



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE TEOR DE ÁCIDO GÁLICO E CATEQUINA NO
FITOTERÁPICO SANATIVO® POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA**

BEATRIZ PINHEIRO BEZERRA

Natal
2012

BEATRIZ PINHEIRO BEZERRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE TEOR DE ÁCIDO GÁLICO E CATEQUINA NO
FITOTERÁPICO SANATIVO[®] POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação de mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Natal
2012

Apoio ao Usuário
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN – Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde

B574d

Bezerra, Beatriz Pinheiro.

Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de teor de ácido gálico e catequina no fitoterápico Sanativo® por cromatografia líquida de alta eficiência / Beatriz Pinheiro Bezerra. – Natal/RN, 2012.

139f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde.

1. Schinus Terebinthifolius – Dissertação. 2. Piptadenia Colubrina – Dissertação. 3. Ácido gálico – Dissertação. 4. Catequina – Dissertação. 5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Dissertação. I. Soares, Luiz Alberto Lira. II. Título.

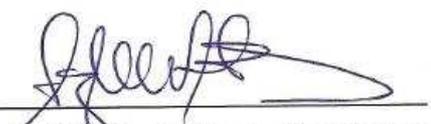
RN/UF/BSA01

CDU: 615.011:615.89

BEATRIZ PINHEIRO BEZERRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE TEOR DE ÁCIDO GÁLICO E CATEQUINA NO
FITOTERÁPICO SANATIVO® POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA**

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares
Presidente – UFPE



Profa. Dra. Cristiani Lopes Capistrano Gonçalves de Oliveira
Examinador Externo – UFC



Profa. Dra. Silvana Maria Zucolotto Langassner
Examinador Interno – UFRN

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina."

Cora Coralina

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Francismar e Socorro, exemplo de amor, respeito e
companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela realização desse trabalho, pelo privilégio de crescer profissionalmente e pessoalmente e conhecer pessoas maravilhosas ao longo do meu caminho, muito obrigada.

Aos meus amados pais, FRANCISMAR E SOCORRO, por terem me educado e me ensinarem sempre o verdadeiro sentido da palavra amor.

Aos meus queridos irmãos, ANDRÉ E ADRIANA, e cunhados (BEATRIZ E RALPH) pelo incentivo, companheirismo e cuidado.

À minha sobrinha e afilhada Júlia que me renovou e alegrou os meus dias. Meu sobrinho Christian por aflorar meu lado criança.

Ao Professor Dr. LUIZ ALBERTO LIRA SOARES por me dar oportunidade, orientação e esclarecimentos.

À UFRN que me recebeu de braços abertos, em nome dos professores ARNÓBIO, ADRIANA, CÍCERO, ANA PAULA, MATHEUS, MÁRCIO, TÚLIO e SILVANA, e das funcionárias FÁBIA e AURELIANA.

À UFC responsável pela minha formação de farmacêutica industrial, em nome dos professores FRANCISCA, SAID, NIRLA, MIRIAN, MARYANNY, CÉLIA PRAÇA, LUÍS CARLOS, EVERARDO, CARLOS COUTO, JANETE ELISA e CRISTIANI.

À professora Dra. KALYNE LEAL pela inspiração e apoio.

Professora Dr^a. GILVANDETE MARIA PINHEIRO SANTIAGO, que abriu as portas da minha iniciação científica e acadêmica. Meu mais profundo respeito e admiração.

Ao CEDEFAR seus diretores, bolsistas e funcionários que muito contribuíram para minha experiência e engrandecimento profissional.

Ao Dr. RICARDO e Dra. ALICE PASSOS, por terem acolhido e apoiado a mim e meu projeto no LACEN/CE.

Às queridas LAYANY MOURÃO, LILIAN SOLON por terem confiado e feito esse mestrado possível e mais divertido. Obrigada sempre, nossa amizade é o melhor presente dessa jornada.

Aos amigos que fiz em Natal: CAROL, ALICE, JÚNIOR, MELINA, DAIANE, LEONARDO, GUSTAVO, ANNE, VINÍCIUS pelos ótimos momentos de convívio. A ajuda de vocês fez com que esse trabalho ficasse melhor.

Às amigas MIRIAM, NONATA, LÚCIA, TEREZINHA e todos os colegas do LACEN pelo apoio imprescindível, risadas e amizade. A SANDRA ARARUNA, braço direito nesse processo, com ricas sugestões e ensinamentos.

Aos que foram meus alunos que foram fonte de inspiração para que eu estudasse mais e mais.

Aos amigos ALEXANDRE SALGADO E CAIO CEZAR que me receberam e apresentaram Natal. Foi o primeiro passo para essa aventura.

Aos amigos DIANA, DIENIFFER, KARILANE, SUZANA, RAFAELLY, GEÓRGIA HELENA, LEVI, ISABELLE, MILENA, SARAH, ÉRICA, ROSE, CAMILA e todos que sempre estão me incentivando e oferecendo a verdadeira amizade.

À amiga VIVIANE, veio pelo judô e ficou pela vida, obrigado por me fazer menos mamute.

Aos queridos IANA e DANILO por toda história que construímos e iremos construir, dos desentendimentos às melhores risadas.

Ao meu amigo-irmão TIAGO OLINDA por todo incentivo, inspiração e alegria que tenho em conviver com você.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que me apoiaram e me incentivaram para a realização desse trabalho, o mais sincero muito obrigada.

RESUMO

O medicamento fitoterápico Sanativo[®] é produzido pelo Laboratório Pernambucano desde 1888 com indicações de cicatrizante e hemostático. Trata-se de um extrato fluido composto por *Piptadenia colubrina*, *Schinus terebinthifolius*, *Cereus peruvianus* e *Physalis angulata*. Dentre as plantas de sua composição, *S. terebinthifolius* e *P. colubrina* possuem em comum compostos fenólicos aos quais é atribuída a maior parte de seus efeitos farmacológicos. Os taninos, ácido gálico e catequina foram selecionados como marcadores para controle de qualidade desse medicamento. O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE/UV/DAD para separação e quantificação simultânea de ácido gálico (ACG) e catequina (CQT) no fitoterápico Sanativo[®]. O sistema cromatográfico teve como fase estacionária, coluna RP C-18, 4,6 x 150 mm (5 µm), sob a temperatura de 35 °C, detecção em 270 e 210 nm. A fase móvel foi composta por ácido trifluoroacético 0,05 % e metanol nas proporções 88:12 (v/v), sob vazão de 1 ml/min. O método analítico desenvolvido apresentou um fator de retenção de 0,30 e 1,36, fator de cauda de 1,8 e 1,63, para ácido gálico e catequina, respectivamente, resolução de 18,2, além de pratos teóricos acima de 2000. O método atendeu os parâmetros de validação exigidos na Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA. O coeficiente de correlação da análise de regressão linear para ACG e CQT a partir da solução padrão foi de 0,9958 e 0,9973 e a partir do Sanativo[®] foi de 0,9973 e 0,9936, a matriz do fitoterápico não interfere no intervalo de 70 a 110%. Os limites de detecção e de quantificação para ACG e CTQ foram de 3,25 e 0,863, e 9,57 e 2,55 µg/mL, respectivamente. Os marcadores, ACG e CTQ, apresentaram repetibilidade (coeficientes de variação de 0,94 % e 2,36 %) e recuperação satisfatória (100,02 ± 1,11 % e 101,32 ± 1,36 %). O método ainda se caracterizou seletivo e robusto para quantificação de ACG e CQT no Sanativo[®] e foi considerado validado.

Unitermos: *Schinus terebinthifolius*, *Piptadenia colubrina*, ácido gálico, catequina, CLAE, validação, Sanativo[®], Fitoterápico.

ABSTRACT

The herbal medicine Sanativo[®] is produced by the Pernambucano Laboratory since 1888 with indications of healing and hemostasis. It is composed of a fluid extract about *Piptadenia colubrina*, *Schinus terebinthifolius*, *Cereus peruvianus* and *Physalis angulata*. Among the plants in their composition, *S. terebinthifolius* and *P. colubrina* have in common phenolic compounds which are assigned most of its pharmacological effects. The tannins, gallic acid and catechin were selected as markers for quality control. The aim of this study was the development and validation of analytical method by HPLC/UV/DAD for the separation and simultaneous quantification of gallic acid (GAC) and catechin (CTQ) in Sanativo[®]. The chromatographic system was to stationary phase, C-18 RP column, 4,6 x 150 mm (5 mm) under a temperature of 35 °C, detection at 270 and 210 nm. The mobile phase consisted of 0.05% trifluoroacetic acid and methanol in the proportions 88:12 (v/v), a flow rate of 1 ml/min. The analytical method presented a retention factor of 0.30 and 1.36, tail factor of 1.8 and 1.63 for gallic acid and catechin, respectively, resolution of 18.2, and theoretical plates above 2000. The method validation parameters met the requirements of Resolution n^o 899 of May 29, 2003, ANVISA. The correlation coefficient of linear regression analysis for GAC and CTQ from the standard solution was 0.9958 and 0.9973 and when performed from the Sanativo[®] 0.9973 and 0.9936, the matrix does not interfere in the range 70 to 110 %. The limits of detection and quantification for GAC and CQT were 3.25 and 0.863, and 9.57 and 2.55 mg/mL, respectively. The markers, GAC and CQT, showed repetibility (coefficient of variation of 0.94 % and 2.36 %) and satisfactory recovery (100.02 ± 1.11 % and 101.32 ± 1.36 %). The method has been characterized selective and robust quantification of GAC and CTQ in the Sanativo[®] and was considered validated.

Key-words: *Schinus terebinthifolius*, *Piptadenia colubrina*, HPLC, galic acid, catechin, Sanativo[®], validation, herbal drug.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ACG	Ácido Gálico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTQ	Catequina
C18	Octadecilsilano
FR-CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Fase Reversa
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
FDA	Agência Americana de Alimentos e Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FM	Fase Móvel
ICH	International Conference on Harmonisation
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
M	Molar
Mm	Milimolar
pH	Potencial Hidrogeniônico
SE	Solução Estoque
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
AS	Saboroud
TSA	Ágar triptona de soja
USP	Farmacopeia Americana (<i>United States Pharmacopoeia</i>)
UV/Vis	Ultravioleta-visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografia do arbusto, folhas e frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i>	29
Figura 2 – Fotografia da árvore, folhas e flor de <i>Piptadenia colubrina</i>	39
Figura 3 – Mecanismo para a formação do complexo tanino-proteína.....	45
Figura 4 – Estrutura dos taninos hidrolisáveis.....	46
Figura 5 – Estrutura dos taninos condensados.....	46
Figura 6 – Monômeros formadores dos taninos condensados.....	47
Figura 7 – Estrutura química do ácido gálico.....	49
Figura 8 – Estrutura química da catequina.....	50
Figura 9 – Representação de um equipamento de CLAE.....	54
Figura 10 – Separação cromatográfica de duas substâncias.....	65
Figura 11 – Cromatograma representando a assimetria do pico.....	65
Figura 12 – Material vegetal trabalhado, casca triturada de <i>S. terebinthifolius</i> e <i>P. colubrina</i>	69
Figura 13 – Tamisador automático utilizado na determinação da faixa granulométrica.....	71
Figura 14 – Distribuição granulométrica do <i>S. terebinthifolius</i>	83
Figura 15 – Distribuição granulométrica do <i>P. colubrina</i>	83
Figura 16 – Placas para SA, placa de TSA após incubação para contagem de microrganismos mesófilos.....	88
Figura 17 – Placas de Baird-Parker (BP) e Mac Conkey (MC) após incubação para pesquisa e identificações de patógenos no medicamento fitoterápico Sanativo [®]	88
Figura 18 – Análise cromatográfica exploratória do ácido gálico.....	89
Figura 19 – Análise cromatográfica exploratória da catequina.....	89
Figura 20 – Cromatograma analisado com a proporção de fase móvel A e B selecionada.....	91
Figura 21 – Espectro de varredura dos picos do ácido gálico e catequina.....	92
Figura 22 – Cromatograma dos padrões de ácido gálico e catequina em 270 nm.....	93
Figura 23 – Cromatogramas obtidos em 270 nm para as soluções extrativas de <i>P. colubrina</i> (A) e <i>S. terebinthifolius</i> (B); e, produto acabado (Elixir Sanativo [®]) (C).....	94
Figura 24 – Cromatograma dos padrões de ácido gálico e catequina em 210 nm.....	95
Figura 25 – Cromatogramas obtidos em 210 nm para as soluções extrativas de <i>P. colubrina</i> (A) e <i>S. terebinthifolius</i> (B); e, produto acabado (Elixir Sanativo [®]) (C).....	96
Figura 26 – Cromatograma do diluente dos marcadores e da amostra.....	97
Figura 27 – Análise de pureza do padrão ácido gálico.....	98
Figura 28 – Análise de pureza do padrão catequina.....	98
Figura 29 – Cromatogramas: Sanativo [®] adicionado de ácido gálico (vermelho); Sanativo [®] adicionado de catequina (verde) e Sanativo [®] (vermelho escuro).....	99
Figura 30 – Cromatogramas: marcadores ácido gálico e catequina (preto); Sanativo [®] diluído 3:10 (v/v) na fase móvel (vermelho).....	99
Figura 31 – Linearidade obtida com a média das três curvas de calibração da	102

solução do padrão de Ácido Gálico.....	104
Figura 32 – Linearidade obtida com a média das três curvas de calibração da solução padrão de Catequina.....	104
Figura 33 – Linearidade para ácido gálico obtida com o Sanativo®.....	104
Figura 34 – Linearidade para catequina obtida com o Sanativo®.....	105
Figura 35 – Cromatogramas obtidos em 210 nm para as soluções extrativas de <i>P. colubrina</i> (A) e <i>S. terebinthifolius</i> (B); e, produto acabado (Elixir Sanativo®) (C).....	110
Figura 36 – Espectro de varredura do pico com TR de 37 minutos, detectado em 210 ou 270 nm, e, presente no macerado de <i>P. colubrina</i> e no Elixir Sanativo®.....	111
Figura 37 – Cromatograma para os padrões de ácido gálico e de catequina em 340 nm.....	112
Figura 38 – Cromatogramas obtidos em 340 nm para as soluções extrativas de <i>P. colubrina</i> (A) e <i>S. terebinthifolia</i> (B); e, produto acabado (Elixir Sanativo®) (C).....	113
Figura 39 – Espectro de varredura do pico com TR de 15 minutos, detectado em 340 nm, e, presente no macerado <i>S. terebinthifolius</i> e no Elixir Sanativo®.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gradiente exploratório para desenvolvimento do método analítico.....	76
Tabela 2 – Combinações isocráticas das fases móveis avaliadas.....	76
Tabela 3 – Dados para preparo da curva de calibração.....	80
Tabela 4 – Dados para preparo da linearidade dos marcadores a partir do Sanativo®	80
Tabela 5 – Dados para preparo da exatidão.....	81
Tabela 6 – Porcentual de água nas drogas vegetais <i>S. terebinthifolius</i> e <i>P. colubrina</i> determinadas em estufa e balança com infravermelho.....	84
Tabela 7 – Determinação de cinzas totais nas drogas vegetais.....	85
Tabela 8 – Determinação de pH do Sanativo®	86
Tabela 9 – Combinações avaliadas de eluição isocrática da fase móvel para análise de ACG e CTQ e verificação parcial de conformidade com o sistema cromatográfico.....	90
Tabela 10 – Adequabilidade do sistema para o método desenvolvido.....	91
Tabela 11 – Avaliação da interferência da temperatura de forno de coluna no método.....	100
Tabela 12 – Avaliação da interferência da velocidade do fluxo no método.....	100
Tabela 13 – Resultado para diferentes colunas no método.....	101
Tabela 14 – Áreas dos picos cromatográficos das curvas de calibração da solução padrão de ácido gálico.....	102
Tabela 15 – Áreas dos picos cromatográficos das curvas de calibração da solução padrão de catequina.....	103
Tabela 16 – Limite de detecção e limite de quantificação.....	105
Tabela 17 – Dados de repetibilidade para o ácido gálico e catequina.....	106
Tabela 18 – Dados para precisão intermediária do ácido gálico.....	107
Tabela 19 – Dados para precisão intermediária da catequina.....	107
Tabela 20 – Resultados obtidos na avaliação da exatidão para ácido gálico.....	108
Tabela 21 – Resultados obtidos na avaliação da exatidão para catequina.....	108
Tabela 22 – Áreas dos picos referentes aos marcadores observados nas diversas amostras e detectados em 210, 270 ou 340 nm.....	112

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação científica de <i>S. terebinthifolius</i>	28
Quadro 2 – Classificação científica de <i>P. colubrina</i>	38
Quadro 3 – Composição química do medicamento fitoterápico Sanativo®	51
Quadro 4 – Principais componentes da CLAE e algumas de suas características.....	55
Quadro 5 – Parâmetros de conformidade do sistema de CLAE.....	64
Quadro 6 – Parâmetros selecionados na avaliação da robustez.....	79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 FITOTERÁPICOS	24
2.1.1 Controle de qualidade de fitoterápicos.....	25
2.2 <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	28
2.2.1 Aspecto botânico.....	30
2.2.2 Uso popular.....	31
2.2.3 Composição química.....	32
2.2.4 Atividade farmacológica.....	33
2.2.5 Estudos toxicológicos.....	37
2.3 <i>Piptadenia colubrina</i> Benth	38
2.3.1 Aspecto botânico.....	39
2.3.2 Uso popular.....	40
2.3.3 Composição química.....	40
2.3.4 Atividade farmacológica.....	41
2.3.5 Estudos toxicológicos.....	43
2.4 TANINOS	43
2.4.1 Ácido gálico.....	49
2.4.2 Catequina.....	50
2.5 MEDICAMENTO FITOTERÁPICO: SANATIVO[®]	51
2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	53
2.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO E CATEQUINA	55
2.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	56
2.8.1 Especificidade e seletividade.....	58
2.8.2 Linearidade.....	59
2.8.3 Intervalo.....	60
2.8.4 Precisão.....	60

2.8.5 Limite de detecção.....	61
2.8.6 Limite de quantificação.....	62
2.8.7 Exatidão.....	62
2.8.8 Robustez.....	63
2.9 CONFORMIDADE DO SISTEMA.....	63
3 OBJETIVOS.....	67
3.1 Objetivo geral.....	67
3.2 Objetivos específicos.....	67
4 METODOLOGIA.....	69
4.1 MATERIAIS.....	69
4.1.1 Material vegetal.....	69
4.1.2 Padrões.....	70
4.1.3 Equipamentos utilizados.....	70
4.1.4 Reagentes.....	71
4.2 MÉTODOS.....	71
4.2.1 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL.....	71
4.2.1.1 Determinação granulométrica por tamisação.....	71
4.2.1.2 Ensaio de pureza.....	72
4.2.1.2.1 Determinação de água em droga vegetal.....	72
4.2.1.2.2 Determinação de cinzas totais.....	72
4.2.2 CONTROLE FÍSICO-QUÍMICO DO SANATIVO®.....	73
4.2.2.1 Determinação da densidade relativa.....	73
4.2.2.2 Determinação de pH.....	73
4.2.2.3 Determinação de resíduo seco total.....	73
4.2.3 CONTROLE MICROBIOLÓGICO DO SANATIVO®.....	74
4.2.3.1 Contagem do número total de microrganismos mesófilos.....	74
4.2.3.2 Pesquisa e identificação de patógenos.....	74
4.2.4 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	75
4.2.4.1 Varredura espectral para determinação do comprimento de onda....	75
4.2.4.2 Alteração da fase móvel.....	77
4.2.4.3 Análise da seletividade do método.....	77

4.2.4.4 Análise da pureza do pico.....	77
4.2.5 MÉTODO PROPOSTO.....	77
4.2.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	78
4.2.6.1 Robustez.....	79
4.2.6.2 Linearidade e intervalo.....	79
4.2.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	80
4.2.6.4 Precisão - Repetibilidade.....	81
4.2.6.5 Precisão – Precisão intermediária.....	81
4.2.6.6 Exatidão	81
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL.....	83
5.1.1 Análise granulométrica por tamisação.....	83
5.1.2 Análise de pureza.....	84
5.1.2.1 Determinação de água em droga vegetal.....	84
5.1.2.2 Determinação de cinzas totais.....	85
5.2 CONTROLE DE QUALIDADE DO SANATIVO®.....	86
5.2.1 Controle físico-químico.....	86
5.2.1.1 Densidade relativa.....	86
5.2.1.2 pH.....	86
5.2.1.3 Determinação de resíduo seco.....	87
5.3 CONTROLE MICROBIOLÓGICO.....	87
5.3.1 Contagem do número total de microrganismos mesófilos.....	87
5.3.2 Pesquisa e identificação de patógenos.....	88
5.4 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	88
5.4.1 Análise dos marcadores durante gradiente exploratório.....	88
5.4.2 Avaliação de combinações isocráticas de Fase Móvel.....	90
5.4.3 Alteração da fase móvel.....	91
5.4.4 Espectro de varredura dos marcadores.....	92
5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	97
5.5.1 Avaliação da seletividade do método.....	97
5.5.2 Adição dos marcadores ao medicamento fitoterápico Sanativo®.....	98

5.5.3 Robustez.....	100
5.5.4 Linearidade e intervalo.....	101
5.5.4.1 Linearidade do ácido gálico.....	101
5.5.4.2 Linearidade da Catequina.....	103
5.5.4.3 Linearidade do ácido gálico e catequina no Sanativo®.....	104
5.5.5 Limite de detecção e quantificação.....	105
5.5.6 Precisão	105
5.5.6.1 Repetibilidade.....	105
5.5.6.2 Precisão intermediária.....	106
5.5.7 Exatidão.....	108
5.8 DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES DE IDENTIDADE.....	109
6 CONCLUSÕES	116
7 REFERÊNCIAS	119



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A transformação de uma planta em medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e segurança de utilização. Para alcançar esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer estudos prévios relativos ao desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas. É justamente essa fundamentação que diferencia o medicamento fitoterápico propriamente dito das plantas medicinais e das preparações utilizadas na medicina popular (SONAGLIO et al., 2001).

Segundo a ANVISA, fitoterápicos são medicamentos obtidos 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 tecnocientíficas 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 (BRASIL, 2010a).

