEMOLI, L.; SANTANGELO, E.; MAURI, P.L.; SPIGNO, P.; SORESSI, G.P.; PIETTA, P.G., 2003. Polyphenol pattern and antioxidant activity of different tomato lines and cultivars. *Ann. Nutr. Metab.* **47** (2): 64-69.

MORGES, A.C.R., TORRES, L.M.B., SOUCCAR, C., LAPA, A.J., 1990. Atividade hipotensora do extrato aquoso e frações semi-purificadas de *Cecropia glazioui* Sneth. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 11, 1990, *Programa e Resumos ...* João Pessoa.

MULINACCI, N.; PRUCHER, D.; PERUZZI, M.; ROMANI, A.; PINELLI, P.; GIACCHERINI, C.; VINCIERI, F.F., 2004. Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content. *J. Pharm. Biol. Anal.* **34**: 349-357.

MUN'IM, A.; NEGISHI, O.; OZAWA, T., 2003. Antioxidant compounds from *Crotalaria sessiliflora*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67** (2): 410-414.

MUÑOZ-DELGADO, S., 2000. *Coca . Árbol del paraíso americano. Tesoro precolombino*. Cali: Fundación Salud Caina. 204 p.

NAKATANI, N.; KAYANO, S.; KIKUZAKI, H.; SUNIMO, K.; KATAGIRI, K.; MITANI, T., 2000. *J. Agric. Food Chem.* **48** (11): 5512-5516.

NICOLAU, M., ANTONIOLLI, A., LIMA, T.C.M., 1988. Efeito do extrato bruto e de frações semipurificadas de *Cecropia glazioui* sobre a musculatura lisa e cardíaca “in vitro” e no sistema cardiovascular. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 10, 1988, *Programa e Resumos ...* São Paulo.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.; HOORN, D.E.C.; BOELENS, P.G.; NORREN, K; LEEUWEN, P.A.M., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* **74**: 418-425.

NYMAN, U.; JOSHI, P.; MADSEN, L.B.; PEDERSEN, T.B.; PINSTRUP, M.; RAJASEKHARAN, S.; GEORGE, V.; PUSHANGADAN, P., 1998. Ethnomedical information and in vitro screening for angiotensine converting enzyme inhibition of plants utilized as traditional medicines in Gujarat, Rajasthan and Kerala (India). *J. Ethnopharm.* **60**: 247-263.

OKUYAMA, E.; OKAMOTO, Y.; YAMAZAKI, M.; SATAKE, M., 1996. Pharmacologically active compoumentes of a peruvian medicinal plant, huanarpo (*Jatropha cillliata*). *Chem. Pharm. Bull.* **44** (2): 333-336.

OLIVEIRA, R.R.; MORAES, M.C.; CASTILHO, R.O.; VALENTE, A.P.; CARAUTA, J.P.; LOPES, D.; KAPLAN, M.A., 2003. High-speed countercurrent chromatography as a valuable tool to isolate C-glycosylflavones from *Cecropia lyratiloba* Miquel. *Phytochem. Anal.* **14** (2): 96-99.

ORHAN, D.D.; ASLAM, M.; AKTAY, G.; ERGUN, E.; YESILADA, E.; ERGUN, F., 2003. Evaluation of hepatoprotetive effect of *Gentiana olivieri* herbs on subacute administration and isolation of ative principle. *Life Sci.* **72** (20): 2273-2283.

ORTHOF, M.R.; HOLLMN, P.C.; KATAN, M.B., 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* **131** (1): 66-41.

PACKER, L.; RIMBACH, G.; VIRGILI, F., 1999. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritime*) bark, pycnogenol. *Free Radical Biol. Med.* **27** (5-6): 704-724.

PANIZZA, S., 1997. *Plantas que curam: Cheiro de Mato*. 19. ed. São Paulo: Ibras. p.197, 198.