A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 14/2010, regulamentação em vigor para o registro de medicamentos fitoterápicos, determina que, para efeito de registro, se faz necessário à elaboração de um relatório de controle de qualidade, incluindo análises qualitativas e quantitativas dos princípios ativos e/ou marcadores. E o marcador é o composto ou classe de compostos químicos (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.) presentes na matéria-prima vegetal, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico (BRASIL, 2010a).

A padronização de matérias-primas e produtos derivados de plantas tem sido usualmente realizada por procedimentos cromatográficos (HOSTETTMANN et al., 1997; OLIVEIRA, BRAGA, 2003). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem criado novas possibilidades analíticas na padronização de amostras complexas, como os extratos vegetais (SCHENKEL et al., 2004).

A escassez de metodologias adequadas para o monitoramento de todo o processo produtivo torna-se um fator limitante para a comercialização de produtos de qualidade comprovada.

Diversos estudos comprovaram experimentalmente que a espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi, conhecida em diversas regiões do Brasil como aroeira da praia, possui ação antimicrobiana, anti-inflamatória e antiulcerogênica, corroborando com seu largo emprego na medicina popular (DE MELO JUNIOR et al., 2002; MEDEIROS et al., 2007; SANTOS et al., 2010).

Segundo Pio Corrêa (1978) a espécie *Piptadenia colubrina* (Vell) Brenth, popularmente conhecida como angico, apresenta casca amarga, adstringente com aproximadamente 32% de taninos na entrecasca. Sendo empregado na indústria de curtume e também nas infecções pulmonares e das vias respiratórias. Contudo estudos científicos são raros com essa planta.

Taninos são substâncias polifenólicas naturais de relativo peso molecular que estão entre constituintes químicos mais pesquisados em aroeira da praia e angico devido à sua alta concentração e atividades biológicas relacionadas. Trabalhos realizados têm demonstrado as atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, anticarcinogênica, antimutagênica e antioxidante presentes nos extratos de várias espécies de plantas ricas nesse componente (ARAUJO, 2002; BULHÕES; SILVA; SÁ, 1976; NOZELLA, 2001), justificando seu uso como marcador.

Os mais antigos e tradicionais métodos de doseamento de taninos são o método da hemoanálise, baseado na formação do complexo tanino-hemoglobina; o método com pó de pele, fundamentado na capacidade dos taninos de se ligarem às proteínas da pele e; o método espectrofotométrico no qual se utiliza o reagente de Folin-Denis ou de Folin-Ciocalteu (VERZA et al., 2007). Tais métodos são trabalhosos e inespecíficos.

Este trabalho é um grande desafio, uma vez que trata de fitoterápico multicomposto, e a caracterização de marcadores para as plantas se faz fundamental para o controle de qualidade e conseqüentemente seu registro junto ao órgão regulador, ANVISA.

Desenvolver um método simples e robusto por CLAE comum aos marcadores, ácido gálico e catequina, representantes de tanino hidrolisável e tanino condensado, respectivamente, faz-se necessário para o controle de qualidade de fitoterápicos com compostos fenólicos. Métodos complexos, com reagentes de custos elevados e em constante falta no mercado são descritos na literatura o que dificulta a realização contínua da análise dos produtos.

Validar é um aspecto vital para garantir a qualidade de um método analítico, pois evidencia e avalia características que demonstram a sua aplicabilidade e confiabilidade para o fim pretendido (CASS, DEGANNI, 2001). Baseado nessas afirmações buscou-se desenvolver e validar um método para análise do medicamento fitoterápico Sanativo[®] que é produzido desde 1888 pelo Laboratório Pernambucano LTDA.



REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FITOTERÁPICOS

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelo homem das cavernas até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial (LORENZI; MATOS, 2008). As plantas medicinais podem estar sendo veiculadas em diversas formas que incluem desde as drogas vegetais até os fitoterápicos.

De acordo com a legislação em vigor no país, entende-se como fitoterápico “aquele medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais. E caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3” (BRASIL, 2010a). Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados, direta ou indiretamente, a partir de plantas medicinais, principalmente através da aplicação de tecnologia moderna para o conhecimento tradicional. No caso de certas classes de produtos farmacêuticos, tais como medicamentos antitumorais e antimicrobianos, esta percentagem pode alcançar 60% (ROBINSON; ZHANG, 2011).

Entre 70% e 95% da população dos países em desenvolvimento, especialmente na Ásia, África, América Latina e no Oriente Médio, faz o uso da medicina tradicional, incluindo medicamentos tradicionais e fitoterápicos, para os cuidados

primários da saúde (ROBINSON; ZHANG, 2011). Visando diminuir o número de excluídos dos sistemas governamentais de saúde, recomenda-se aos órgãos governamentais responsáveis pela saúde pública de cada país, que procedam a levantamentos regionais das plantas usadas na medicina tradicional, identifique-as botanicamente, estimulem e recomendem o uso daquelas que tiverem comprovadas sua eficiência e segurança terapêutica (LORENZI; MATOS, 2008).

De uma forma geral, a procura por plantas medicinais tem aumentado, seja pelo fácil acesso ou, ainda, da comercialização da planta fresca, em mercados livres a custos inferiores ao medicamento industrializado. Outro motivo encontra-se no apelo convidativo ao “produto de origem natural”, tal aspecto deve ser visto com cautela, uma vez que se conhecem a complexidade de sua composição e a possibilidade de produzir reações adversas, à semelhança de qualquer medicamento alopático (GIL, 2007).

2.1.1 Controle de qualidade de fitoterápicos

A Resolução-RDC nº14, de 31 de março de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, regula os medicamentos fitoterápicos, e exige para efeito de registro um relatório de controle de qualidade. Este controle deve ser realizado não só para o produto final, mas também a matéria-prima vegetal e seus produtos intermediários (BRASIL, 2010a). Sabe-se que a complexidade química de drogas vegetais, aliada à dificuldade inerente aos processos de caracterização química e farmacológica, dificulta a comprovação da segurança, qualidade e eficácia dos medicamentos fitoterápicos (CARVALHO et al., 2007).

Para tanto, a produção de fitoterápicos requer estudos prévios de vários aspectos (agronômicos, botânicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos) e de

desenvolvimento de metodologia analítica (PETROVICK et al., 1997; OLIVEIRA, 2005).

A avaliação de desenvolvimento de metodologia analítica deve abranger a caracterização física e físico-química, a determinação qualitativa e quantitativa dos princípios ativos e/ou marcadores, quando conhecidos, ou classes de compostos químicos característicos da espécie (OLIVEIRA, 2005).

A caracterização compreende a determinação de três características principais: a autenticidade, a integridade e a pureza do material em análise. Nesse contexto, de acordo com o material em estudo, pode estar envolvida a caracterização organoléptica, a identificação macroscópica e microscópica do órgão vegetal, a pesquisa de materiais estranhos e contaminantes biológicos, a umidade, as cinzas totais e insolúveis em ácido (FARIAS, 2000; BRASIL, 2010a).

A determinação quantitativa envolve o desenvolvimento do método analítico e a utilização de métodos espectrofotométricos, cromatográficos, físicos, físico-químicos ou químicos. Contudo, esse é o passo mais difícil do controle de qualidade de fitoterápicos, pois os componentes ativos normalmente não são conhecidos, quando isso ocorre as análises são realizadas com uso de marcadores. Segundo a definição da RDC 14/2010, marcador é um componente ou classe de compostos químicos presente na matéria-prima vegetal, idealmente correlacionado com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos fitoterápicos. Estes componentes são importantes tanto na padronização como nos estudos de estabilidades dos fitoterápicos (OLIVEIRA; BERRETA, 2007; BANDARANAYAKE, 2006; BRASIL, 2010a; EMEA, 2005, 2008).

A Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos (EMA) classifica os marcadores em duas classes: marcadores analíticos e marcadores ativos. Marcadores analíticos são os constituintes ou grupos de constituintes que servem

exclusivamente para fins analíticos, enquanto os marcadores ativos são constituintes ou grupos de constituintes que contribuem para atividades terapêuticas (EMEA, 2008). Li e colaboradores (2008) sugeriram a divisão dos marcadores químicos em oito categorias: (1) componentes terapêuticos, (2) componentes bioativos, (3) componentes sinérgicos, (4) componentes característicos, (5) componentes principais, (6) componentes correlativos, (7) componentes tóxicos, e por últimos, (8) componentes gerais, usados com perfil fitoquímico. Todos os marcadores podem contribuir para a avaliação, padronização e avaliação da segurança de medicamentos fitoterápicos, principalmente quando se trata de um fitoterápico com associação de diferentes plantas que possuem metabólitos secundários em comum.

No caso de associações, é necessário que se determine um marcador específico para cada planta. A soma das quantidades medidas de um mesmo marcador em diferentes plantas no produto final pode não ser correta, por não possibilitar a avaliação da proporção de cada planta no produto acabado (NETTO et al., 2006).

Todos os lotes de um fitoterápico deverão ser reproduzidos com uma quantidade similar do marcador. Atualmente, não se considera apropriado o uso de uma classe de composto químico como marcador, sendo aceito apenas quando não se consegue identificar substâncias específicas e procedimentos analíticos adicionais são recomendados, como perfil fitoquímico cromatográfico. Na ausência de uma substância específica identificada, podem-se quantificar vários marcadores e estabelecer uma relação fixa entre eles que caracterize o extrato e o produto final (BANDARANAYAKE, 2006; EMEA, 2005; NETTO et al., 2006).

O emprego de técnicas cromatográficas e analíticas que permitam a separação e o isolamento de substâncias de um extrativo vegetal mostra-se vantajoso para a padronização do material vegetal e produtos relacionados (DRASARA; MORAVCOVA, 2004; LIU et al., 2007). Dentre as vantagens têm-se maior rapidez,

alta sensibilidade e seletividade além de proporcionar a identificação da presença dos marcadores e também de outros compostos, oferecendo uma caracterização completa da planta ou do produto analisado além de permitir a distinção entre espécies próximas (DRASARA; MORAVCOVA, 2004; LIU et al., 2007; SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

A validação de todos os métodos analíticos empregados na avaliação da qualidade é indispensável e colabora com as Boas Práticas de Fabricação (GIL, 2007).

2.2 *Schinus terebinthifolius* Raddi

Schinus terebinthifolius Raddi (figura 1) pertence a família Anacardiaceae e é nativa do Brasil, Paraguai e Argentina. É popularmente conhecida como aroeira-da-praia, aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira e pimenta brasileira. Esta variação nos nomes se dá, principalmente, pelo fato de seus frutos possuírem a aparência de uma pequena pimenta de coloração rosa-avermelhada (LORENZI; MATOS, 2008). O Quadro 1 descreve a classificação científica de *S. terebinthifolius* (DALCIN, 2001).

Quadro 1 - Classificação científica de *Schinus terebinthifolius* Raddi

Reino	Plantae
Divisão	Anthophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Sapindales
Família	Anacardiaceae
Gênero	<i>Schinus</i>

Contudo também há relatos com os nomes populares de: aguaraíba, aroeira-branca, aroeira-do-brejo, aroeira-do-campo, aroeira-vermelha-do-paraná, aroeira-mansa, aroeira-negra, aroeira-precoce, bálsamo, cabuí, cambuí, coração-de-bugre, corneíba, fruto-de-raposa, fruto-de-sabiá (LORENZI; MATOS, 2008).

É distribuída do nordeste ao sul da costa brasileira. Faz parte do elenco das plantas validadas como medicinais pelo projeto Farmácias Vivas no Nordeste (MATOS, 2002). Foi introduzida em vários países do mundo com fins ornamentais, mas acabou sendo considerada uma praga, ou planta invasora (MORTON, 1978; MEDAL et al., 1999). Nos Estados Unidos foi introduzida com o nome de “Brazilian Peper Tree”.

São descritas as sinóníma *Sarcotheca bahiensis* Turcz., *Schinus mellisii* Engl., *Schinus mucronulata* Mart., *Schinus terebinthifolia* var. *damaziana* Beauverd, *Schinus terebinthifolia* var. *raddiana* Engl (LORENZI; MATOS, 2008).



Figura 1 – Fotografia do arbusto, folhas e frutos de *S. terebinthifolius*. Fonte: Lorenzi, 1998. v.1; Paulo Schwirkowski, 2009

2.2.1 Aspecto botânico

É uma árvore ornamental, medindo de 5-10 m de altura, perenifólia, dioica, de copa larga e tronco com 30 a 60 cm de diâmetro, suas flores são melíferas e sua madeira é moderadamente pesada revestida por casca grossa, resistente e de grande durabilidade natural. A casca apresenta-se em pedaços curvos ou enrolados em tubo, de comprimento variável, com 1 a 5 mm de espessura. Sua superfície externa é de cor pardo-acinzentada, profundamente fendida no sentido longitudinal e um tanto no sentido transversal. É muito rugosa, apresenta-se irregularmente com manchas mais claras e apresenta, de espaço em espaço, placas de líquens. A face interna é estriada longitudinalmente e de cor pardo-avermelhada. A casca é impregnada de matéria resinosa, que aparece frequentemente em sua superfície (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998; MATOS, 2007).

As folhas são compostas imparipinadas, com 3 a 10 pares de folíolos aromáticos alternados, oblongos ou obtusos e crenado nas margens, medindo de 3 a 5 cm de comprimento por 2 a 3 cm de largura. Flores masculinas e femininas muito pequenas, dispostas em panículas piramidais (LORENZI; MATOS, 2008; SANTOS, 1988). Fruto do tipo drupa, globoíde com cerca de 5 mm de diâmetro, aromático, adocicado e apimentado, brilhante e a princípio verdes e posteriormente de cor vermelha, se apresentam agrupados em cachos e são requisitados pelo mercado nacional e internacional, pela indústria de alimentos e cosméticos, na França, como especiaria recebe o nome de *poivre rose* (SANTOS, 1988; LENZI; ORTH 2004; CERUKS, 2007). Pode ser cultivada a partir de sementes ou por estaquia. Suas sementes, quando semeadas logo após a colheita em canteiros a pleno sol e com substrato argiloso, apresentam emergência em 10-15 dias com uma taxa de germinação superior a 50 %. O desenvolvimento das plantas no campo é bastante rápido (LORENZI; MATOS, 2008).

2.2.2 Uso popular

Ngokwey (1995) descreveu uma pesquisa de campo realizada em Feira de Santana – Bahia, que a aroeira-da-praia foi a décima espécie medicinal mais usada na medicina popular. Enquadrando-se no grupo das onze mais consumidas, o que correspondeu a um terço do total de 138 plantas citadas. Em outro estudo feito por Stasi e colaboradores (2002) com habitantes da zona rural e urbana de cidades do estado de São Paulo sobre as plantas mais utilizadas na medicina popular, as suas folhas foram citadas por vários entrevistados como possuidora de atividades analgésica, no combate ao reumatismo e gengivite (BERTOLDI, 2006).

Na medicina popular, Peckolt (1939) e Pio Corrêa (1926) descreveram como antidiarreico e anti-inflamatório, o que foi confirmado pelos demais pesquisadores, que citaram também sua utilização como um remédio para úlceras, problemas respiratórios, feridas, reumatismo, gota, tumores, doenças de pele e artrite (MORTON, 1978) e como um antisséptico, balsâmico e hemostático, sendo amplamente utilizado na forma de cozimento (decoção) da casca (BRAGA, 1960; GRUENWALD, BRENDLER, JAENICKKE, 2000; MATOS, 2002; MEDEIROS et al., 2007). Relatou-se ainda utilização no tratamento de doenças venéreas, dores, gengivite e febre (NGOKWEY, 1995; STASI et al., 2002). As partes da planta que possuem utilização nas preparações da medicina popular são as cascas, os folíolos, as sementes e os frutos (BALBACH, 1984).

O cozimento (decocto) da casca é utilizado especialmente por mulheres, durante vários dias, em banhos de assento após o parto como anti-inflamatório e cicatrizante, ou medicação caseira para o tratamento de doenças do sistema urinário e aparelho respiratório, bem como nos casos de hemoptise e hemorragia uterina (BRAGA, 1960; AMORIN; SANTOS, 2003; SANTI, 2003).

2.2.3 Composição química

Genericamente, as folhas e frutos da aroeira da praia são ricos em taninos hidrolisáveis e óleos essenciais (1,5 - 10 %) (JORGE; MARKMANN, 1996) e estudos relataram altas concentrações de monoterpenos (STAHL, KELLER, BLINN, 1983; MALIK, MAHMUD, SATTER, 1994), juntamente com alguns sesquiterpenos (SINGH et al., 1998; RICHTER et al., 2010).

Nas folhas

Nas folhas, Cerusk e colaboradores (2007) identificaram quercertina e miricetina, miricetrina, galato de etila e galato de metila. Carvalher-Machado et al., (2008) também encontrou galato de metila, além de 1,2,3,4,6-pentagalactoliglicose e ácido gálico que analisou a fração acetato de etila.

Nos frutos

Skopp e Schwenker (1986) identificaram três biflavonóides, tetrahydroamentoflavona, amentoflavona, 2-3-di-hidroamentoflavona, além de ácido gálico.

Também foram descritos alfa-amirina, alfa amirenona, beta-carofileno, ácido ursólico e ácido masticadienóico (LLYOYD et al., 1997) e algumas flavonas, tais como robustaflavona, tetrahidrorobustoflavona e agatisflavona (KASSEM et al., 2004).

Na casca e entrecasca

Análises fitoquímicas da entrecasca citam a presença de alto teor de tanino, óleo essencial e saponinas (BÓRIO et al., 1973). Campelo e Marsaioli descrevem a presença de baurenona, alfa-amirina e alfa-amirenona nas cascas (1975).

O perfil fitoquímico obtido por Martorelli e colaboradores (2011) a partir de extrato oriundo das cascas do caule de aroeira da praia demonstrou uma predominância de compostos polifenólicos e terpenóides, dentre os polifenóis

confirmou-se a existência de alta concentração de taninos catéquicos, bem como a presença de ácido gálico.

Ácido gálico foi encontrado nas cascas (CARVALHO et al., 2009; MARTORELLI, 2011), folhas (CRUZ et al., 2007; CARVALHER-MACHADO et al., 2008) e nos frutos (SKOPP e SCHWENKER, 1986). Catequina foi identificada por Farag, 2008, este também relatou miricetina 3-O- β -D-glucoronídeo, ácido clorogênico, ácido 5-O-cumaoilquínico e ácido clorogênico, todos nas folhas, não foi encontrado trabalho evidenciando a presença de catequina nas cascas de aroeira da praia.

Em todas as partes da planta foi identificada a presença de pequena quantidade de alqui-fenois, substâncias causadoras de dermatite alérgica em pessoas sensíveis (REICHERT, et al., 1945; GRUENWALD, BRENDLER, JAENICKKE, 2000).

2.2.4 Atividade farmacológica

Ensaio pré-clínicos

I) *In vitro*

Martinez e colaboradores (1996) estudaram ação antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, avaliando o diâmetro da zona de inibição de crescimento microbiano de algumas espécies de plantas. E *S. terebinthifolius* foi a que apresentou melhor atividade, sendo ativa contra *S. aureus*.

O extrato alcoólico de frutos da *S. terebinthifolius* apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Bacillus cereus* ATCC 11778, já o extrato aquoso não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento dos microrganismos testados. Foi utilizado o método de difusão de disco de papel no meio Muller Hinton, com discos de 6 mm de diâmetro, embebidos com 20 μ L de solução a 100 mg/mL dos extratos em estudo e microrganismos padronizados pela densidade ótica de 0,45 de absorbância em

comprimento de onda de 450 nm, com uma concentração de 10^8 células/mL (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PRADO, 2005).

Schmourlo e colaboradores (2005) relataram a atividade antifúngica dos extratos aquosos dos frutos de *Schinus terebinthifolius* sobre a espécie de levedura *Candida albicans* com valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 120 ng/mL e zona de inibição de 15 mm.

Gundidza e coladoradores (2009) utilizaram o método de difusão em placa no óleo essencial obtidos das folhas secas de *S. terebinthifolius* e este apresentou atividade antibacteriana potente contra *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus subtilis* com inibição pelo menos 58 % comparado ao controle positivo (amostra isenta de óleo). O método de inibição de crescimento micelial foi utilizado para avaliar atividade antifúngica. O óleo essencial apresentou atividade contra *Aspergillus flavus* com inibição de 58 %, *Candida albicans* com inibição de 49,8 % e *Aspergillus niger* com inibição de 48,7 %. O método de ácido linoléico foi realizado para avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial, o óleo essencial mostrou atividade antioxidante média de 13,1 milímetros na zona de retenção de cor, o que representa a atividade de 72,7 %, quando comparado com o controle positivo (ácido ascórbico).

II) *In vivo*

O estudo de Lucena e colaboradores (2006) relatou que extrato hidroalcolico da casca de *S. terebinthifolius* apresenta ação cicatrizante favorável nas cistostomias em ratos, avaliado após observar os resultados obtidos com injeção 100 mg por quilo de peso na cavidade peritoneal de 20 ratos machos da linhagem Wistar submetidos à incisão abdominal mediana com cistotomia de 1 cm, seguida de

cistorrafia em plano único, procedimento realizado também em 20 ratos do grupo controle, nestes injetou-se 1 mL por quilo de peso de solução salina a 0,9%.

Coutinho e colaboradores (2006) avaliaram a atividade cicatrizante do extrato hidroalcoólico da entrecasca seca de aroeira, administrada via intraperitoneal, na dose de 100 mg/kg, no processo de cicatrização de anastomoses de cólon em ratos, através da análise de aspectos macroscópicos, microscópicos e tensiométricos, contudo somente observou efeito favorável a nível microscópico.

Carvalher-Machado e colaboradores (2008) demonstraram através de estudos *in vivo*, uma importante atividade antialérgica da fração acetato de etila, obtida das folhas de *S. terebinthifolius* e dos compostos isolados desta fração, o ácido gálico, metil galato e 1,2,3,4,6-pentagalactooligose. A fração de aroeira (100 mg/kg e 200 mg/kg), administradas oralmente, foram capazes de reduzir o edema de pata induzida por histamina em relação ao controle (prometazina). O extrato aquoso (100 mg/kg), administrado via oral, inibiu significativamente o total de leucócitos e acúmulo de eosinófilos na cavidade pleural, 24 horas após a injeção intratorácica de ovoalbumina (12,5 mg/cavidade), em relação a dexametasona administrada por via intraperitoneal (10 mg/kg).

Em estudo recente realizado por Carlini e colaboradores (2010), o decocto da casca foi liofilizado e o equivalente a dose administrada na medicina popular, uma xícara de chá, o que correspondeu a 17,6 mg/kg foi administrado por sonda gástrica ou injeção intraperitoneal, apresentando um marcante efeito protetor da mucosa gástrica contra as ulcerações induzidas por estresse de imobilização em baixa temperatura em ratos. Verificando-se ainda: elevação do pH do volume do conteúdo gástrico, redução das hemorragias gástricas e do trânsito intestinal em camundongos, mesmo em doses reduzidas como 3,4 mg/kg (1/4 da dose utilizada pelo homem).

Ensaio clínicos

Amorim e Santos (2002) realizaram um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado, comparando o uso do gel vaginal de aroeira, produzido com extrato hidroalcoólico da casca (25 casos), com placebo (23 casos) em 48 mulheres com vaginose bacteriana sintomática, de acordo com os parâmetros clínicos de Amsel e colaboradores (1983): características do corrimento vaginal, o pH maior que 4,5, a positividade do teste do *whiff* e a presença de células-guia na bacterioscopia. Pelo menos três destes quatro critérios devem estar presentes. O estudo indicou que o gel vaginal de aroeira é efetivo e seguro para o tratamento da vaginose bacteriana, a taxa de cura chegou a 84%, sendo superior ao placebo e apresentou frequência significativamente maior entre lactobacilos na colpocitologia do que entre as pacientes tratadas com aroeira-da-praia em relação às tratadas com placebo. Efeitos adversos relacionados ao tratamento não foram frequentes em ambos os grupos.

A eficácia e segurança do uso oral de *S. terebinthifolius* foi comparada ao omeprazol no tratamento de pacientes com sintomas dispépticos associados à gastrite, através de um estudo clínico prospectivo, randomizado e duplo-cego. O estudo foi dividido em 2 grupos para receberem ou a apresentação de extrato seco *S. terebinthifolius* 233,6mg 2x/dia, durante quatro semanas ou omeprazol 20mg 2x/dia, durante quatro semanas, via oral. Os resultados indicam que a aroeira pode ser de valor clínico no tratamento de sintomas dispépticos em pacientes com gastrite e na erradicação do *H. pylori*, de forma não menos eficaz que o omeprazol, além das vantagens de ser um fitomedicamento, de baixo custo e fácil acesso (SANTOS et al., 2010).

O extrato hidroalcoólico de aroeira-da-praia 30% em Orobase aplicado diariamente tem efeito anti-inflamatório e cicatrizante em feridas eletroproduzidas em pele de dorso de rato. Tem ação anti-inflamatória inicial a partir do 2º dia inferior ao

Acetonido de Triancinolona a 1 % (controle) e no 7º e 14º dia apresentou atividade superior ao controle. Já para ação cicatrizante o controle foi Dexpantenil 5%, o extrato apresentou-se semelhante ao controle no 2º dia e superior no 7º e 14º dia (MARTORELLI, 2011).

2.2.5 Estudos toxicológicos

Avaliando plantas tóxicas e dermatites, Lampe e Fagerstrom (1968), descreveram que membros da família *Anacardinaceae* são os mais frequentes causadores de dermatites de contato. Algumas pessoas podem desenvolver irritações na pele, prurido, urticária, febre e transtornos visuais, quando em contato com a planta (CRUZ, 1982), uma vez que em todas as partes da aroeira da praia foi identificada a presença de pequena quantidade de alquifenois, substâncias causadoras de dermatite alérgica em pessoas sensíveis (REICHERT et al., 1945; GRUENWALD, BRENDLER, JAENICKKE, 2000).

Ruiz e colaboradores (1996) realizaram triagem da atividade genotóxica do extrato hidroalcoólico de *S. terebinthifolius* através do ensaio *in vitro* da incorporação em placas com *Aspergillus nidulans* e este não apresentou efeito tóxico ou genotóxico.

Lima e colaboradores (2009) avaliaram a toxicidade aguda, em doses de 0,625-5,0 g/kg (n= 5/grupo/sexo) e subaguda, nas doses 0,25, 0,625 e 1,5625 g/kg/dia (n= 13/grupo/sexo), por 45 dias, do extrato seco da casca de *S. terebinthifolius*, por via oral, em ratos Wistar de ambos os sexos e nenhum sinal tóxico ou morte foi evidenciado. O tratamento subagudo não alterou o ganho de peso corporal ou consumo de alimento e de água. As análises hematológicas e bioquímicas não apresentaram diferenças significativas em qualquer dos parâmetros analisados, sugerindo que sua utilização como medicinal seja segura.

Os ensaios clínicos toxicológicos, fase I, do produto fitoterápico composto pelas plantas medicinais *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill. sugeriu que a ingestão oral de até 45 ml ao dia e durante dois meses, foi bem tolerada, não apresentando alterações clínicas, laboratoriais e nem reações adversas significantes. Estes resultados em complementação àqueles obtidos com os ensaios toxicológicos pré-clínicos, sugerem a baixa toxicidade do produto e indicam que esta formulação fitoterápica pode ser utilizada pela população (PAULO et al., 2009).

2.3 *Piptadenia colubrina* Benth

Piptadenia colubrina Vell. Benth (Figura 2), também chamada de *Anadenanthera colubrina* Vell. Brenan é uma planta pertencente à família *Fabaceae*, como se pode verificar no Quadro 2 de classificação científica. Outras sinonímias encontradas são *Acacia colubrina* Mart., *Mimosa colubrina* Vell (LORENZI; MATOS, 2008).

Quadro 2: Classificação científica de *Piptadenia colubrina* Benth.

Reino	<i>Plantae</i>
Divisão	<i>Magnoliophita</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordem	<i>Fabales</i>
Família	<i>Mimosoideae</i>
Gênero	<i>Anadenanthera</i>

Corrêa (1984) cita que a planta é originalmente brasileira, sendo nativa desde o estado do Maranhão até os estados do Paraná, Minas Gerais e Goiás. Nestas

regiões é conhecida popularmente como “angico-branco”, “angico”, “cambuí-angico”, “goma-de-angico”, “angico-de-casca”, “cambuí” (LORENZI; MATOS, 2008).



Figura 2 – Fotografia da árvore, folhas e flor de *Piptadenia colubrina* (LORENZI, 1998 e http://www.botanicalgarden.ubc.ca/potd/2009/03/anadenanthera_colubrina.php)

A árvore possui uma ampla importância econômica, uma vez que fornece madeira de boa qualidade de ampla utilização, sendo empregada na construção civil, além da produção de lenha e carvão. A casca é amplamente utilizada na indústria de curtume. Fornece uma goma utilizada pela indústria como ingrediente para a fabricação da goma de mascar (GARCIA et al., 2004; LORENZI; MATOS, 2008).

2.3.1 Aspecto botânico

Piptadenia colubrina é uma árvore leguminosa caducifólia, de copa aberta e irregular, medindo entre 5 e 15 metros de altura, no Nordeste costuma medir entre 4 e 7 metros. O tronco quase cilíndrico de 30 a 50 centímetros de diâmetro é revestido por uma casca um pouco rugosa e provida de espinhos. As folhas são compostas,

bipinadas, com 15 a 20 jugas, folíolos opostos de 4 a 6 milímetros de comprimento. Flores de cor branca, dispostas em inflorescência do tipo panícula de espigas globosas. Os frutos são legumes (vagens) achatados, rígidos, glabros, brilhantes, de coloração amarronzada, medindo entre 10 e 20 centímetros de comprimento, contendo de 5 a 10 sementes lisas e escuras. Multiplica-se apenas por sementes (AGRA, 1996; LORENZI; MATOS, 2008).

2.3.2 Uso Popular

Na medicina popular, a utilização da árvore é restrita, sendo utilizada somente a casca e uma espécie de goma extraída do caule. Sua casca é considerada amarga, adstringente, depurativa, hemostática, sendo utilizada contra leucorréia e gonorreia (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000). Também é indicada no tratamento da diarreia, disenteria, gases e hemorragias. O decocto e o xarope da casca do caule são empregados contra tosse, bronquite e coqueluche (AGRA, 1996; LORENZI; MATOS, 2008). O ferimento da sua casca libera uma goma-resina usada na fabricação de goma-de-mascar e no tratamento de problemas respiratórios. Maia (2004) relata que é uma planta utilizada na medicina popular no tratamento de problemas respiratórios e inflamatórios.

2.3.3 Composição química

Segundo Corrêa (1978), essa espécie apresenta em suas cascas aproximadamente 32 % de tanino, sendo este constituinte fitoquímico considerado o principal responsável pelas atividades terapêuticas atribuídas à espécie. Nozella (2001) ao estudar plantas do Nordeste com potencial forrageiro encontrou 9 % de tanino condensado na casca do angico.

Monteiro e colaboradores (2005) avaliaram a concentração de taninos presentes na entrecasca e nas folhas da *Piptadenia colubrina*, em diferentes épocas do ano. Foi verificado que a entrecasca e as folhas apresentaram maiores teores de taninos (7,2 e 15,3 %, respectivamente), na estação mais seca do ano (LIMA, 2006a).

Estudos fitoquímicos realizados com a casca de *Piptadenia colubrina*, constataram a presença de um alcaloide, o óxido de N,N- dimetiltriptamina (FISH et al., 1956); esteroides (palmitato de β -sitosterol, β -sitosterol glicosídeo); flavonóides; triterpenóides, luperona e lupeol; e os compostos fenólicos, dalbergina, 3,4,5-dimethoxidalbegiona (MIYAUCHI et al., 1976). Nas sementes foram encontradas 2,1 % de bufotenina (PACHTER; ZACHARIAS; RIBEIRO, 1959). Gutierrez-Lugo e colaboradores (2004) obtiveram das partes aéreas de *Piptadenia colubrina*, um novo flavonóide, a anadantoflavona, juntamente com outros onze compostos já conhecidos: alnusenol, lupenona, lupeol, ácido butilínico, α -amirina, β -amirina, β -sitosterol, estigmasterol, apigenina, ácido 4-hidroxibenzóico e ácido cinâmico.

Na goma, obtida do tronco foi identificada a presença de arabinose e galactana, nomeada na pesquisa como ARAGAL, também identificaram a presença de mono e oligossacarídeos como: ramosa, arabinose, manose, galactose e ácido glicorônico (DELGOBO et al., 1999).

2.4.4 Atividade farmacológica

Ensaio pré-clínicos

1) *In vitro*

A anadantoflavona isolada das partes aéreas da *Piptadenia colubrina* demonstrou uma ação inibitória sobre as atividades das lipoxigenases 12 e 15, presentes nas plaquetas e nos reticulócitos humanos, apresentando valores da Concentração inibitória média (IC50) de $13 \pm 3 \mu\text{M}$ e $17 \pm 3 \mu\text{M}$, respectivamente. A

apigenina inibiu seletivamente a atividade da 15-lipoxigenase, com IC50 de $4,0 \pm 1 \mu\text{M}$. A lupenona, o lupeol e a α -amirina também demonstraram relativa atividade inibitória na ação das lipoxigenases (GUTIERREZ-LUGO et al., 2004).

Macrófagos tratados *in vitro* por 18 h com ARAGAL, componente químico descrito anteriormente, foram capazes de destruir 180 células de Sarcoma (S-180), ascites ou tumores sólidos, a inibição tumoral foi de 63 e 38 %, respectivamente (MORETÃO et al., 2004).

II) *In vivo*

O extrato das cascas de *P. colubrina* foi empregado em testes farmacológicos a nível de sistema nervoso central com camundongos e ratos machos albinos. Observou-se que doses variáveis do extrato provocaram sinais de depressão do sistema nervoso central e insuficiência respiratória. Observou-se também que o extrato acarretou um efeito sinérgico quando associado a doses sub-hipnóticas de pentobarbital sódico e a doses sedativas de clorpromazina e diazepam. Os resultados não demonstraram ação anticonvulsivante em relação ao pentetrazol. Observou-se, ainda, que o extrato não possui ação analgésica e nem altera a ação analgésica do cloridrato de morfina. Os resultados obtidos sugerem propriedades psicotrópicas do tipo psicoléptico (depressoras do sistema nervoso central) para o material estudado (SARSUR-NETO et al., 1989).

O ARAGAL, já descrito anteriormente, isolado da goma teve suas propriedades imunológicas estudadas, a seiva de *Anadenanthera colubrina* demonstrou atividade antitumoral significativa, assim como um aumento da habilidade fagocítica, devido a ativação de, no qual os camundongos foram tratados com 50, 100 ou 200 mg/kg de ARAGAL, o que resultou no aumento do número de células fagocitárias presentes no exsudado de peritônio em 18, 44 e 88 %, respectivamente. O ARAGAL também

promoveu um crescimento na produção do Fator de Necrose Tumoral- α (α -TNF) por parte dos macrófagos. (MORETÃO et al., 2004).

Ensaio clínico e estudos toxicológicos (toxicidade aguda e crônica) com *P. Colubrina* não foram encontrados na literatura.

Há relatos de dados toxicológicos descritos em estudos de utilização popular desta espécie, como descrito abaixo.

A utilização do angico por tribos indígenas brasileiras nas suas cerimônias místico-religiosas despertou a curiosidade de pesquisadores quanto a possíveis efeitos narcóticos relacionados a esta espécie vegetal. Os índios utilizavam as sementes torradas e pulverizadas, sendo consumidas na forma de rapé. Foi constatado que as sementes do angico eram, assim como as demais espécies desta família, ricas no alcalóide bufotenina, apresentando um rendimento de 2,1 % na extração realizada com etanol (PACHTER et al., 1959).

Monteiro (2006) estudou o uso desta planta pela população do semi-árido nordestino brasileiro e uma das informações coletadas foi que as folhas eram tóxicas para os bovinos e Tokarnia e colaboradores (1999) indicaram que as folhas de esta árvore contém grande quantidade de glicosídeos cianogênicos capazes de causar intoxicação por cianeto.

2.4 TANINOS

Os taninos são uma classe de compostos químicos presentes em ambas espécies vegetais de interesse, das quais pertencem as substâncias selecionadas como marcadores.

Taninos são substâncias fenólicas altamente distribuídas no reino vegetal, solúveis em água e possuem a capacidade de precipitar proteínas e alcaloides, historicamente, a importância das plantas ricas em taninos está ligada ao poder de transformar a pele animal em couro (HASLAM, 1996; SANTOS; MELLO, 2004). O processo de curtimento ou tanagem, ou seja, a transformação do couro cru em couro durável é decorrente da formação de ligações covalentes entre os taninos e as fibras de colágeno da pele animal. E foi este método que deu nome ao grupo (BRUNETON, 1993; NIEMETZ; GROSS, 2005).

Hillis (1962) se referiu aos taninos como sendo compostos fenólicos naturais apresentando pesos moleculares compreendidos entre 500 e 3000 Dalton. Os taninos vegetais ou naturais são por definição substâncias que apresentam a propriedade de se associar e de se combinar com proteínas e com certos políeis. Este comportamento é à base das propriedades tanantes que eles exercem sobre o colágeno da pele dos animais ao curso de sua transformação em couro e para suas propriedades como o controle de insetos, fungos, bactérias, adstringência, inibição enzimática, tanto quanto para suas atividades farmacológicas (MELLO, SANTOS, 2004). A precipitação das proteínas salivares e glicoproteínas bucais permite explicar a fisiologia da ação adstringente dos taninos nos tecidos vegetais antes de sua maturidade (TRUGILHO et al., 1997). Estes compostos possuem importantes características gustativas responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais a exemplo de vinhos, sucos de frutas, chás e outras bebidas (SIMÕES et al., 2004). A atividade herbívora deve-se ao fato das precipitações proteicas dificultarem a digestão dos animais (METCHE, 1980)

A formação do complexo tanino-proteína (Figura 3) podem ser reversíveis ou irreversíveis. Os reversíveis são estabelecidos via pontes de hidrogênio e interações

hidrofóbicas, enquanto os irreversíveis ocorrem em condições oxidativas via ligações covalentes (MELLO; SANTOS, 2004).

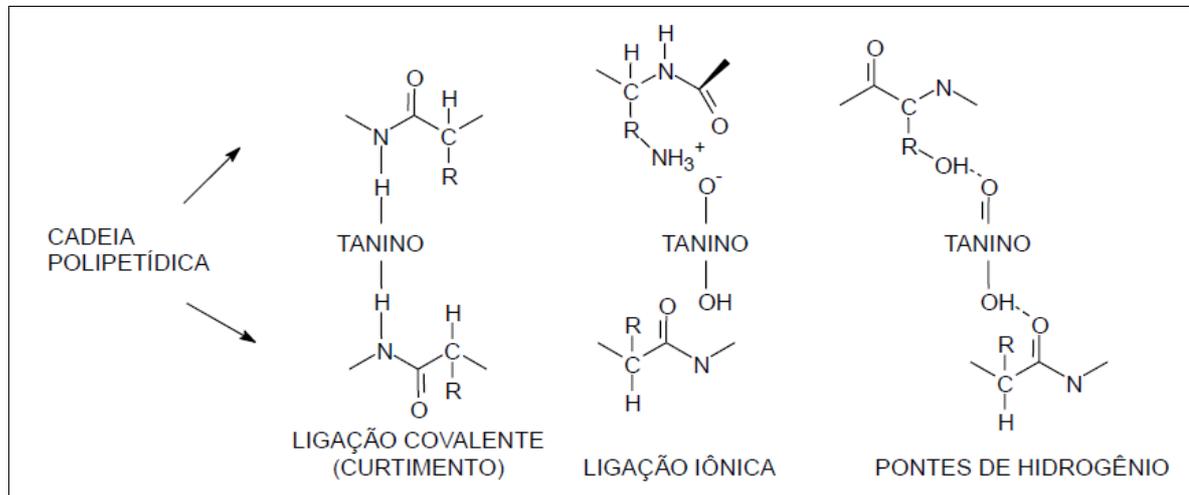


Figura 3 - Mecanismos para a formação do complexo tanino-proteína (WAGNER, 1993).

Os taninos podem ainda atingir entre 2 e 40 % da massa seca da casca de muitas espécies (HERGERT, 1962), tais valores podem tornar este produto economicamente viável para a exploração industrial considerando-se a gama de utilizações possíveis (TRUGILHO et al., 1997).

Segundo Pizzi (1993), o termo "tanino" tem sido usado frequentemente para definir duas classes diferentes de compostos químicos de natureza fenólica: os taninos hidrolisáveis, encontrados em dicotiledôneas herbáceas e lenhosas (Figura 4) e os taninos condensados, que ocorrem mais em gimnospermas e angiospermas (Figura 5).

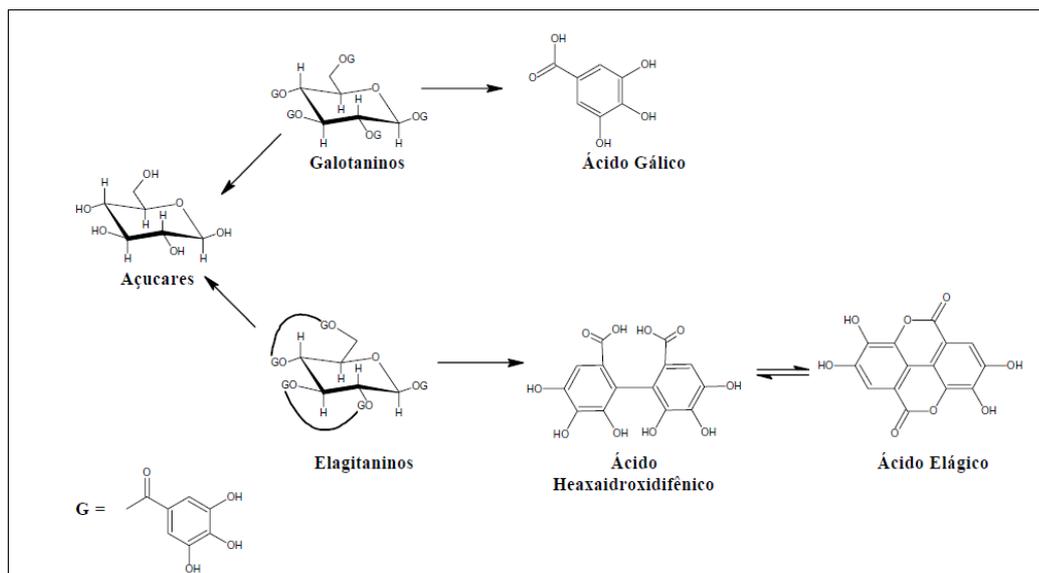


Figura 4 – Estrutura dos taninos hidrolisáveis (QUEIROZ, MORAIS, NASCIMENTO; 2002)

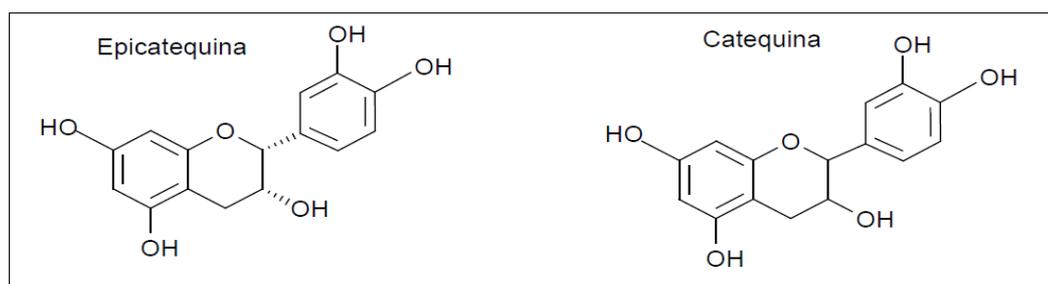


Figura 5 – Estrutura dos taninos condensados (Fonte: a autora)

Para Metche (1980), os taninos hidrolisáveis com ácidos, bases ou enzimas são considerados como poliésteres da glicose e caracterizam-se por possuírem um poliálcool central. Podem ser classificados em duas categorias; (a) os galotaninos, que por hidrólise ácida liberam o ácido gálico e seus derivados; (b) os elagitaninos, que por hidrólise liberam o ácido elágico, ácido valônico, sendo o ácido elágico o mais importante (TRUGILHO et al., 1997; SOARES, 2002; SANTOS; MELO, 2004).

Os taninos condensados são unidades de flavonóides formados pela policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ols (catequinas) e flavan-3-4 dióis (proantocianidinas) (Figura 6), seus precursores (PIZZI, 1993; SANTOS; MELO, 2004). Os taninos condensados mais amplamente estudados são baseados

no monômero flavan-3-ol e são eles a (-)-epicatequina e (+)-catequina (HAGERMAN, 2002).