PÉREZ-ARBELÁEZ, E., 1996. *Plantas útiles de Colombia*. 5 Ed. Fondo FEN Colombia, Bogotá.

PHARMACOPÉE Française. 10. ed., 1986. Paris: Maisonneuve S.A.

PINHEIRO, G.B.V.; ARRUDA, M.S.P.; REBELO, A.C.R.; ARRUDA, A.C.; MÜLLER, A.H. Constituintes químicos das folhas de *Cecropia palmata*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1998, Águas de Lindóia. *Programa e resumos ...* São Paulo: Eventus, 1998. p.98.

PIO CORRÊA, M.; PENNA, L.D.A., 1969. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministerio da Agricultura - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Forestal, p.199-200.

PLANTAS medicinales amazónicas: realidades y perspectivas. Segunda parte: Plantas medicinales promisorias de la amazonia., 1999. Lima: Tratado de Cooperación Amazónicas. Disponível na Internet, via <http://www.fao.org/ag/ag/agl/agls/aaweb/public/28/28000007.htm#1> Arquivo capturado em 25 nov. 1999.

QUATTROCCHI, O.A.; ABELAIRA, S.; LABA, R.F., 1992. *Introducción a la HPLC: Aplicación y práctica*. Buenos Aires: Farro S.A., 407 p.

REUTER, H.D., 1991. What are the possibilities and limits of therapy with european native drugs in modern clinical medicines? *J. Ethnopharmacology* **32**(1-3):187-193.

RIBEIRO, O.; MORS, W.B., 1950. Chemical study of mucilage of leaves and stems of *Cecropia adenopus* Mart. *Rev. Soc. Brasil. Quim.*, **19**:124-140.

RIBEIRO, R.A.; MELO, M.M.R.F.; BARROS, F.; GOMES, C.; IROLI, G., 1986. Acute anti-hypertensive effects in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo, Brasil. *Journal of Ethnopharmacology*, **24**: 19-29.

RIZK, A.M., 1982. Constituents of plants growing in Qtar. I. A chemical survey of sixty plants. *Fitoterapia* **53** (1/2): 35-44.

ROCHA, F.F., LAPA, A.J., DE LIMA, T.C.M., 2002. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glazioui* Sneth in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **71**, 183-190.

RODRIGUEZ DE SOTILLO, D.V.; HADLEY, M., 2002. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *J.Nutr. Biochem* 13(12): 717-726.

RODRIGUES FILHO, E., 2000. Acoplamento de técnicas analíticas: O terceiro “degrau” na evolução dos métodos físicos. <http://www.s bq.org.br/PN-NET/texto2/acopladas.htm>

ROEMISCH, H., 1960. Colorimetric determination of the rutin contents in plant extracts and preparations with aluminum chloride in solutions buffered with glacial acetic acid and pyridine. *Pharmazie* **15**, 33-38 *apud* RUSAK, G., KUSTRAK, D., MALES, Z., PLESE, N., 1993. The determination of the content of the polyphenols in aerial parts of species *Centaurea rupestris* L. and *C. fritschii* Hayek (Asteraceae). *Acta Pharm.* **43**, 121-125.

ROGHANI, M.; BALUCHNEJADMOJARAD, T.; VAEZ-MAHDAVI, M.R.; ROGHANI-DEHKORDI, F., 2004. Mechanisms underlying quercetin-induced vasorelaxation in aorta of subchronic diabetic rats: an *in vitro* study. *Vascular Pharmacology*, **42** (1): 31-35.

ROMAN-RAMOS, R.; FLORES-SÁENZ, J.L.; PARTIDA-HERNÁNDEZ, G.; LARALEMUS, A.; ALARCÓN-AGUILAR, F., 1991. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* **22** (1): 87-93.

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

SANABRIA, A., 1983. *Análisis fitoquímico preliminar*. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia *Compositae*. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. 113p.