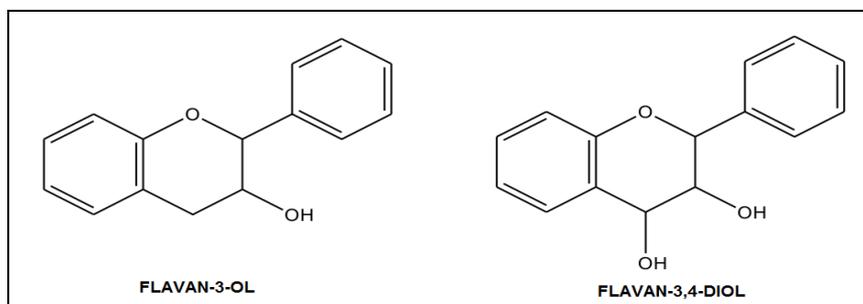


Figura 6 - Monômeros formadores dos taninos condensados.

Plantas ricas em taninos são empregadas em medicina tradicional no tratamento de diversas doenças, tais como diarreias, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996; DE BRUYNE et al., 1999; DUSFRESNE; FARNWORTH, 2001; SIMÕES et al., 2004).

Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros tem identificado diversas atividades biológicas, pode-se citar: ação bactericida e fungicida (SCALBERT, 1991; CHUNG et al., 1998), antiviral (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 1993; DE BRUYNE et al., 1999); moluscicida (MARSTON; HOSTETTMANN, 1985); inibição de enzimas como glicosiltransferase de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (HATTORI et al., 1990; OOSHIMA et al., 1993), inibição da peroxidação de lipídeos e sequestrador de radicais livres (HAGERMAN et al., 1998, MOURE et al., 2001) e ação antitumoral (WANG; HELLIWELL; YOU, 2000; DUFRESNE; FARNWORTH, 2001).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais: 1) complexação com íons metálicos,

como cobre (KRAAL et al., 2006) e o ferro (ANDRADE et al., 2006), 2) atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e 3) habilidade de complexar com outras moléculas incluindo macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos (HAGERMAN, 2002; SIMÕES et al., 2004).

Alta solubilidade em água, apresentada pelos taninos, reduz a eficiência da complexação entre polifenóis e proteínas, enquanto que o aumento do tamanho molecular dos polifenóis favorece a associação com proteínas (HASLAM; CAI, 1994).

Após isolamento e purificação, os taninos hidrolisáveis apresentam uma estabilidade razoável e podem ser mantidos a temperatura ambiente sem decomposição. Já os taninos condensados precisam ser mantidos a temperatura baixa e sem exposição de luz (MELO; SANTOS, 2004; SIMÕES et al., 2004).

O ácido gálico (tanino hidrolisável) e a catequina (tanino condensado), objetivos deste estudo são apontados como marcadores no controle de qualidade de extratos e medicamentos fitoterápicos através de diferentes técnicas de avaliação e desenvolvimento tecnológico (PESSUTO et al., 2009).

2.4.1 Ácido gálico

Ácido gálico (Figura 7) é um ácido orgânico aromático de nome oficial 3,4,5-triidroxibenzóico, de fórmula $H_6C_7O_5$ descoberto em 1786 por C.W. Scheele. É o constituinte básico dos taninos hidrolisáveis, originado pela rota biosintética via ácido chiquímico, sendo derivado do ácido benzóico, encontrado amplamente em plantas lignificadas, frequentemente na forma do seu dímero, o ácido elágico. (SIMÕES et al., 2004; LONGHINI, 2006).

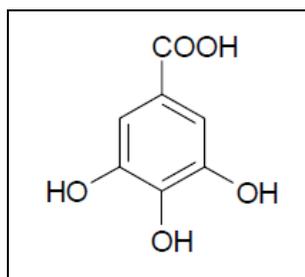


Figura 7 – Estrutura química do ácido gálico

Considerado um antioxidante, agindo como inibidor de radicais livres, sendo que a concentração tipicamente usada como adjuvante farmacêutico é de 0,1%. Também possui características adstringentes. É de ocorrência comum nos chás, vinhos vermelhos, frutas e em várias plantas medicinais (WELLS, 1988; HOEPFNER; RENG; SCHIMIDT, 2002; SOONG; BARLOW, 2006).

Foi demonstrado ser um polifenol de final simples; estes compostos podem se ligar a somente uma molécula de hemaglutinina, não podendo formar ligações cruzadas e assim formar precipitado coloidal característico das ligações proteína/polifenol em formas líquidas. As constantes de dissociação (pKa) do grupamento carboxílico do ácido gálico variam de 4,2 a 4,5 e das hidroxilas de 8,69 a 11,42 (HILL et al., 1992, LONGHINI, 2006).

Apresenta-se na forma monohidratada, com massa molecular de 188,12 g/mol. Em sua forma estável funde, com decomposição, em faixa de 258 a 265°C. Pode assumir uma forma instável com faixa de fusão de 225 a 230°C. Diferencia-se dos taninos uma vez que, em solução saturada, não produz uma coloração escura nem precipita em presença de sais de ferro ou de gelatina (BUDAVARI, 1996; HOEPFNER et al., 2002, LONGHINI, 2006).

A sua estrutura química exhibe intensa absorção na região ultravioleta, o que permite sua avaliação por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia

de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em papel (CP) (DE SOUZA, 2004; MELLO e SANTOS, 2004).

2.4.2 Catequina

As catequinas (Figura 8) pertencem à família dos 3-flavanóis e são constituídas por um anel floro-glucinol (A), um anel pirânico (B) e um anel catecol (C). Possui centros quirais, dos quais resultam 4 isômeros: (+), (-)-catequina e (+), (-)-epicatequina. Na natureza os isômeros mais abundantes são a (+)-catequina e a (-)-epicatequina (PORTO, 2002). São amplamente distribuídas em frutas e bebidas, incluindo chá verde, vinho tinto, maçãs e chocolate (GRAHAM, 1992; GUYOT et al., 1998; RITCHEY; WHATERHOUSE, 1999).

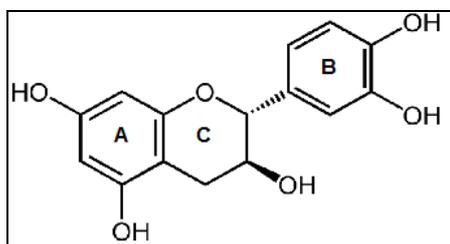


Figura 8 – Estrutura química da catequina

A constante de dissociação (pK_a) varia de 8,6 a 13,2 (GENNARO, 1999). As catequinas são compostos incolores, hidrossolúveis, que contribuem com o amargor e a adstringência das soluções das plantas que a possuem (BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS; 1997).

2.5 MEDICAMENTO FITOTERÁPICO: SANATIVO®

O Elixir Sanativo® é um fitoterápico composto (Quadro 3), produzido pelo Laboratório Pernambucano LTDA., desde 1888, registrado na ANVISA, na forma embalagem de 120 ml (REG. MS nº 1.0421.0007.001-1), embalagem de 30 ml - palheta (REG. MS nº 1.0421.0007.002-8) e embalagem de 30 ml - spray (REG. MS nº 1.0421.0007.003-6), na forma de extrato fluido, constituído da associação do extrato hidroalcoólico de quatro espécies vegetais (LIMA et al, 2006b, PESSOA, 2008).

Quadro 3: Composição química para cada ml do medicamento fitoterápico Sanativo®

<u>Espécie vegetal</u>	<u>Parte usada</u>	<u>Concentração marcadores</u>	<u>Volume</u>
<i>Piptadenia colubrina</i>	Casca	Eq. 40 mg de taninos totais em ácido tânico	400 µL
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Casca	Eq. 24 mg de taninos totais em ácido tânico	400 µL
<i>Physalis angulata</i>	Partes aéreas	Eq. 34 µg de fitosteróis totais em fisalinas	85 µL
<i>Cereus peruvianus</i>	Partes aéreas	Eq. 1,45 mg de polissacarídeos totais	85 µL
Etanol 96°GL			1ml QSP

Este produto tradicional tem seu efeito terapêutico relacionado às propriedades farmacológicas apresentadas pelas espécies vegetais que compõem sua fórmula, tendo como propriedades principais ação cicatrizante e hemostática.

É indicado para uso tópico e a bula informa que pode ser utilizado na forma pura ou diluída com água ou com soro fisiológico para o tratamento de feridas, cicatrização de lesões, picada de insetos, higiene íntima, frieira, pequenos cortes e

afecções bucais, não devendo ser ingerido. Com posologia máxima de 3 a 4 dias. Deve ser mantido em temperatura ambiente, protegido de luz e umidade.

Segundo a bula: *Piptadenia colubrina* apresenta ação hemostática, notadamente em cortes e contusões; *Schinus terebinthifolius* é indicado para dores musculares e queimaduras, pois possui propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e cicatrizante; *Physalis angulata* atua como balsâmico, aliviando também as dores e contribuindo na diminuição dos edemas, escoriações e pancadas; e *Cereus peruvianus* apresenta propriedades deterativas, necessárias a assepsia das regiões lesadas.

Lima e colaboradores (2006b) avaliaram atividade cicatrizante do Sanativo[®] diluído para 4 % e os possíveis efeitos tóxicos da sua administração oral subcrônica em ratos, nas doses de 0,067; 0,335; 1,675 g/kg. E os resultados mostraram que reduziu significativamente a área das feridas abertas no dorso dos ratos e toxicidade subcrônica na dose de 1,675 g/kg reduziu significativamente o ganho de massa corporal das ratas apenas na primeira semana de administração. A análise histológica dos tecidos não mostrou alteração, assim concluiu que o Sanativo[®] possui significativa propriedade cicatrizante no modelo avaliado e baixa toxicidade no tratamento oral em ratos Wistar.

Pessoa (2008) avaliou a atividade do Sanativo[®] sobre o processo de alveolite dental induzida em ratos (*Rattus norvegicus albinus*). Os animais após anestesiados foram submetidos a extração do incisivo superior direito e subsequente alveolite dental induzida por adrenalina (1:1000), comprovada alveolite foi realizada a divisão em dois grupos: I (controle) que receberam água e II tratados com Sanativo na dose de 4,1 mg/mL administrado na água de beber. Foi comprovado que este fitoterápico contribui para que o processo de cicatrização fosse mais próximo possível dos padrões de normalidade, ou seja, mais semelhantes ao processo de cicatrização do alvéolo quando sem a alveolite dental.

Arruda (2008) realizou a avaliação farmacológica das atividades anti-inflamatória, analgésica e antiulcerogênica, comprovando tais efeitos, do fitoterápico Sanativo[®], investigados em modelos de inflamação aguda (edema de pata induzido por carragenina, dextrana e histamina), analgesia (contorções abdominais por ácido acético e placa quente) e de úlcera induzida por etanol.

2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia surgiu por volta de 1906 com os experimentos do russo Michael S. Tswett, um botânico polonês, que utilizou colunas de adsorção nas suas pesquisas sobre pigmentos de plantas. O nome derivou das palavras *chrom* (cor) e *grafe* (escrever), embora tenha explicado que o processo não depende da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes (AQUINO NETO; NUNES, 2003).

Existem vários tipos de técnicas cromatográficas e estas são baseadas na repartição dos analitos entre duas fases, uma estacionária e uma móvel, o que permite efetuar separações de vários compostos similares, identificação e quantificação de espécies químicas (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

A CLAE é uma importante técnica de separação, uma vez que consegue separar misturas que contem grande quantidade de compostos similares, assim realizar análises quantitativas, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e dectabilidade, se tornando propícia a análise de fitoterápicos (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Independente do grau de automação, essa técnica de separação promove um particionamento dos constituintes da amostra, introduzida pelo sistema de injeção, em duas fases, uma estacionária e outra móvel; esta, sob pressão oriunda de uma

bomba, percorre a primeira, resultando na separação dos compostos de acordo com a afinidade destes com ambas as fases. A seguir, a fase móvel, ao atravessar a coluna, contendo as substâncias, atinge o detector, que faz uma correlação entre o sinal gerado na célula de detecção e a concentração do analito, que é enviado ao sistema de registros e análises de dados gerando um cromatograma (JARDIM et al., 2006). A figura 9 demonstra um cromatógrafo líquido.

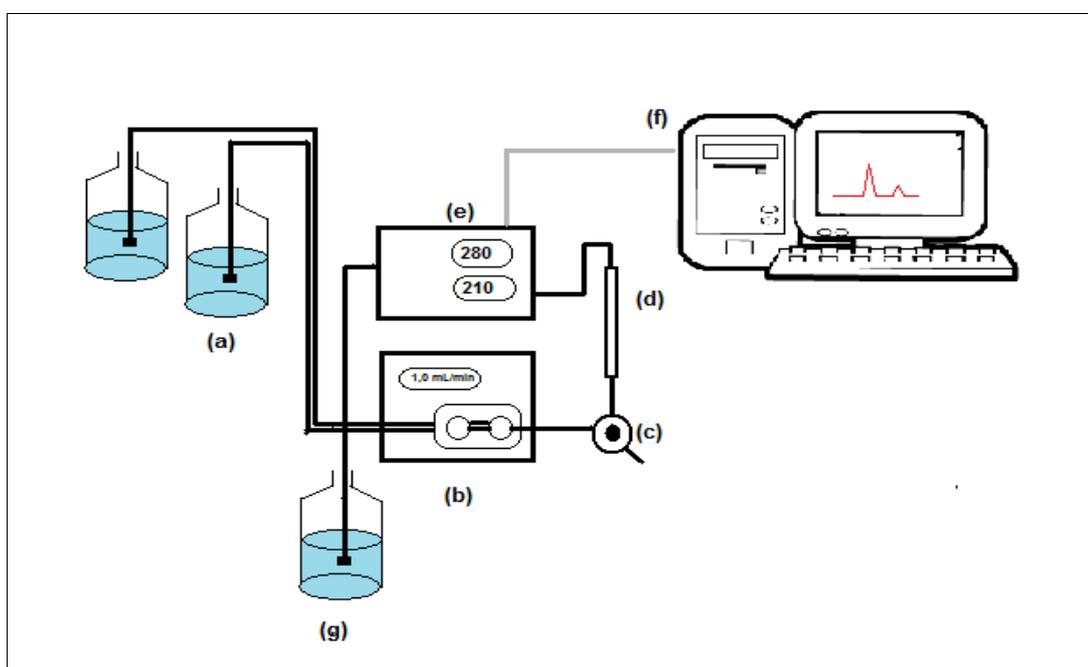


Figura 9 – Representação de um equipamento de CLAE (Fonte: a autora)

(a)Reservatório da fase móvel, (b) bomba de alta pressão, (c) injetor, (d) coluna cromatográfica, (e) detector, (f) sistema de aquisição e processamento de dados, (g) descarte da fase móvel.

O cromatógrafo líquido é complexo formado por seis componentes essenciais que estão descritos no quadro 4 (AQUINO NETO; NUNES, 2003; GIL, 2005).

Quadro 4- Principais componentes da CLAE e algumas de suas características

COMPONENTES	CARACTERÍSTICAS
(A) Reservatório de solventes:	Onde se encontra o solvente da fase móvel
(B) Bomba de alta pressão	Sistema mecânico que impulsiona a fase móvel para a coluna cromatográfica, composto por controladores de pressão e vazão.
(C) Injetor:	Serve como sistema de entrada da amostra para a coluna que é carregada pela fase móvel
(D) Coluna cromatográfica:	Feita de aço inoxidável, de comprimento (entre 10 e 30 cm) e calibre de precisão. É o local onde se encontram empacotadas as partículas de fase estacionária e onde ocorre o processo de separação.
(E) Detector:	Dispositivo eletroeletrônico que responde à variação da composição do efluente da coluna gerando sinais elétricos. Os detectores mais comuns empregados são: UV-VIS, fluorescência, eletroquímico, massas.
(F) Processador de dados	Sistema que analisa e processa os dados provenientes do detector e os transforma em sinais gráficos chamados de cromatogramas.

2.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO E CATEQUINA

A Cromatografia em fase reversa é o modo mais popular de cromatografia líquida de compostos fenólicos. As colunas variam de 100 a 300 mm de comprimento e geralmente com 4,6 milímetros de diâmetro interno. As colunas mais frequentemente utilizadas são as de octadecilsilano (C18, ODS ou pelo parâmetro da Farmacopeia Americana, L1). Os sistemas de eluição são normalmente binário tendo como a Fase A uma solução aquosa polar ácida, a acidificação, normalmente é realizada com ácido acético, ou ácido perclórico, ou ácido fosfórico, ou ácido fórmico e uma Fase B formada por um solvente orgânico menos polar, os mais utilizados são o metanol ou a acetonitrila, podendo ser acidificada ou não. A maior alteração observada na fase móvel é obtida com a modificação do tipo de ácido usado, sendo capaz de minimizar fator de cauda (MERKEN; BEECHER, 2000).

A faixa de pH mais frequentemente utilizados para FR-CLAE de compostos

fenólicos é baixa, entre 2 e 4. O pH e força iônica da fase móvel são conhecidos por influenciar a retenção de compostos fenólicos na coluna, dependendo da ocorrência de protonação, dissociação ou dissociação parcial (LEE, 2000). Os tempos totais de análise são geralmente de no máximo uma hora, com equilíbrio entre as execuções (MERKEN; BEECHER, 2000).

O pKa das catequinas é de 8,6 a 13,2 (GENNARO, 1999). O pH da fase móvel deve ser abaixo da constante de ionização, pois o aumento da forma ionizada do analito aumenta sua dissolução na fase aquosa e reduz seu tempo de retenção, já que a forma iônica passa através da coluna sem retenção (IVANOVIC, et al., 1995).

Fenóis possuem regiões cromóforas que absorvem na região do ultravioleta (UV). A maioria dos compostos fenólicos apresentam valores de absorção entre 246-262 nm com um ombro entre 290-315 nm (LEE, 2000). Essas duas bandas de absorção são características dos flavonóides e conseqüentemente dos taninos. Os detectores mais utilizados são UV/VIS (FRANCISCO; RESURRECCION, 2009).

O método de perfil ideal deve ser tão simples quanto possível, capaz de detectar todos os compostos presentes, fornecer o máximo de informações possíveis para cada pico no cromatograma com a finalidade de identificação, quantificação e deve ser executado, preferencialmente, em uma única análise cromatográfica (HARNLY; BHAGWAT; LIN, 2007).

2.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de métodos analíticos é um processo usado para confirmar que o procedimento analítico empregado para uma análise específica é adequado para o uso pretendido. Os resultados da validação do método podem ser usados para julgar a qualidade, confiabilidade e consistência dos resultados analíticos, a validação é

parte integrante de toda boa prática analítica (BURGESS, O'DONOHUE; GRILL, 2000).

Os procedimentos para validação estão descritos em resoluções e guias. As resoluções são documentos com poder de lei; os guias são documentos que sugerem uma linha de trabalho a ser seguida e são, portanto abertos para interpretação (RIBANI et al., 2004). No Brasil, a ANVISA, através da Resolução – RE Nº 899, de 29 de maio de 2003, regulamenta o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Para que um medicamento seja registrado junto a ANVISA, o método de análise deve ser validado pelo fabricante, obedecendo aos parâmetros propostos pelo guia, que apesar de ser chamado de guia é uma resolução que tem poder de lei (BRASIL, 2003).

Além da ANVISA, outros institutos, estabelecem parâmetros de validação, podendo ser também consultados em um processo de validação, entre estes estão, a Food and Drug Administration (FDA), O Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO), a International Conference on Harmonisation (ICH) e a Farmacopeia dos Estados unidos (USP).

De acordo com a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão adequadas à análise (BRASIL, 2003).

2.8.1 Especificidade e seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

Um método é considerado específico se ele produz apenas uma resposta para um simples analito. Como os métodos cromatográficos não produzem respostas apenas para um analito de interesse, mas também para outras substâncias de interesse, o termo seletividade é sempre mais apropriado neste contexto que especificidade. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (NASCIMENTO, 2004; RIBANI et al., 2004).

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (ICH, 2005; SWARTZ; KRULL, 1998; SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004).

A segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro. Estas duas maneiras são as mais utilizadas (HUBER, 2001; JENKE, 1998; VESSMAN, et al., 2001; RIBANI et al., 2004).

O método de adição padrão também pode ser aplicado para os estudos de seletividade, porém este método é utilizado quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse. Neste caso é feita uma curva analítica com adição da substância de interesse na amostra e comparada com uma curva analítica sem a

presença da matriz. Comparam-se então as duas curvas analíticas e caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, portanto o método é seletivo.

Outra forma de verificar a seletividade é a análise das amostras após terem sido submetidas a diversas condições de estresse, como aquecimento entre 50 e 60°C, luminosidade intensa, adição ácidos (HCl 0,1M) ou bases (NaOH 0,1M) e oxidantes (H₂O₂ 3%) também podem ser utilizadas de maneira a demonstrar que o método é capaz de seletivamente discriminar entre o analito de interesse e substâncias de degradação (SHABIR, 2003).

2.8.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de no mínimo cinco concentrações diferentes (BRASIL, 2003).

Os dados podem ser tratados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios de três curvas de calibração autênticas. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser igual a 0,99 para métodos analíticos (BRASIL, 2003).

As diretrizes da ICH3 e da ANVISA especificam um mínimo de cinco níveis de concentração, juntamente com certos mínimos de variação especificados (BRASIL, 2003, ICH, 2005). A IUPAC recomenda seis ou mais níveis de concentração (RIBANI et al, 2004). A quantificação do composto de interesse em validação pode ser obtida através dos seguintes métodos: padronização externa; padronização interna; superposição de matriz; adição padrão.

A homocedasticidade, ou variância constante dos resíduos, deve ser analisada através do gráfico de resíduos de maneira a garantir que os erros obtidos nas análises são aleatórios e não provenientes de tendências do método (CHANDRAN; SINGH, 2007).

2.8.3 Intervalo

É a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (BRASIL, 2003).

2.8.4 Precisão

De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2003), precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta se divide em três níveis:

Repetibilidade (precisão intra-corrída): Concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analito e mesma instrumentação.

A repetibilidade do método é verificada por no mínimo nove determinações, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas cada ou mínimo de seis determinações a 100% da concentração teste.