SCALBERT A.; JOHNSON, I.T.; SALTMARSH, M., 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* **81** (1): 215S-217S.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E., 2002. *Fitoterapia racional: Uma guia de fitoterapia para as ciências da saúde*. 4ed.. Manole, Barueri. 385 p.

SHAHAT, A.A., COS, P., DE BRUYNE, T, APERS, S., HAMMOUDA, F.M., ISMAIL, S., ASMA, S., CLAEYS, M., GOOVAERTS, E., PIETERS, L., VANDENBERGUE, D., VLIETINCK, A.J., 2002. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Planta Med.* **68** (6), 539-541.

SHARAPIN, N., 1999. Medicinal plants: Pharmacopoeial prescriptions. *An. Acad. Bras. Ci.* **71** (2): 295-298.

SHARAPIN, N., 2000. *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Convenio Andrés Bello / Subprograma X – CYTED, Bogotá.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, .J.A.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Ed.), 2000. *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. 2 Ed. Florianópolis / Porto Alegre: UFSC / UFRGS. 821 p.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; WEST, T.A. 2000. *Principios de análisis instrumental*. 5 ed. Ciudad de México: Mc Graw Hill.

SLISH, D.F.; UEDA, H.; ARVIGO, R.; BALICK, M.J., 1999. Ethnobotany in the search for vasoactive herbal medicines. *J, Ethnopharm.*, **66**: 159-165.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L., 1997. *Practical HPLC Method Development*. 2 ed. New York: John Wiley & Sons. 765 p.

SOMANADHAN, B.; VARUHESE, G.; PALPU, P.; SCREEDHARAN, R.; GUDIASEN, L.; SMITT, U.W; NYMAN, U., 1999. An ethnopharmacological survey for potential angiotensin converting enzyme inhibitors from Indian medicinal plants. *J. Ethnopharm.* 65 : 103-112.

STHAL, E., 1971. *Analyse chromatographique et microscopique des drogues.* Paris: Tech. et Doc., 251 p.

TAKEOKA, G.R., DAO, L.T., 2003. Antioxidants constituents of almond [*Prunus dulcis*(Mill.) D.A.Webb] hulls. *J. Agric. Food Chem* 51 (2): 496-501.

THE INTERNATIONAL Pharmacopoeia. 3. Ed. Vol. 3. Geneva: WHO, 1994. 407 p.

THE PHARMACOPOEIA of Japan. 12 ed. English Version., 1992. Tokyo: The Society of Japanese Pharmacopoeia, 782 p.

THE UNITED States Pharmacopoeia. The National Formulary. USP 23. NF 18., 1994. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2391 p.

UENO, H.; HORIE, S.; NISHI, Y.; SHOGAWA, H.; KAWASAKI, M.; SUZUKI, S.; HAYASHI, M.; SHIMIZU, M.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, M., 1988. Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. Geraniin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor from "Paraparai mi", *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod.* 51 (2): 357-359.

UMA-DEVI, P.; GANASOUNDARI, A.; VRINDA, B.; SRINIVASAN K.K.; UNNIKRISHNAN, M.K., 2000. Radiation protection by the ocimum flavonoids orientina and vicenin: mechanisms of action. *Radiat. Res.* 154 (4): 455-460.

U.S. PATENT 2871235, 27 Jan. 1959. Vladimir J. Hlousek de Jilovice. *Polysaccharide material from the genus Cecropia.* apud Chemical Abstracts, 53: 13516a.

VALADARES, Y.M.; DE OLIVEIRA, A.B.; CÔRTEZ, S.F.; LOMBARDI, J.A.; BRAGA, F.C., 2003. Atividade vasodilatadora *in vitro* de espécies de *Ouratea* (Ochnaceae) e de frações de *Ouratea semiserrata* (Mart.) Engl. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **39** (1): 83-91.

VALENTOVA, K.; CVAK, L.; MUCK, A.; ULRICHOVA, J.; SIMANEK, V., 2003. Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. *Eur. J. Nutr.* **42** (1): 61-66.