Precisão intermediária (precisão inter-corrídas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Recomenda-se o mínimo de dois dias com analistas diferentes.

Reprodutibilidade: concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a equação 1.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \cdot 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada. Não se admite valores superiores a 5% para métodos analíticos e 15% para métodos bioanalíticos.

2.8.5 Limite de detecção (LOD)

É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (BRASIL, 2003).

Em CLAE, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação três vezes o ruído da linha de base (BRASIL, 2003). Pode ser determinado pela equação 2:

$$LD = \frac{DPa \cdot 3}{IC} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de, no mínimo, três curvas de calibração construídas com as concentrações do fármaco próximas ao

suposto limite de quantificação e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

2.8.6 Limite de quantificação (LOQ)

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

O Limite de Quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003). Pode ser expresso pela equação 3:

$$LQ = \frac{DPa \cdot 10}{IC} \text{ (Equação 3)}$$

Em que DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de, no mínimo, três curvas de calibração construídas com as concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação e IC é a inclinação da curva de calibração, Também pode ser determinado por meio do ruído, considerando a concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1 (BRASIL, 2003).

2.8.7 Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescido dos intervalos de confiança (BRASIL, 2003).

É determinado através de três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas cada, perfazendo um total de nove determinações. E exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Equação 4). A exatidão deve estar entre 80 – 120% do valor nominal da concentração.

$$Exatidão = \frac{Conc.Média.Experimenta}{Conc.Teórica} \cdot 100 \text{ (Equação 4)}$$

2.8.8 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

2.9 CONFORMIDADE DO SISTEMA

Segundo Ribani e colaboradores (2004), antes de iniciar a validação ou mesmo a análise de amostras, deve-se avaliar se o sistema utilizado é capaz de fornecer dados de qualidade aceitável. Esta avaliação é chamada conformidade do sistema (*system suitability*), que pode ser definida como um conjunto de testes para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de precisão e exatidão aceitáveis. Existem duas abordagens para comprovação da conformidade do sistema.

A primeira abordagem contempla critérios selecionados do desempenho do método determinados durante a validação. Segundo a Farmacopeia Brasileira

(2010) os critérios estabelecidos devem ser atingidos durante as análises de rotina de maneira a ser garantida a confiabilidade dos resultados gerados, conforme quadro 5.

Quadro 5 – Parâmetros de conformidade do sistema para CLAE. Fonte:Brasil,2010b.

Parâmetro	Fórmula	Critério
Fator de retenção (k)	$k = \frac{t - t_0}{t_0}$	O pico deve estar bem separado de outros picos e do pico correspondente ao tempo de retenção de um composto não retido, $k > 2$
Resolução (Rs)	$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} \text{ ou } R = 1,18 \frac{(t_2 - t_1)}{(W_{1,h/2} + W_{2,h/2})}$	$R_s > 2$ entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo (impureza, produto de degradação)
Fator de cauda (T)	$T = \frac{W_{0,05}}{2f}$	$TF \leq 2$
Número de pratos teóricos (N)	$N = 16 \times \left(\frac{t}{W}\right)^2 \text{ ou } N = 5,54 \times \left(\frac{t}{W_{h/2}}\right)^2$	$N > 2000$ para CLAE
Repetitividade	-----	DPR < 1% para $n > 5$

Para conseguir tais informações é necessário saber interpretar um cromatograma, que é representado a seguir (figura 10 e 11) por um esquema de separação cromatográfica típica de duas substâncias, sendo t_1 e t_2 os respectivos tempos de retenção. Os termos h , $h/2$ e $Wh/2$ correspondem à altura, à meia altura e à largura a meia altura, respectivamente, e W representa a largura do pico na linha de base, pelo método da triangulação. O sinal relativo ao tempo morto, t_0 , refere-se a uma substância não retida na coluna cromatográfica (Brasil, 2010b).

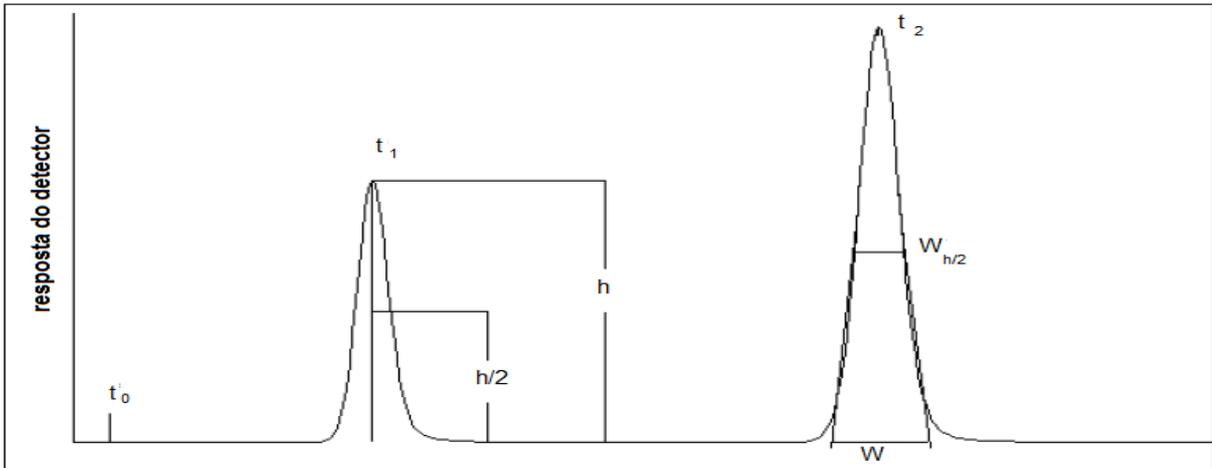


Figura 10 - Separação cromatográfica de duas substâncias (Fonte: Brasil, 2010b).

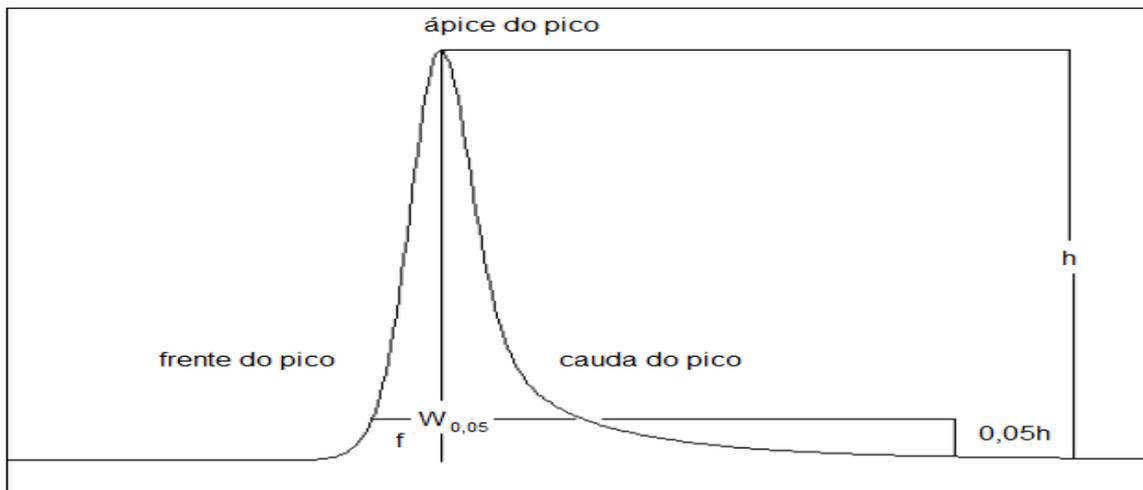


Figura 11: Cromatograma representando a assimetria do pico (Fonte: Brasil, 2010b).

$W_{0,05}$ = largura do pico a 5% da altura; f = valor da porção anterior do pico, em relação à largura a 5% da altura.



OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Desenvolver e validar um método analítico adequado para identificação e quantificação de taninos (ácido gálico e catequina) em produtos contendo *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Piptadenia colubrina* Benth.

3.2 Objetivos específicos:

- ✓ Realizar a caracterização físico-química e microbiológica do fitoterápico Sanativo[®];
- ✓ Desenvolver metodologia analítica em sistema de CLAE-UV para a determinação do teor dos marcadores, ácido gálico e catequina, na droga vegetal; nos extratos e produto contendo *Schinus terebinthifolius* e *Piptadenia colubrina*;
- ✓ Validar o método desenvolvido por meio da avaliação dos parâmetros: especificidade e seletividade do método, linearidade, intervalo de trabalho, precisão, exatidão e robustez.



METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Material vegetal

A droga vegetal (casca seca triturada) de *S. terebinthifolius* e *P. colubrina* (Figura 12), as amostras dos macerados hidroalcoólicos (produtos intermediários) de *S. terebinthifolius* (Lote 00942111; Fabricação: 09/2011; Validade: 09/2013) e *P. colubrina* (Lote 00952211; Fabricação: 09/2011; Validade: 09/2013), assim como o respectivo produto acabado, medicamento fitoterápico Elixir Sanativo® foram fornecidos pelo Laboratório Pernambucano – LAPERLI (Recife-PE).



Figura 12 - Material vegetal trabalhado, casca triturada de *S. terebinthifolius* e *P. colubrina*, respectivamente (Fonte: arquivo pessoal)

4.1.2 Padrões

Os padrões de ácido gálico (Lote 046K0131) e catequina (Lote: 036K164) empregados neste estudo, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

4.1.3 Equipamentos utilizados

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência modelo LC 220, da marca VARIAN detector UV/DAD/Fluorescência, forno de coluna, válvula misturadora de solventes a baixa pressão, válvula de injeção automática, amostrador com controle de temperatura e software Galaxie, pertencente ao LACEN/CE.
- Espectrofotômetro PerkinElmer[®] (LAMBDA EZ201) e TermoScientific[®] (Evolution 60S).
- Balança analítica (Mettler Toledo[®] – AG204)
- Purificador de água (Millipore[®] - Advantage AD)
- Banho-Maria Nova Ética[®]
- Granulotest - Produtest[®]
- Coluna ACE[®], 4,6 x 150 mm, 5 µm, C18
- Estufa Fabbe[®]
- Pontenciômetro Orion[®]
- Pré-coluna ACE[®]5, C18
- Pipetas automáticas de volume variável Gilson[®]
- Pipetas volumétricas Vidrolabor[®]
- Seringas descartável (5 e 10 mL) BD[®]
- Ultrassom Unique[®]
- Unidades filtrante descartável, 0,45 µm de poro, Milipore[®]
- Balança com infravermelho Gehaka[®]

4.1.4 Reagentes

- Água MilliQ
- Metanol grau HPLC - Tedia[®] e J.T.Baker[®]
- Ácido Acético grau HPLC – J.T.Baker[®]
- Acetato de Amônio – J.T.Baker[®]
- Ácido trifluoroacético - Vetec[®]

4.2 MÉTODOS

4.2.1 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL

4.2.1.1 Determinação granulométrica por tamisação

Tarou-se os tamises de numeração ABNT 7, 12, 20, 30, 60, 80 100 e o coletor, de abertura de malha 2,8 e 1,7 mm, 710, 355, 250, 180 e 125 μm , respectivamente, estes foram organizados em ordem decrescente de abertura de malha no equipamento (Figura 13), adicionando 25 g da amostra no primeiro tamis. Após agitação por 30 minutos, com reostato em 10, pesou-se o que ficou retido em cada tamis. As análises foram realizadas em triplicata.



Figura 13 - Tamisador automático utilizado na determinação da faixa granulométrica

4.2.1.2 ENSAIOS DE PUREZA

4.2.1.2.1 Determinação de água em drogas vegetais (Brasil, 2010b)

- Estufa

Pesou-se exatamente cerca de 2 g da droga vegetal em pesa-filtro previamente dessecado e tarado. Colocou-se em estufa a 105 °C por 5 h, após deixou-se voltar à temperatura ambiente dentro de dessecador e pesou-se. Repetiu-se a operação até que a diferença entre duas pesagens seja de, no máximo, 5 mg. Realizado em triplicata.

- Balança de determinação de umidade com Infravermelho

Para fins de comparação a determinação de água também foi realizada em balança de Infravermelho. Com a balança pré-aquecida e calibrada, selecionou-se a opção “medir umidade”, tarou-se o prato de alumínio vazio e colocou-se a amostra espalhando-a sobre todo o prato até que se tenha 10 g, fechou-se a tampa do equipamento e aguardou-se até soar um sinal indicando o final da medida. No display foi realizada a leitura da umidade.

4.2.1.2.2 Determinação de cinzas totais

Pesou-se exatamente cerca de 3 g da droga vegetal pulverizada, transferiu-se para o cadinho de silício previamente calcinado, resfriado e pesado. Incinerou-se a temperatura de 450° C, até eliminar todo o carvão. Resfriou-se em dessecador e pesou-se. Umedeceu-se o cadinho com 2 ml de solução saturada de nitrato de amônio. Evaporou-se até secura em banho-maria e chapa e repetiu-se o processo de incineração até peso constante.

4.2.2 CONTROLE FÍSICO-QUÍMICO DO MEDICAMENTO FITOTERÁPICO SANATIVO®

4.2.2.1 Determinação da densidade relativa (Brasil, 2010b).

A densidade relativa é baseada na relação entre o peso de uma substância ao ar a 20°C e o peso de igual volume de água à mesma temperatura, usando-se o picnômetro calibrado. O picnômetro seco foi pesado na Balança eletrônica de precisão METTLER TOLEDO modelo AG 204 vazio e com água recém destilada à 20°C. Em seguida, a amostra foi colocada, com o cuidado de remover o excesso e pesada. Foi obtido o peso da amostra através da diferença da massa do picnômetro cheio e vazio. Foi obtida a relação entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20° C, denominada, densidade relativa.

4.2.2.2 Determinação do pH (Brasil, 2010b).

O pH das amostras foi determinado em triplicata em potenciômetro previamente calibrado com tampão pH 7 e pH 4.

4.2.2.3 Determinação de resíduo seco (Brasil, 2010b).

Transferiu-se 5 mL de extrato para pesa-filtros ou placa de Petri, medindo, aproximadamente, 50 mm em diâmetro e 30 mm de altura. Evaporou-se até secura em banho-maria e dessecado em estufa a 100 - 105° C, por 3 horas. Deixou-se esfriar em dessecador, sobre pentóxido de fósforo e pesou-se. Foi calculado o resíduo seco em porcentagem sobre a massa ou sobre o volume. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.3 CONTROLE MICROBIOLÓGICO DO MEDICAMENTO FITOTERÁPICO SANATIVO®

4.2.3.1 Contagem do número total de microorganismos mesofílicos (Brasil, 2010b).

Contagem em placa - Método de profundidade

Preparo da amostra: Transferiu-se 1 mL da amostra para 9 mL de caldo Caseína-Soja (TSA).

Ensaio: Adicionou-se 1 mL da amostra preparada como descrito anteriormente, em placa de Petri e verter, separadamente, 15 - 20 mL de ágar caseína soja e, ágar Sabouraud-dextrose mantidos a 45 - 50°C. Utilizou-se duas placas para cada meio e diluição. Incubou-se as placas contendo ágar caseína-soja a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 3 - 5 dias e as placas contendo ágar Sabouraud dextrose a 22,5 °C ± 2,5 °C durante 5-7 dias para determinação do número de microorganismos aeróbios totais e bolores e leveduras, respectivamente. Somente as placas que apresentarem número de colônias inferior a 250 (bactérias) e 50 (bolores e leveduras) foram consideradas para o registro dos resultados. Tomou-se a média aritmética das placas de cada meio e foi calculado o número de UFC por mL do produto.

4.2.3.2 Pesquisa e identificação de patógenos

Foi realizada a pesquisa de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas*, transferido 1 mL da amostra para tubo contendo 9 mL de tampão fosfato pH 7,2 e agitou-se até dissolução. Filtrou-se através de membrana de 0,45 µm, em seguida, lavou-se com 100 ml de Fluido I. A membrana

foi colocada em tubo contendo 30 ml de caldo de enriquecimento. E foi incubada a 30 – 35 °C, pelo período de 24 a 48 h.

4.2.4 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

4.2.4.1 Análise exploratória

Preparação da solução de marcadores

CATEQUINA

Solução mãe: foi pesado exatamente cerca de 10 mg e diluído com água em balão volumétrico de 10 mL, colocou-se em ultrassom até total solubilização da amostra.

Solução final: foi retirado a alíquota de 1 mL e feita nova diluição para balão volumétrico de 10 mL, em seguida, aferido com água e homogeneizado.

Concentração final: 0,1 mg/mL.

ÁCIDO GÁLICO

Solução mãe: foi pesado exatamente cerca de 10 mg e diluído com água em balão volumétrico de 10 mL, colocou-se em ultrassom até total solubilização da amostra.

Solução final: foi retirado a alíquota de 1 mL e feita nova diluição para balão volumétrico de 10 mL, em seguida, aferido com água e homogeneizado.

Concentração final: 0,1 mg/mL.

Solução contendo Ácido Gálico e Catequina: juntou-se 1 mL da solução mãe de catequina a 1 mL da solução mãe de ácido gálico em um balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com água e homogeneizou-se.

Condições iniciais de análise cromatográfica:

Coluna cromatográfica: ACE 5, C18, 15,0 cm x 4,6 mm, partícula de 5µm.

Pré-coluna: ACE, C18, 4,0 cm x 4,6 mm, partícula de 5µm.

Cromatógrafo: 920-LC, VARIAN.

Temperatura do forno da coluna: 35 °C.

Volume de injeção: 10 µL.

Fluxo: 1,0 mL/min.

Fase Móvel A: água acidificada com ácido acético, pH 3,5.

Fase móvel B: metanol.

Tabela 1: Gradiente exploratório para desenvolvimento do método analítico.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase (B)
0	100	0
30	0	100

A tabela 1 apresenta o gradiente exploratório na qual a fase móvel A foi de 100 % a 0 % em 30 minutos. Observou-se em que faixa de porcentagem das fases móveis os picos de ácido gálico e catequina se formaram.

A tabela 2 apresenta as fases móveis que foram testadas isocraticamente.

Tabela 2 – Combinações isocráticas das fases móveis avaliadas:

Sistemas	Fase Móvel A (%)	Fase Móvel B(%)
S1	90	10
S2	88	12
S3	85	15
S4	70	30

4.2.4.2 Alteração da fase móvel

O ácido acético glacial de alta pureza foi substituído pelo ácido trifluoroacético.

4.2.4.3 Análise da seletividade do método

Fase móvel e etanol foram injetados nas mesmas condições da amostra.

4.2.4.4 Análise da pureza do pico

Os picos de cada uma das soluções preparadas foram submetidos à avaliação de pureza de pico do próprio software do equipamento.

4.2.5 MÉTODO PROPOSTO

Preparação da solução amostra do medicamento fitoterápico Sanativo[®]:

Foi transferido 3 ml de Sanativo[®] para balão volumétrico de 10 ml. Após diluição na fase móvel e filtração através de membrana com poro de 0,45 µm, a amostra foi injetada no cromatógrafo.

Preparação da solução amostra do macerado hidroalcoólico de *S. terebinthifolius*.

Foi transferido 1,2 ml de produto intermediário de *S. terebinthifolius* para balão volumétrico de 10 ml Após diluição na fase móvel e filtração através de membrana com poro de 0,45 µm, a amostra foi injetada no cromatógrafo.

Preparação da solução amostra do macerado hidroalcoólico de *P. colubrina*

Foi transferido 1,2 ml de produto intermediário de *P. colubrina* para balão volumétrico de 10 ml Após diluição na fase móvel e filtração através de membrana com poro de 0,45 µm, a amostra foi injetada no cromatógrafo.

Preparo da solução padrão para a metodologia analítica

Após diluição na fase móvel até concentração de 0,078 mg/mL e 0,026 mg/mL de ácido gálico e catequina, respectivamente, submeter a filtração através de membrana com poro de 0,45 μm .

Condições operacionais

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo 920 LC (Varian, Japão), munido de bomba quaternária, auto-injetor e detector de arranjo de diodos. Uma coluna C18 de 150 mm x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 μm (ACE,UK), protegida por pré-coluna de mesma composição (4,0 mm x 4,6 mm), foi empregada durante os ensaios. A fase móvel foi constituída por metanol:solução aquosa ácido trifluoroacético a 0,05 % na proporção de 88:12 (v/v); fluxo de 1 mL/min e temperatura de 35^o C. O volume de injeção foi de 20 μL e os picos referentes aos padrões foram identificados através de co-injeção e comparação com os respectivos tempos de retenção.

Espectro de varredura para determinação de comprimento de onda

As soluções acima descritas foram analisadas em espectrofotômetro, coletando informações da varredura do comprimento de onda de 200 nm a 400 nm.

4.2.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A seletividade do método foi avaliada ainda no desenvolvimento e descrita anteriormente.

4.2.6.1 Robustez

O método desenvolvido foi submetido a pequenas e controladas variações com intuito de verificar se os resultados obtidos são significativamente diferentes e, portanto se devem ser rigorosamente controlados durante as análises.

Foram analisadas amostras em triplicatas para cada item alterado. As modificações foram: fluxo de fase móvel (0,9 mL/min, 1,0 mL/min, 1,1 mL/min), temperatura de forno da coluna (34 °C, 35°C, 36°C) e colunas C18 de diferentes fabricantes (ACE[®], XTerra[®], XBridge[®]). Conforme quadro 6.

Quadro 6: Parâmetros selecionados para avaliação da robustez

Parâmetro	Condições do método	Variações aplicadas	
		Inferior	Superior
Fluxo	1,0 mL/min	0,9 mL/min	1,1 mL/min
Temperatura de forno de coluna	35 °C	34 °C	35 °C
Fabricante de coluna	ACE, 5 µm, 150x4,6 mm	XTerra, 5 µm, 150x4,6 mm	XBridge, 3,5 µm, 150x4,6 mm

4.2.6.2 Linearidade e intervalo

Para a realização da curva de calibração foram preparadas seis concentrações diferentes a partir da solução estoque dos marcadores ácido gálico e catequina, 0,78 mg/mL e 0,26 mg/mL, respectivamente. Para cada concentração foram realizadas 3 curvas, cada ponto em duplicata. Prepararam-se as soluções em balões volumétricos calibrados conforme Tabela 3. O intervalo foi de 70 a 120 % da concentração de trabalho para determinação quantitativa dos analitos. A condição de análise é que o coeficiente de correlação (r^2) 0,99.