VALERI, H.; NARVÁEZ, P., 1952. Investigation of *Cecropia peltata*. *Rev. Med. Vet. Parasitol.*, **9**:105-106.

VARGAS-HOWELL, R.; ULATE-MONTERO, G., 1996. Efecto diurético de *Cecropia obtusifolia* (Moraceae) sobre ratas albinas. *Rev. Biol. Trop.* **44** (1): 93-96.

VIDRO, H.; GARCIA-MÁRQUEZ, F.; REYES, J.; SOTO, R.M., 1982. Hypotensive activity of *Cecropia obtusifolia*. *J. Pharm. Sci.*, **71** (4):475-476.

VIERLING, W., BRAND, N., GAEDCKE, F., SENSCH, K.H., SCHNEIDER, E., SCHOLZ, M., 2003. Investigation of the pharmaceutical and pharmacological equivalence of different Hawthorn extracts. *Phytomedicine* **10** (1), 8-16.

WAGNER, H., 1998. Search for new plant constituents with antiasthmatic and anthypartonic activity. In: LAWSON, L.D., BAUER, R. *Phytomedicines of Europe Chemistry and Biological Activity*. Editor: (Eds.) Whashington: American Chemical Society. p. 46-61.

WAGNER, H.; BLAT, S.; ZGAINSKY, E.M., 1984. *Plant Drug Analysis*. Berlin: Springer-Verlag, 320 p.

WAGNER, H.; ELBL, G.; LOTTER, H.; GUINEA, M., 1991. Evaluation of natural products as inhibitors of angiotensine converting Enzyme (ACE). *Pharm. Pharmacol. Letters* **1**: 15-18.

WHO, 1996. Guidelines for the assesment of herbal medicines. In: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. 34 Ed. Geneva: WHO Technical Report Series. Nº 863.

WHO, 1998a. Regulatory Situation of Herbal Medicines: A worldwide Review WHO/TRM/98.1

WHO, 1998b. *Quality control methods for medicinal plant material*. Geneva: WHO. 115p.

WHO, 1999. Monographs on selected medicinal plants. Vol 1. Geneva.

WHO, 2002a. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. WHO/EDM/TRM/2000.1. Geneva: WHO. p. 3, 4, 21, 23.

WHO, 2002b. Monographs on selected medicinal plants. Vol 2. Geneva.

WOLFENDER, J.L.; HOSTETTMANN, K., 2001. The potential of LC-NMR in phytochemical analysis. *Phytochemical Analysis*, **12** (1): 2-22.

XAVIER, H.S.; RANDAU, K.P.; DE SÁ, A.F.F., 1998. Flavonóides de *Cecropia adenopus* Mart. (Moraceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1998, Águas de Lindóia. *Programa e resumos ...* São Paulo: Eventus, p.124.

YEH, C.T.; YEN, G.C., 2003. Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **51** (5): 1474-1479.

YU, S.M.; CHENG, Z.J.; KUO, S.C., 1999. Endothelium-dependent relaxation of rat aorta by butein, a novel cyclic AMP-specific phosphodiesterase inhibitor. *European Journal of Pharmacology*, **23**: 69-77.

YUAN, Z.; TEZUKA, Y.; FAN, W.; KADOKA, S.; LI, X., 2002. Constituents of the underground parts of *Glehnia littoralis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **50** (1): 73-77.

YUNES, R.S., PREDROSA, R.C., CECHINEL FILHO, V., 2001. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quím. Nova* **24** (1) p.147-152.

ZHANG, Z.; CHANG, Q.; ZHU, M.; HUANG, Y.; HO, W.K.; CHEN, Z., 2001. Characterization of antioxidants presents in hawthorn fruits. *J. Nutr. Biochem.*, **12** (3): 144-152.

ZHOU, R.; TONG, Q., 2003. Comparative study on content of chlorogenic acid in *Lonicera japonica* and *L. macranthoides*. *Zhong Yao Cai* **26** (6): 399-400.