Foi verificado a linearidade de ácido gálico e catequina a partir da de diluições sucessivas do medicamento fitoterápico Sanativo[®] (tabela 4), para avaliar o desempenho dos marcadores na matriz.

Tabela 3: Dados para preparo da curva de calibração

<i>Concentração do padrão de referência (mg/mL)</i>	<i>Vol. da solução estoque de ácido gálico (0,78 mg/mL) em mL</i>	<i>Vol. da solução estoque de catequina (0,26 mg/mL) em mL</i>	<i>Vol. do diluente (mL)</i>
0,546	0,7	0,7	
0,642	0,8	0,8	
0,702	0,9	0,9	q.s.p
0,780	1,0	1,0	10mL
0,858	1,1	1,1	
0,936	1,2	1,2	

Tabela 4: Dados para preparo da linearidade dos marcadores no Sanativo[®]

<i>Concentração (%)</i>	<i>Volume de Sanativo[®] (mL)</i>	<i>Vol. do diluente (mL)</i>
70	1,8	
80	2,1	
90	2,4	q.s.p 10mL
100	3,0	
110	3,6	

4.2.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Foi determinado a partir dos dados da linearidade, no limite de detecção a estimativa feita realizada com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base e o limite de quantificação, uma relação de 10 vezes o ruído da linha de base.

4.2.6.4 Precisão – Repetibilidade

Foi avaliada injetando 6 preparações da solução amostra do medicamento fitoterápico Sanativo[®] e 6 preparações da solução padrão, como descrito anteriormente, o DPR do teor de ácido gálico e catequina foi calculado. O DPR tem que ser menor ou igual a 5 %.

4.2.6.5 Precisão - Precisão intermediária

As amostras e padrão foram preparadas em 2 dias diferentes, por 2 analistas em 2 turnos e analisadas no CLAE.

4.2.6.6 Exatidão

Foi realizada pelo método de adição de padrão, no qual quantidades conhecidas do padrão foram adicionadas a quantidades conhecidas do medicamento. A exatidão foi avaliada em três níveis de concentração, 80, 100 e 120 %. O volume adicionado de padrão foi retirado da solução estoque de concentração 0,78 mg/mL de ácido gálico e 0,26 mg/mL de catequina. As amostras foram preparadas conforme tabela 5. Cada nível de concentração foi realizado em triplicata e injetado em triplicata.

Tabela 5: Dados para preparo da exatidão:

Concentração (%)	Sanativo [®] (mL)	Ácido Gálico (mL)	Catequina (mL)	Vol. do diluente (mL)
80	1,5	0,3	0,3	
100	1,5	0,5	0,5	q.s.p. 10
120	1,5	0,7	0,7	



RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL

5.1.1 Análise granulométrica por tamisação

As figuras (Figura 14 e 15) apresentam as distribuições granulométricas da *Schinus terebinthifolius* e *Piptadenia colubrina*.

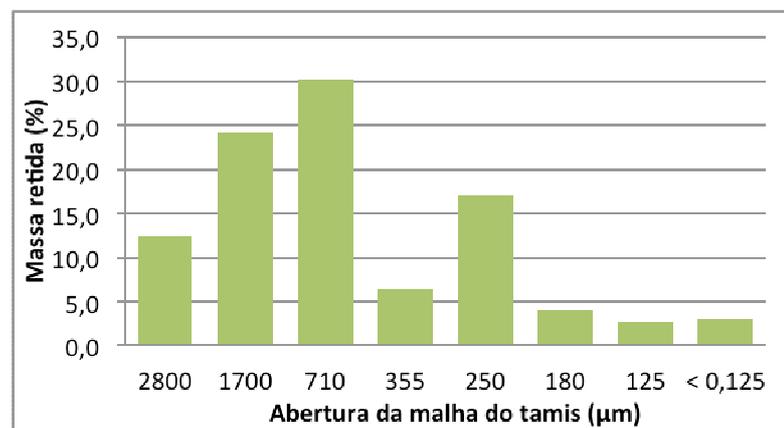


Figura 14 - Distribuição granulométrica do material triturado de *S. terebinthifolius*

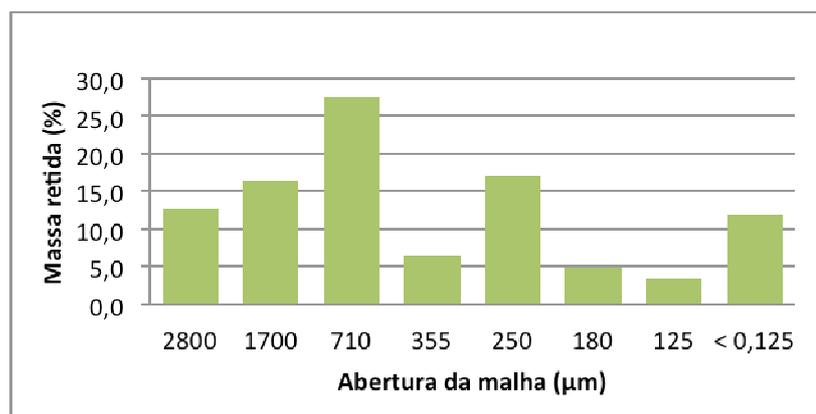


Figura 15 - Distribuição granulométrica do material triturado de *P. colubrina*

A granulometria do material triturado é um parâmetro importante a ser estabelecido, pois representa uma influência direta sobre a eficiência e reprodutibilidade do processo extrativo (MIGLIATO, 2007).

A análise granulométrica da Matéria Prima Vegetal demonstrou que cerca de 30 % das partículas encontram-se na faixa entre 700 e 1700 μm para *S. terebinthifolius* e 27,5 % para *P. colubrina*. Segundo a 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (2010), pó grosso é aquele que passa pela sua totalidade pelo tamis com abertura de 1700 μm e, no máximo, 40 % pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 μm . De acordo com os resultados obtidos ambos os materiais, não se enquadraram em nenhuma das descrições, tendo uma característica de pó muito grosso, uma vez que houve retenção na malha de 1700 μm .

5.1.2 ENSAIOS DE PUREZA

5.1.2.1 Determinação de água em drogas vegetais (Brasil, 2010b)

A tabela 6 apresenta o percentual de água nas drogas vegetais;

Tabela 6: Percentual de água presente nas drogas vegetais de *S. terebinthifolius* e *P. colubrina* determinadas em estufa e balança de determinação de umidade com infravermelho.

	<i>S. terebinthifolius</i> (% de água \pm DPR)	<i>P. colubrina</i> (% de água \pm DPR)
Estufa à 105°C	11,86 \pm 0,62	10,48 \pm 0,51
Balança com infravermelho	13,30 \pm 1,56	11,50 \pm 0,18

Segundo a especificação da Farmacopeia Brasileira (2010), a umidade em drogas vegetais deve estar entre 8 e 14 %, para evitar o desenvolvimento de microrganismos, insetos e hidrólise que deteriorariam a amostra, ou secagem excessiva que poderia levar a degradação de compostos. Ambas as drogas vegetais, nos dois métodos testados apresentaram um resultado satisfatório, atendendo a especificação. A balança de infravermelho permite a obtenção de resultado em menor espaço de tempo e temperatura, contudo não é um método citado na Farmacopeia Brasileira (SIMÕES et al., 2004).

5.1.2.2 Determinação de cinzas totais

A determinação de cinzas totais estabelece a quantidade de substância residual não volátil na droga vegetal. Não existe especificação para tal valor, contudo nas monografias de drogas vegetais existentes na Farmacopeia Brasileira, o valores variam entre 6 e 15 %, o teor de cinzas totais nas drogas vegetais avaliadas encontram-se dentro dessa faixa (tabela 7). Assim sendo, este é uma dado informativo referente às amostras que pode corresponder a cinzas fisiológicas e materiais estranhos não-fisiológicos.

Tabela 7: Determinação de cinzas totais nas drogas vegetais.

Droga Vegetal	cinzas totais (%; m/m)
<i>S. terebinthifolius</i>	11,3% ± 0,88
<i>P. colubrina</i>	8,2% ± 0,73

5.2 CONTROLE DE QUALIDADE DO SANATIVO[®]

5.2.1 Controle físico-químico

5.2.1.1 Densidade relativa

Todos estes ensaios são importantes para assegurar a qualidade, atendendo a uma especificação pré-estabelecida. Seguindo este entendimento, na caracterização e controle de qualidade do medicamento fitoterápico Sanativo[®] o valor da densidade relativa média encontrado foi de 0,9032 g/cm³, o qual se manteve dentro do limite preconizado por Prista e colaboradores (1990) para tinturas, de 0,87 a 0,98 g/cm³.

5.2.1.2 pH

O pH foi determinado em duas amostras do medicamento fitoterápico Sanativo[®], sendo cada amostra analisada em triplicata. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 8:

Tabela 8: Determinação do potencial hidrogeniônico do medicamento fitoterápico Sanativo[®]

Amostra	Leituras 1	Leitura 2	Leitura 3	Média	DPR (%)
A	5,13	5,16	5,17	5,15	0,40
B	5,08	5,09	5,09	5,09	0,11

Não há especificação para o valor do pH do medicamento fitoterápico Sanativo[®], contudo os valores médios encontrados estão dentro da faixa recomendada para utilização como produto tópico, por ser compatível com o pH cutâneo (5,5 a 6,5), além de ser critério de estabilidade. O desvio entre as duas amostras analisadas foi baixo, 0,83 (ISAAC, et al., 2008).

5.2.1.3 Determinação de resíduo seco

A análise do resíduo seco do medicamento fitoterápico Sanativo[®], foi realizada a temperatura de 105 °C, em triplicata. Como resultado foi observado uma média de 6,99 % (m/v) e um desvio padrão relativo de 0,95 %. A determinação do resíduo seco é um parâmetro fundamental e preliminar quando se objetiva alcançar a eficácia de uma formulação fitoterápica, pois este ensaio implica na quantificação das substâncias extraídas da planta através da eliminação do solvente extrator. Sendo assim, esse percentual é um indicativo da concentração do medicamento fitoterápico Sanativo[®] (OLIVEIRA; BERRETTA, 2007).

5.3 CONTROLE MICROBIOLÓGICO

5.3.1 Contagem do número total de microorganismos mesofílicos (Brasil, 2010b)

Contagem em placa - Método de profundidade

A contaminação microbiana de um produto pode acarretar em alterações em suas propriedades físicas e químicas e ainda caracteriza risco de infecção para o usuário. Assim, produtos farmacêuticos de uso oral e tópico que não têm como requerimento serem estéreis devem estar sujeitos ao controle de contaminação microbiana. Atualmente a 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (2010), estabelece as seguintes especificações para tinturas/extratos fluidos de origem vegetal, mineral ou animal é tolerada a presença de 10^4 bactérias aeróbias/mL, 10^3 fungos/mL e não possui especificação para pesquisa de patógeno. Levando em consideração a especificação para produtos tópico é exigido ausência de *Staphylococcus aureus* (SA) e *Pseudomonas aeruginosa* em 1 mL. No ensaio realizado não ocorreu formação de colônia, de acordo com a Figura 16.

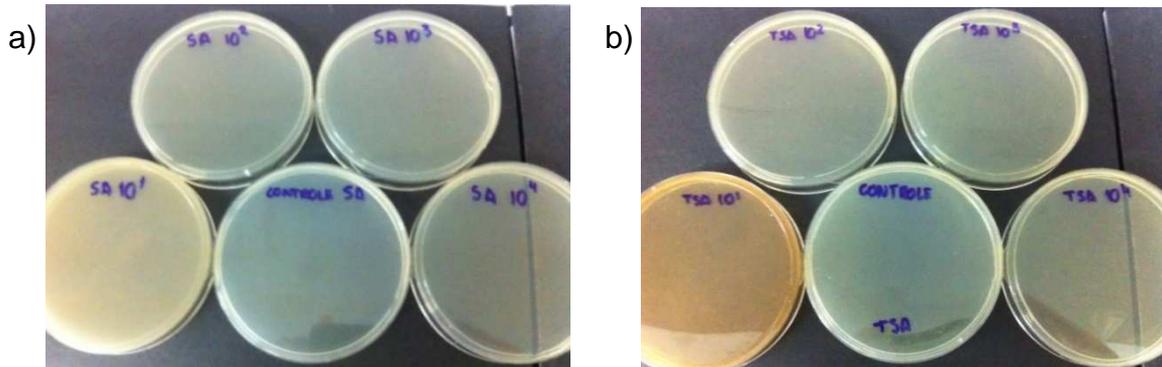


Figura 16 - Placa para AS (a), placa de TSA (b), após o período de incubação para contagem do número total de microorganismos mesófilicos (Fonte: arquivo pessoal)

5.3.2 Pesquisa e identificação de patógenos

Resultados obtidos permitiram constatar que não há presença de *E. coli*, nem *Staphylococcus*, como se visualiza nas placas de Mac Conkey e Baird-Parker (BP), (Figura 17) respectivamente.



Figura 17 - placas de Baird-Parker (BP) e Mac Conkey (MC) após incubação para pesquisa e identificações de patógenos no medicamento fitoterápico Sanativo®

5.4 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

5.4.1 Análise dos marcadores durante o gradiente exploratório

O padrão de ácido gálico (Figura 18) e catequina (Figura 19) na concentração de 0,1 mg/mL foram inicialmente, injetados separadamente em análises

cromatográficas na qual a fase móvel eluiu de forma exploratória. Procurando observar em que porcentagem de Fase A e Fase B encontravam-se durante a eluição e o tempo de retenção dos compostos. Sendo a Fase A constituída de água acidificada (pH 3,5, com adição de ácido acético) e Fase B, metanol, o fluxo de 1,0 mL/min e temperatura do forno de coluna 35°C.

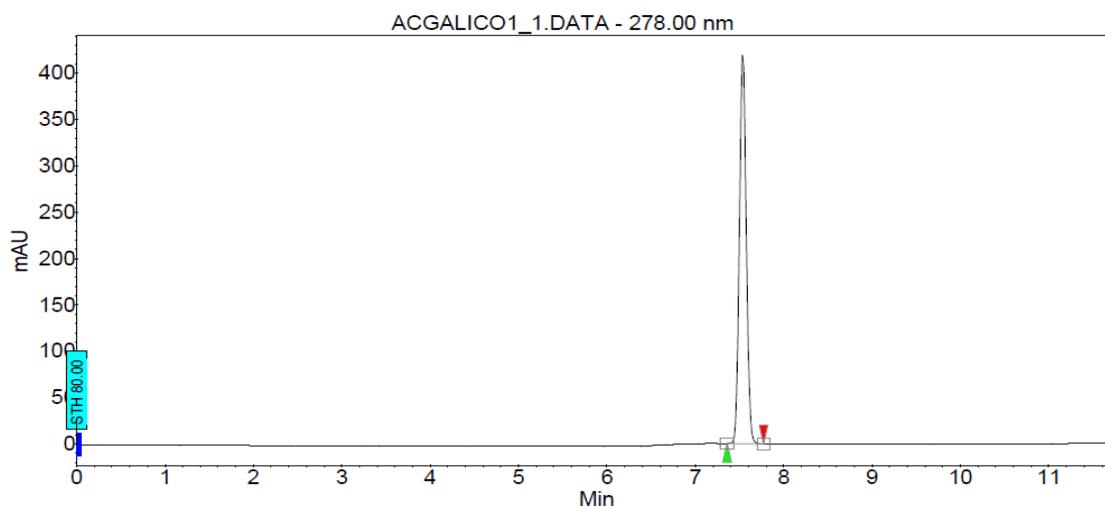


Figura 18 - Análise cromatográfica exploratória do Ácido Gálico (ACG)

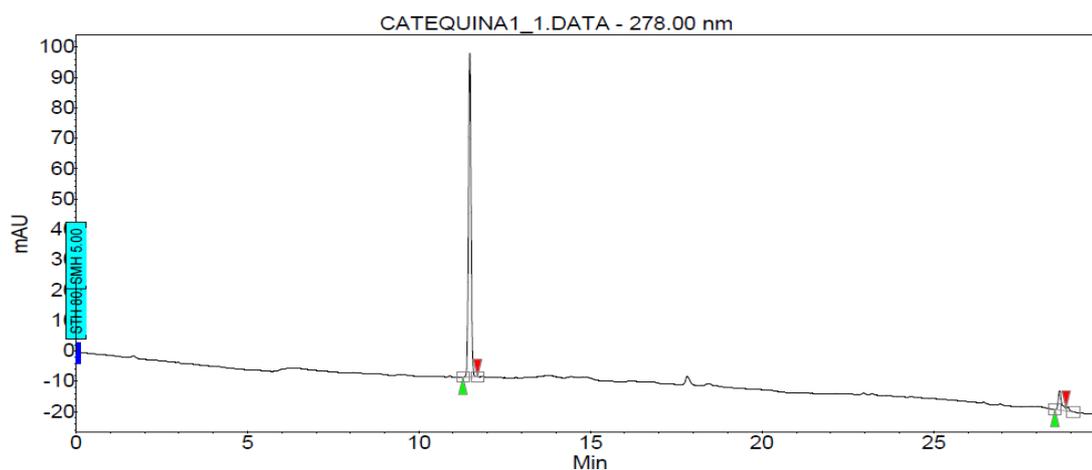


Figura 19 - Análise cromatográfica exploratória da Catequina (CTQ)

5.4.2 Avaliação de combinações isocráticas de Fase Móvel

Tabela 9: Combinações avaliadas de eluição isocrática da Fase Móvel para análise de ACG e CTQ e verificação parcial de conformidade com o sistema cromatográfico:

Sistemas	Fase Móvel A (%)	Fase Móvel B (%)	Tr ACG	Tr CTQ	K1	K2	α
S1	90	10	2,13	2,77	0,12	0,46	3,78
S2	88	12	3,05	9,6	0,53	3,82	7,18
S3	85	14	3,16	12,11	0,58	5,06	8,72
S4	70	30	3,40	15,95	0,67	6,86	10,16

*TR= tempo de retenção (min); K1 = fator de retenção para ácido gálico, K2 = fator de retenção para catequina e α = fator de separação ou seletividade.

Segundo Jardim e colaboradores (2006), a força cromatográfica da fase móvel adequada a uma separação é selecionada através da análise do fator de retenção (k), que deve estar num intervalo ideal sendo maior ou igual a 1 e menor ou igual a 10, valores fora esses extremos não são recomendados, seja por fornecerem separações pouco eficientes, seja por implicarem em tempos de análise longos, com alargamento de picos. Assim observando o resultado pode-se verificar que sistema S1 os picos não apresentaram uma separação suficiente e o sistema S4, aumentou o tempo de análise. S2 apresenta vantagem em relação ao S3, pois os picos apresentam separação suficiente e a coluna cromatográfica pode passar mais tempo se regenerando para a próxima análise cromatográfica. O fator de separação deve ser maior do que 1. Assim a combinação selecionada foi a S2 (Figura 20), na qual a fase móvel é composta por uma mistura de 88 % da Fase A e 12 % da Fase B.

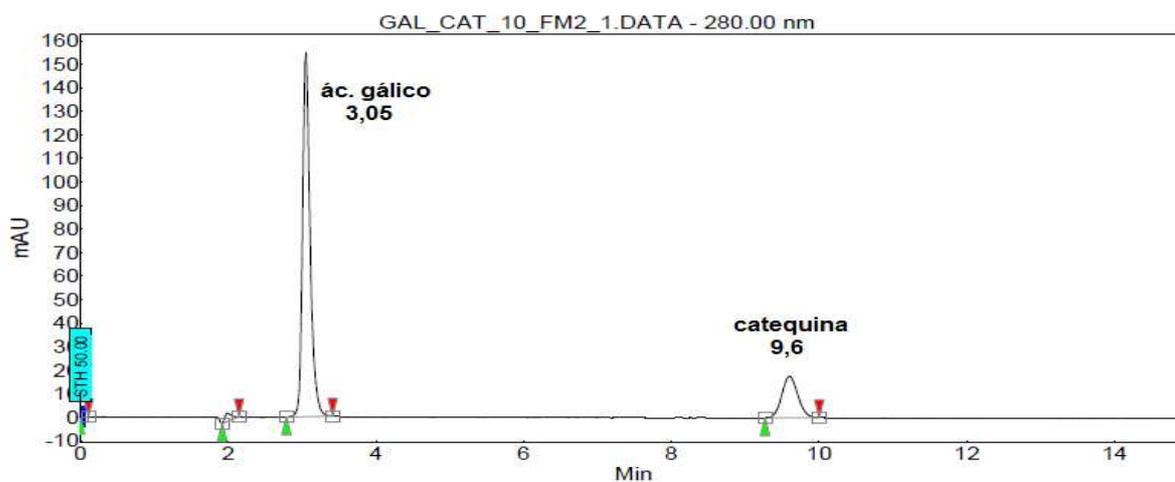


Figura 20 - Cromatograma analisado com a proporção de fase móvel A e B selecionada

5.4.3 Alteração da fase móvel

O uso de ácidos na fase móvel é imprescindível para prevenir a ionização dos grupos hidroxilas presentes nos compostos fenólicos permitindo uma melhor separação e simetria de pico (CARVALHO et al., 2009). O ácido trifluoroacético é um ácido mais forte, tornando o pH da fase móvel mais ácido com adição de uma menor quantidade quando comparado com a adição de ácido acético. Para verificação da capacidade de utilização do método sua adequabilidade foi verificada, conforme tabela 10.

Tabela 10: Adequabilidade do sistema do método desenvolvido:

	<i>Ácido gálico</i>	<i>Catequina</i>
Fator de retenção	1,06	9,24
Repetitividade (n=6)	DPR= 0,30%	DPR= 1,36%
Resolução	-----	18,2
Fator de cauda	1,8	1,73
Numero de pratos teóricos	2589,13	5948,72

Os fatores de retenção demonstraram que os picos dos fármacos estão resolvidos, devido à adequada força de eluição da fase móvel, mesmo com ácido gálico abaixo de 2, uma vez que o tempo de retenção é acima de 3 minutos. O valor de resolução calculado foi superior a 2,0, o que mostra a total separação entre os picos. Os valores de fator de cauda, próximos da unidade, são ideais, pois indicam a simetria dos picos. Picos simétricos minimizam erros na quantificação dos fármacos (SILVA et al., 2006). A eficiência de uma coluna aumenta com o número de pratos teóricos, que devem ser acima de 2000 para apresentar eficiência adequada, o que foi verificado em relação aos dois marcadores.

5.4.4 Espectro de UV para os marcadores

A varredura espectral de 200 a 400 nm permite a visualização dos comprimentos de onda com maior absorção e assim uma melhor resposta de sinal cromatográfico. Considerando o espectro de UV dos padrões obtido com auxílio do detector de arranjo de diodos (Figura 21), o cromatograma dos padrões foi obtido em 270 nm (Figura 22).

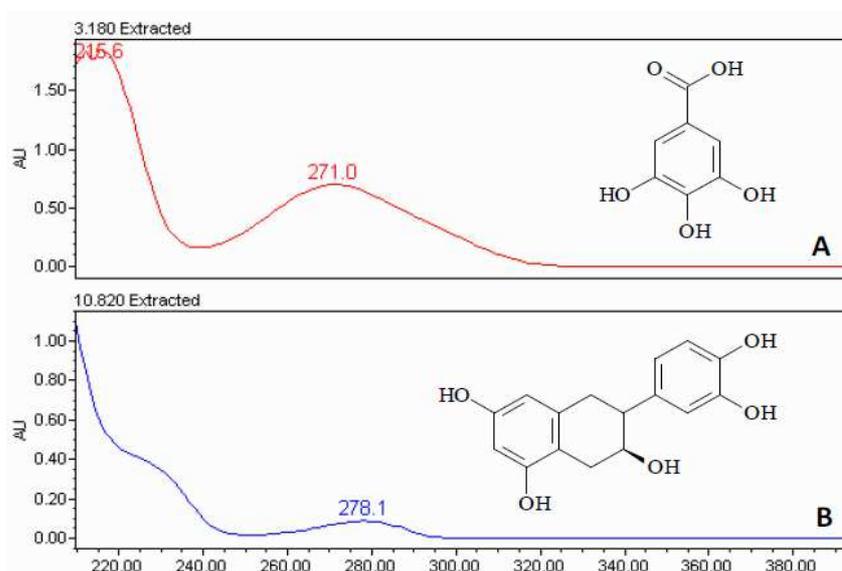


Figura 21 - Espectro de UV dos picos do ácido gálico (A) e da catequina (B).

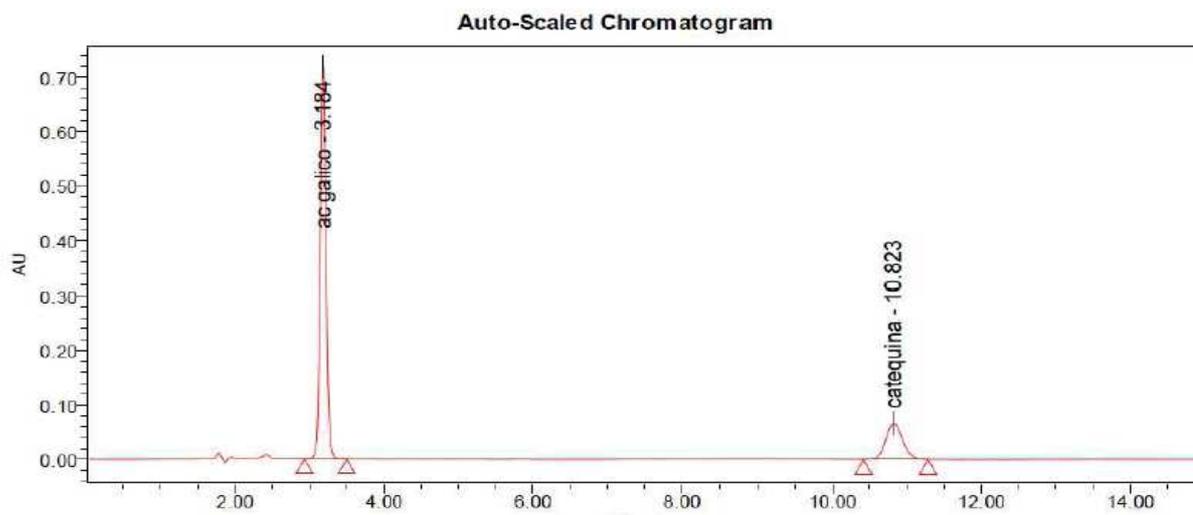


Figura 22 - Cromatograma dos padrões de ácido gálico e de catequina em 270 nm.

A identificação preliminar dos marcadores nas amostras estudadas foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros no UV, e, confirmadas através da co-injeção de soluções dos padrões (Figura 23).

De acordo com os cromatogramas apresentados na figura 23, é possível observar que ambas as espécies em estudo apresentam taninos hidrolisáveis (derivados do ácido gálico) e taninos condensados (derivados da catequina). Enquanto a presença de ácido gálico é pronunciada no macerado de *S. terebinthifolius*, o pico da catequina foi bastante discreto nesta amostra (Figura 23B). Por outro lado, no macerado de *P. colubrina* ambos os picos correspondentes aos padrões apresentaram menor intensidade, porém com maior concentração para catequina em detrimento do ácido gálico (Figura 23A). O cromatograma do produto acabado (Figura 23C) apresentou perfil qualitativo próximo ao esperado considerando a contribuição da proporção de cada um dos macerados adicionados ao produto final.

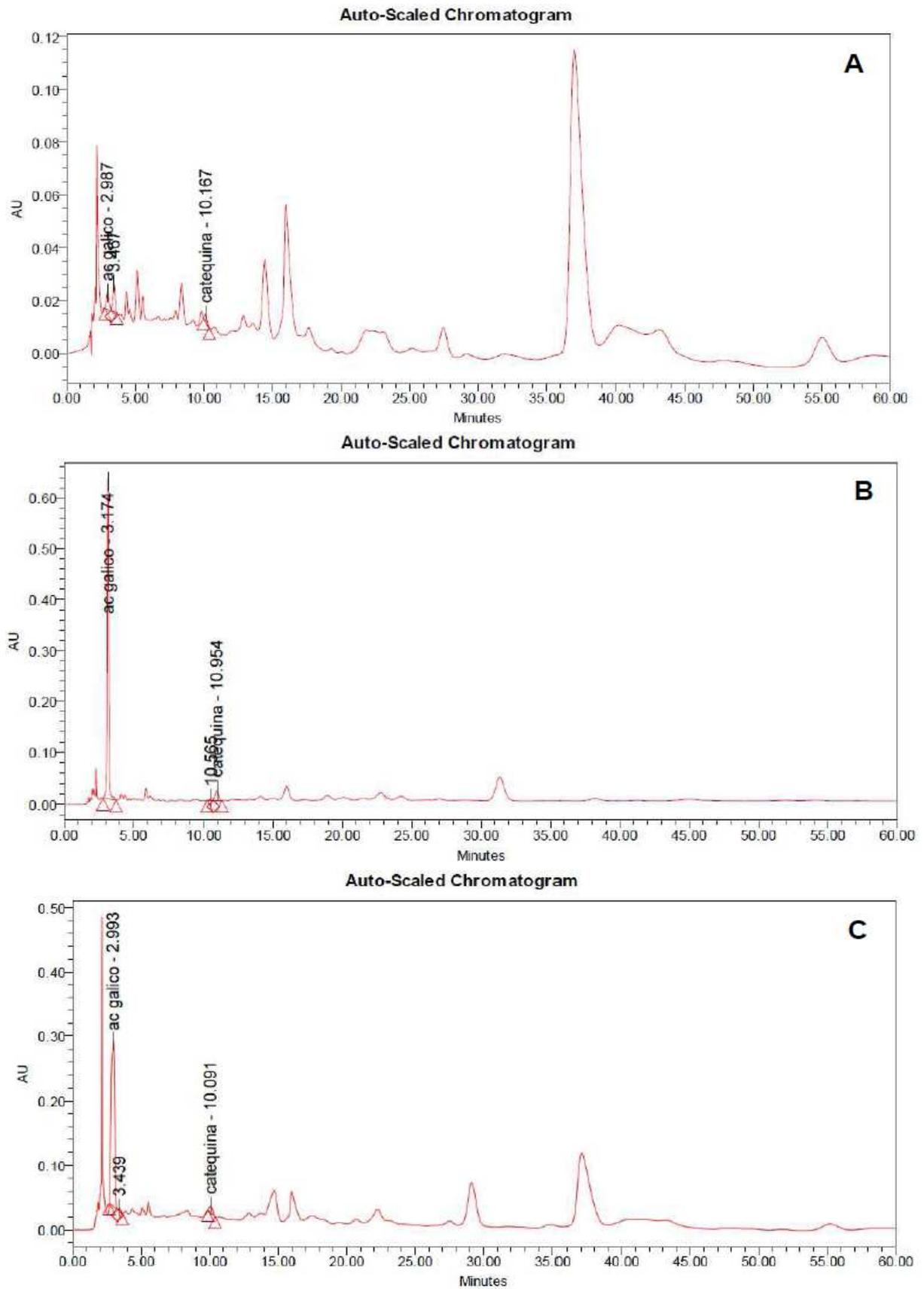


Figura 23 - Cromatogramas obtidos em 270 nm para as soluções extrativas de *P. colubrina* (A) e *S. terebinthifolius* (B); e, produto acabado (Elixir Sanativo[®]) (C).

Com o intuito de aumentar a sensibilidade do método, novas análises foram conduzidas empregando comprimento de onda de 210 nm (Figura 24).

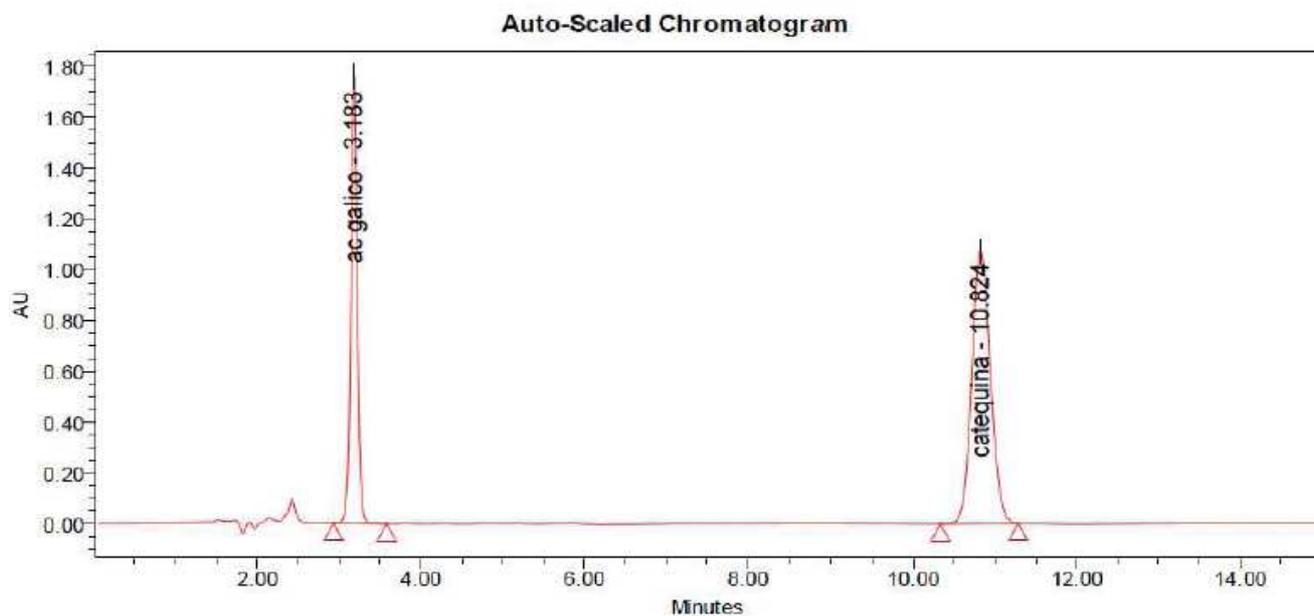


Figura 24 - Cromatograma dos padrões de ácido gálico e de catequina em 210 nm.

O cromatograma dos padrões obtidos em 210 nm apresentou aumento substancial na sensibilidade do método sem qualquer prejuízo para performance (Figura 24). Tal comportamento se reproduziu durante a análise das amostras com incremento na resposta dos marcadores sem qualquer redução na capacidade de separação dos mesmos (Figura 25).

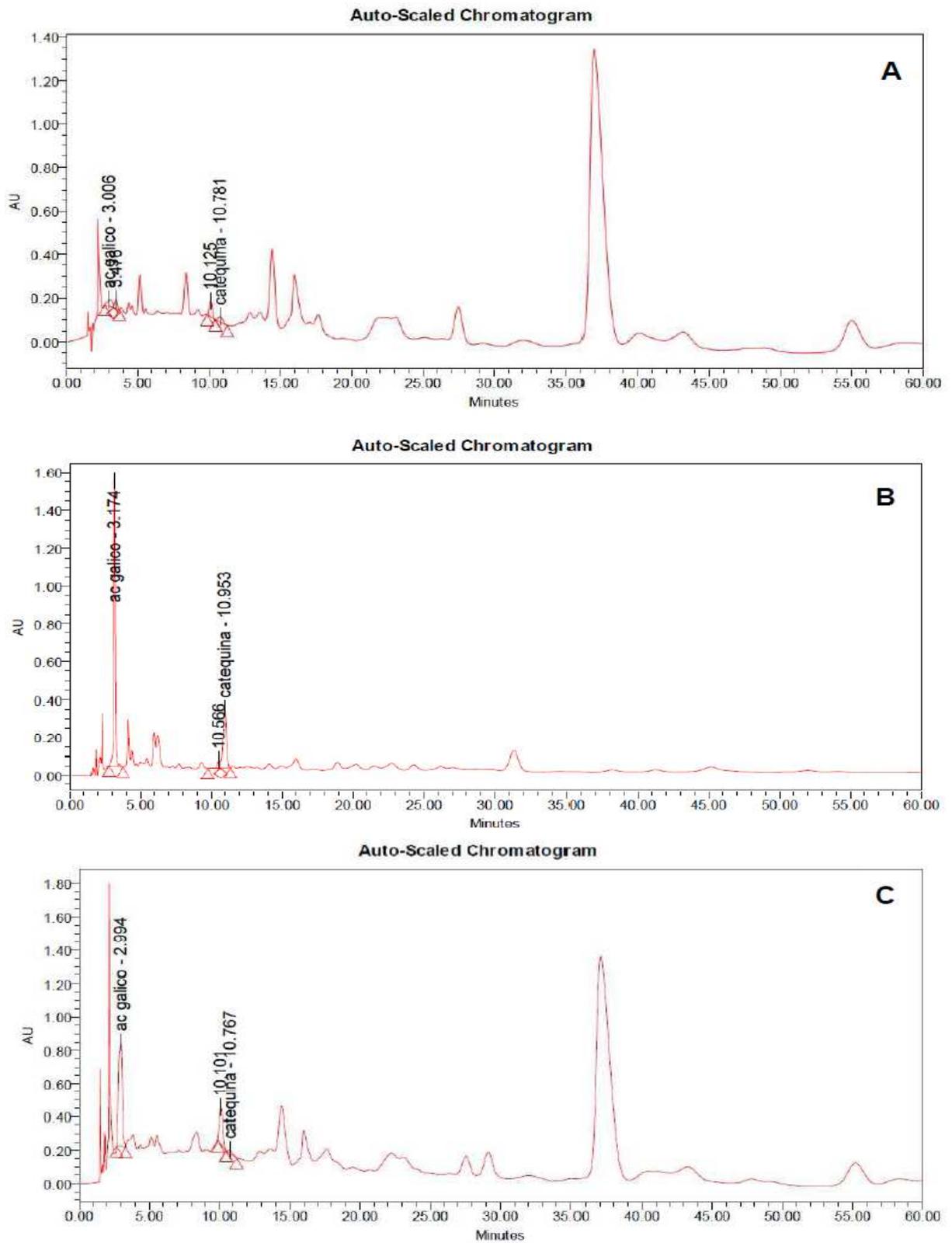
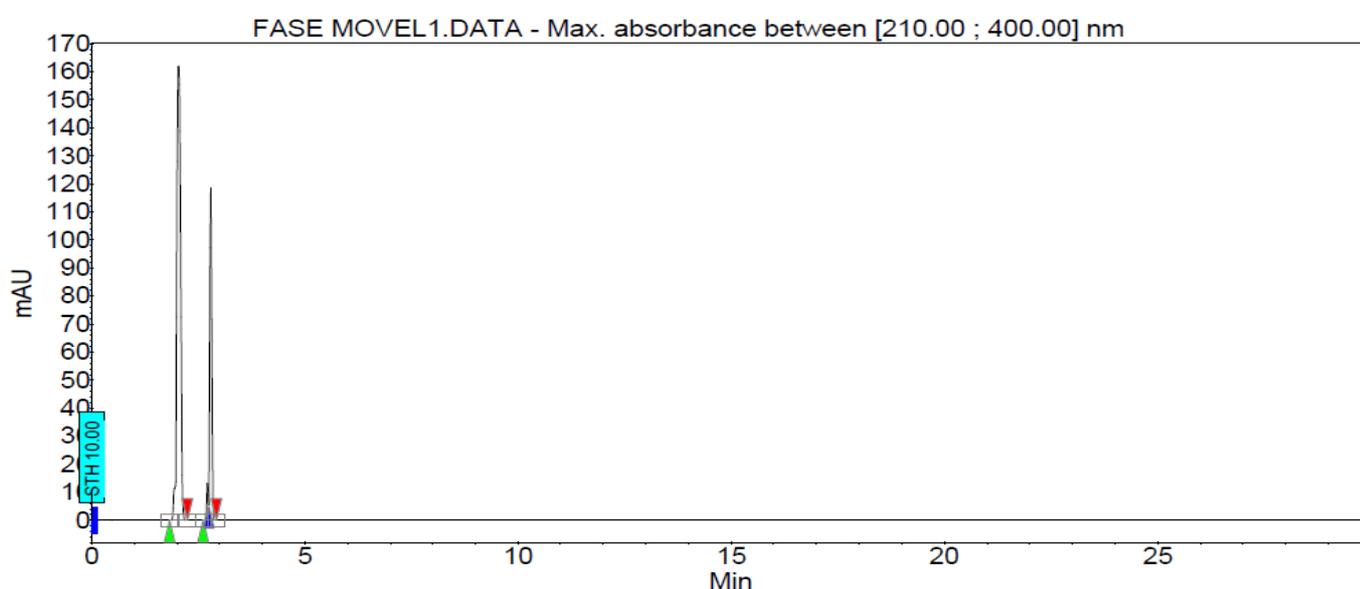


Figura 25 - Cromatogramas obtidos em 210 nm para as soluções extrativas de *P. colubrina* (A) e *S. terebinthifolia* (B); e, produto acabado (Elixir Sanativo[®]) (C).

5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DESENVOLVIDO

5.5.1 Avaliação da seletividade do método analítico

O diluente utilizado no preparo das amostras foi injetado nas mesmas condições para verificação de inexistência de co-eluição ou interferentes, o que foi confirmado como se observa na Figura 26. Os picos que são registrados foram eluídos antes do ácido gálico que apresenta tempo de retenção médio de 3,04 min.



Índice	Tempo (min)	% Área	Altura (mAU)	Área (mAU.Sec)	Λ (max.abs)
1	2,04	70,70	162,0	1025,3	214
2	2,71	2,67	13,2	38,7	320
3	2,79	26,63	118,6	386,1	215
total		100	293,8	1450,1	

Figura 26 - Análise cromatográfica do diluente dos marcadores e amostras.

A pureza do pico também é aceita como uma das condições de avaliação do parâmetro seletividade, sendo determinada pelo detector DAD (Figura 27 e 28).

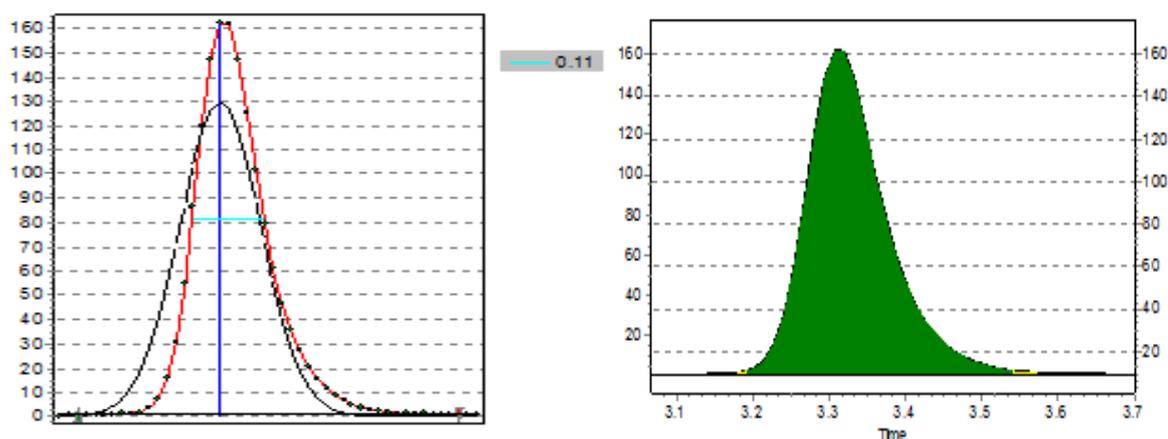


Figura 27 - Análise de pureza do padrão ácido gálico. A área verde corresponde à área pura.

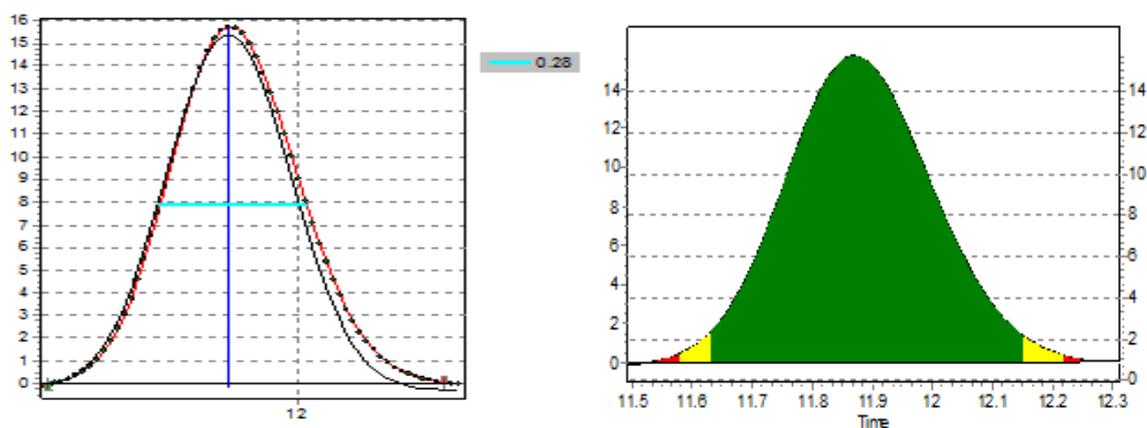


Figura 28 - Análise de pureza do padrão de catequina. Área verde: pura, amarela: parcialmente pura e vermelha: impura.

5.5.2 Adição dos marcadores ao medicamento fitoterápico Sanativo®

A adição de marcadores na amostra do medicamento fitoterápico Sanativo® foi realizada para confirmar os picos referentes ao Ácido Gálico e Catequina. A figura 29 apresenta a comparação entre a análise do Sanativo® na diluição 3:10 (v/v), do

Sanativo[®] adicionado de padrão de ácido gálico e do Sanativo[®] adicionado de padrão de catequina e na figura 30 a análise dos marcadores comparando ao Sanativo[®].

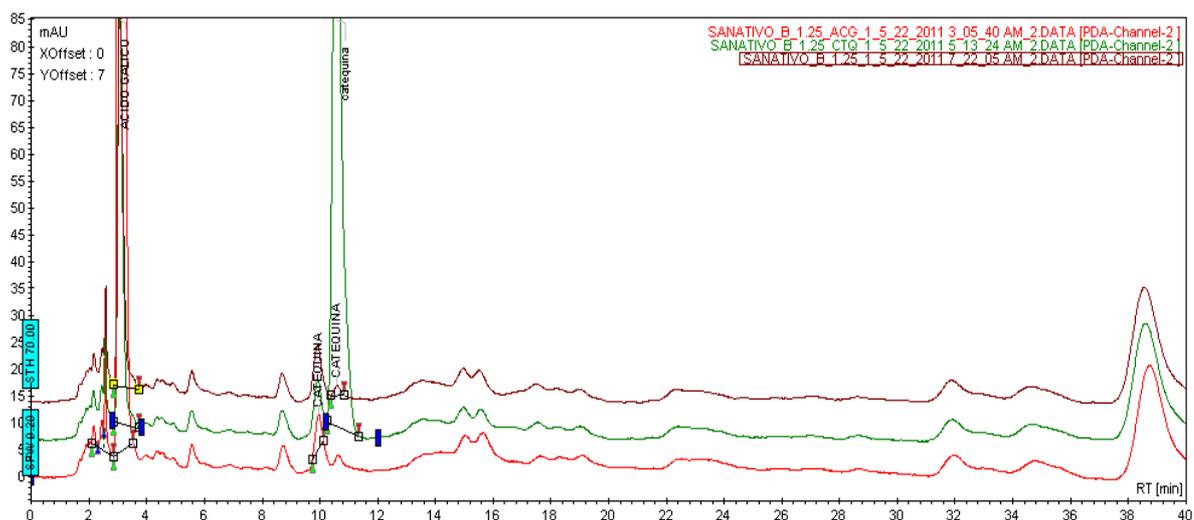


Figura 29 – Cromatogramas: Sanativo[®] adicionado de ácido gálico (vermelho); Sanativo[®] adicionado de catequina (verde) e Sanativo[®] (vermelho escuro).

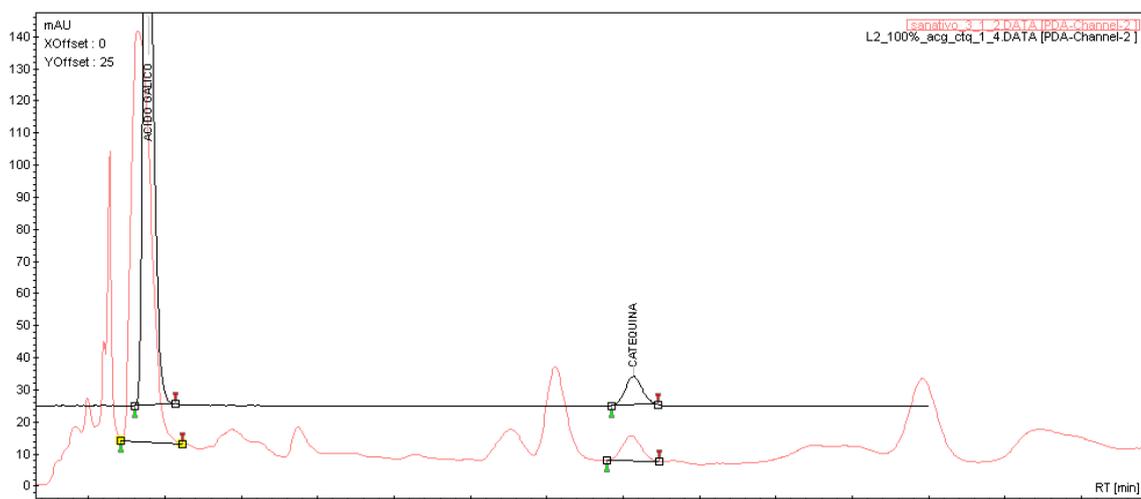


Figura 30 – Cromatogramas: marcadores ácido gálico e catequina (preto); Sanativo[®] diluído 3:10 (v/v) na fase móvel (vermelho).

5.5.3 Robustez

Na robustez foi avaliado a interferência ao método quando a temperatura de forno de coluna, fluxo de fase móvel ou quando o fabricante da coluna é modificado. O aumento da temperatura do forno da coluna diminui o tempo de retenção, aumenta a eficiência da coluna, aumentando o número de pratos teóricos, contudo aumenta o fator de cauda, diminuindo a simetria, aumentando a possibilidade de erros na quantificação, dados apresentados na tabela 11.

Tabela 11: Avaliação da interferência da temperatura de forno de coluna no método.

°C	Ácido gálico				Catequina			
	Tr	Área	N	T	Tr	Área	N	T
34	3,28	4378,30	2475,40	1,68	10,67	3270,77	5881,20	1,61
35	3,22	4393,97	2584,13	1,80	10,26	3299,40	5948,72	1,73
36	3,18	4376,37	2654,55	1,84	9,87	3301,27	5978,39	1,97

Tr= tempo de retenção (min); N= número de pratos teóricos; T = fator de cauda.

A avaliação da influência da velocidade do fluxo no resultado método indicou quanto mais rápido, menor o tempo de retenção e o número de pratos teóricos, mas esta última alteração (N) não compromete o desempenho, uma vez que a simetria do pico melhora como pode ser verificado com a diminuição de T, dados presentes na tabela 12.

Tabela 12: Avaliação da interferência da velocidade do fluxo no método.

Vazão mL/min	Ácido gálico				Catequina			
	Tr	Área	N	T	Tr	Área	N	T
0,9	3,59	4899,95	2617,72	1,86	11,46	3675,10	6091,49	1,73
1,0	3,22	4393,97	2584,13	1,80	10,26	3299,40	5948,72	1,73
1,1	2,93	3983,63	2568,02	1,74	9,30	3003,43	5747,85	1,69

Tr= tempo de retenção (min); N= número de pratos teóricos; T = fator de cauda.

Colunas cromatográficas de fabricantes diferentes foram avaliadas (tabela 13), todas são empacotadas com octadecilsilano (C18), tem 150 x 4,6 mm de comprimento e tamanho de partícula de 5 µm, com exceção da XBridge® que a partícula era menor, 3,5 µm, o que gera uma maior eficiência da coluna, por possuir mais pratos teóricos, mas este dado somente influenciou no pico da catequina. Ainda assim, não representou uma diminuição no fator de cauda, pois foi verificado maior simetria na utilização da coluna Xterra®.

Tabela 13: Resultado para diferentes colunas no método.

Coluna	Ácido gálico				Catequina			
	Tr	Área	N	T	Tr	Área	N	T
ACE®	3,22	4393,97	2584,13	1,80	10,26	3299,40	5948,72	1,73
Xterra®	4,16	4114,90	2705,57	1,36	13,33	2648,67	4038,80	1,00
Xbridge®	2,86	4265,33	2311,18	1,84	8,47	3050,90	6227,49	1,84

Tr= tempo de retenção (min); N= número de pratos a teóricos; T = fator de cauda.

5.5.4 Linearidade e intervalo

5.5.4.1 Linearidade do Ácido Gálico

A tabela 14 mostra o resultado obtido da curva de calibração da solução padrão de ácido gálico que, por regressão linear, apresentou $R^2 = 0,9958$ (Figura 31). Esta faixa de linearidade foi adequada à aplicação do método na determinação do teor de ácido gálico nas amostras do medicamento fitoterápico Sanativo®. Foram preparadas 3 curvas de calibração, com cada concentração sendo injetada em triplicata.

Tabela 14 - Áreas dos picos cromatográficos das curvas de calibração da solução padrão de ácido gálico

Conc. (mg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DPR%
0,055	3141,5	3154,2	3129,9	3141,9	0,39
0,062	3579,6	3575,6	3536,4	3563,9	0,67
0,070	3938,1	3927,1	4161,5	4008,9	3,30
0,078	4541,1	4521,8	4453,2	4505,4	1,03
0,086	4959,9	4928,1	4906,3	4931,4	0,55
0,094	5434,3	5425,5	5393,7	5417,8	0,39

O teste de linearidade com padrão permite avaliar a concordância da resposta do sistema cromatográfico frente a diferentes concentrações do analito de interesse. O INMETRO (2007) denomina este ensaio como “escolha da faixa linear de trabalho”, e estabelece que a concentração mais esperada da amostra deva, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. Para esta análise o método apresentou resposta linear na faixa de 0,055 a 0,094 mg/mL de ácido gálico.

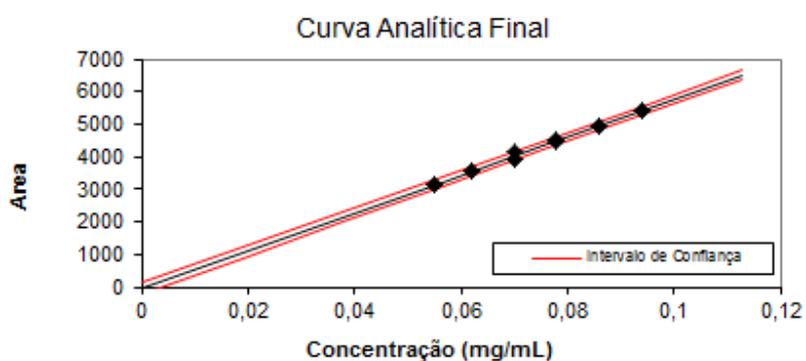


Figura 31 - Linearidade obtida com a média das três curvas de calibração da solução do padrão de ácido gálico

O método se mostrou linear, para a faixa de variação entre 70 a 120%, apresentando a equação da reta, $y = 58100x - 47,54$.

5.5.4.2 Linearidade da Catequina

A tabela 15 mostra o resultado obtido da curva de calibração da solução padrão de catequina que, por regressão linear, obteve $R^2 = 0,9973$ (Figura 32). Esta faixa de linearidade foi adequada à aplicação do método na determinação do teor de Catequina nas amostras do medicamento fitoterápico Sanativo[®]. Foram preparadas 3 curvas de calibração, com cada concentração sendo injetada em triplicata.

Tabela 15 - Áreas dos picos cromatográficos das curvas de calibração da solução padrão de catequina

Conc. (mg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DPR%
0,018	2493,4	2484,8	2518,5	2498,9	0,70
0,021	2833,9	2829,2	2873,3	2845,5	0,85
0,023	3162,9	3149,3	3126,4	3146,2	0,59
0,026	3576,4	3560,8	3575,1	3570,8	0,24
0,029	3893,5	3865,1	3927,9	3895,5	0,81
0,031	4226,8	4233,1	4307,4	4255,7	1,05

Para esta análise o método apresentou resposta linear na faixa de 0,018 a 0,031 mg/mL de catequina.

O método se mostrou linear, para a faixa de variação entre 70 a 120%, apresentando a equação da reta, $y = 135810,6x + 14,22$.

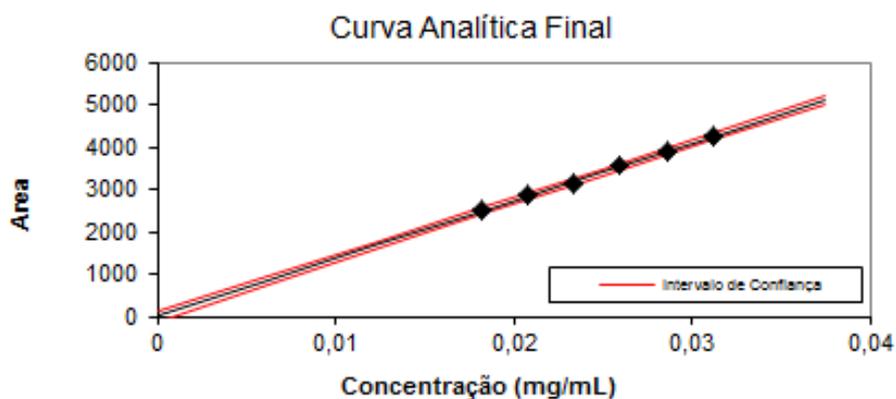


Figura 32 - Linearidade obtida com a média das três curvas de calibração da solução padrão de catequina.

5.5.4.3 Linearidade do ácido gálico e catequina a partir do Sanativo®

Após a verificação da linearidade dos marcadores sem interferência de outros compostos foi verificado o desempenho no Sanativo®. As curvas de calibração apresentaram através de regressão linear, $R^2 = 0,9973$ para ácido gálico (Figura 33) e 0,9936 para catequina (Figura 34). A faixa linear adequada para ácido gálico foi de 0,047 a 0,086 mg/mL e 0,016 e 0,029 mg/mL para a catequina, o que correspondeu a 70 a 110 %, assim verificamos que a matriz interfere o desempenho dos marcadores a 120 %. Foi preparado uma curva de calibração, com cada concentração sendo injetada em duplicata.

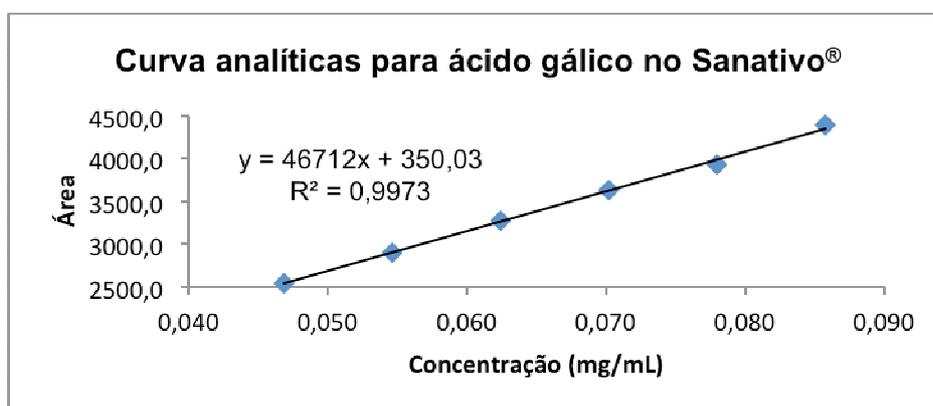


Figura 33 – Linearidade para o ácido gálico obtida com o Sanativo®

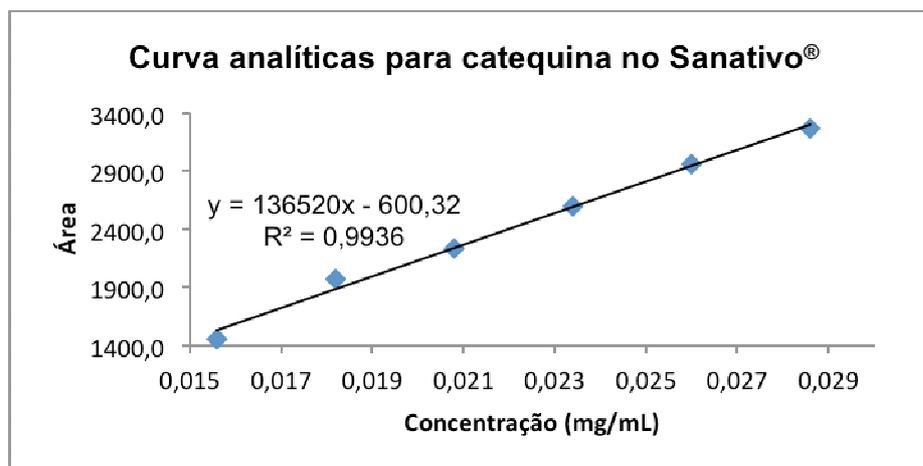


Figura 34 – Linearidade para a catequina obtida com o Sanativo®

5.5.5 Limite de quantificação e limite de detecção

Os limites de quantificação e de detecção do ácido gálico e catequina foram determinados a partir das curvas de calibração. Os valores encontrados são apresentados na tabela 16.

Tabela 16: Limite de detecção e limite de quantificação para ácido gálico e catequina.

	ácido gálico	catequina
Limite de detecção (µg/mL)	3,24	9,57
Limite de quantificação (µg/mL)	0,86	2,55

5.5.6 Precisão

5.5.6.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada injetando seis determinações a 100% da concentração teste da solução amostra e solução padrão, executadas por um

mesmo analista, com o mesmo equipamento em um curto período de tempo, conforme apresentado na tabela 17.

Tabela 17 – Dados de repetibilidade para o ácido gálico e catequina

	<i>Ácido Gálico</i>			<i>Catequina</i>		
	Padrão	Sanativo®	Teor (%)	Padrão	Sanativo®	Teor (%)
1	4529,4	4466,5	99,14	3257,9	3154,4	95,78
2	4552,8	4437,5	98,49	3244,8	3164,3	96,08
3	4527,1	4437,2	98,49	3384,8	3204,9	97,31
4	4516,4	4441,8	98,59	3393,4	3250,9	98,71
5	4444,4	4439,4	98,31	3241,5	3161,6	96,00
6	4462,0	4432,5	98,38	3238,4	3130,4	95,05
Média	4505,35	4442,48	98,57	3293,47	3177,75	96,49
DPR (%)	0,94	0,27	0,30	2,36	1,36	1,36

O resultado de precisão foi o DPR de 0,94 % para o ácido gálico na solução padrão e 0,27 % na solução amostra e de 2,36% para a catequina na solução padrão e 1,36 % na solução amostra. Todos os resultados estão dentro do que é especificado pela resolução de validação para ácido gálico e catequina na solução padrão e na solução amostra preparada com o Sanativo® (DPR ≤ 5 %).

5.5.6.2 Precisão – Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada injetando seis determinações a 100 % da concentração teste, preparadas por dois analistas, em dois turnos diferentes de dois dias consecutivos, no mesmo CLAE, conforme apresentado na tabela 18 e 19.

Tabela 18 – Dados para precisão intermediária do ácido gálico

N	analista 1	analista 1	analista 2	analista 1	analista 1	analista 2
	dia 1 - 1	dia 1 - 2	dia 1 - 1	dia 2 - 1	dia 2 - 2	dia 2 - 1
1	96,04	95,30	99,14	98,48	98,15	97,75
2	95,69	95,07	98,49	98,31	97,29	97,30
3	98,43	95,99	98,49	98,00	97,64	97,60
4	98,38	95,55	98,59	98,15	98,10	97,31
5	96,02	95,50	98,31	97,78	98,57	97,20
6	95,86	95,59	98,38	95,59	98,60	97,44
Média %	96,74	95,50	98,57	97,72	98,06	97,43
DPR %	1,34	0,32	0,30	1,10	0,53	0,21

Calculando a média das médias da concentração (97,34 %) e o DP das médias (1,09) é possível verificar que a precisão intermediária é 1,18 %, valor este, baixo para uma matriz tão complexa quanto os fitoterápicos.

Tabela 19 – Dados para precisão intermediária da Catequina

N	analista 1	analista 1	analista 2	analista 1	analista 1	analista 2
	dia 1 - 1	dia 1 - 2	dia 1 - 1	dia 2 - 1	dia 2 - 2	dia 2 - 1
1	100,15	95,78	99,14	92,86	98,70	94,20
2	95,94	96,08	100,74	91,25	96,86	92,78
3	93,57	97,31	100,95	91,06	98,93	91,34
4	94,17	98,71	90,94	90,36	98,63	91,89
5	94,65	96,00	93,21	92,24	96,94	94,61
6	95,73	95,05	90,98	90,62	98,20	94,04
Média	95,70	96,49	96,00	91,40	98,04	93,14

Calculando a média das médias da concentração (95,13 %) e o DP (2,42) é possível verificar que a precisão intermediária é 2,54 %. Estando dentro do especificado, 5 %.

5.5.7 Exatidão

A exatidão do método foi verificada a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa (80 %), média (100 %) e alta (120 %), com 3 (três) réplicas cada. Os resultados encontram-se nas tabelas 20 e 21.

Tabela 20: Resultados obtidos na avaliação da exatidão para ácido gálico.

	Área - Padrão ACG	Área Amostra	Encontrado (% do esperado)
80 %	3460,30	3510,85	101,64
	3451,40	3499,15	101,30
	3451,00	3467,95	100,40
100 %	4357,20	4421,60	100,42
	4427,70	4395,05	99,82
	4423,90	4413,55	100,24
120%	5327,70	5296,30	99,38
	5326,40	5254,15	98,59
	5333,90	5241,15	98,35
Recuperação			100,02
DPR %			1,11

Tabela 21: Resultados obtidos na avaliação da exatidão para catequina.

	Área - Padrão CTQ	Área Amostra	Encontrado (% do esperado)
80 %	2649,20	2774,05	103,10
	2731,90	2765,30	102,78
		2766,75	102,83
100 %	3431,10	3564,75	102,38
	3502,40	3495,30	100,39
	3511,70	3498,90	100,49
120 %	4131,90	4118,20	99,80
	4120,10	4125,80	99,98
	4127,60	4130,70	100,10
Recuperação			101,32
DPR %			1,39

Após validação verificou-se que o método apresenta especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise (BRASIL, 2003).

5.6 DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES DE IDENTIDADE

Embora o método apresente aplicabilidade na rotina para o controle de qualidade dos produtos intermediários (macerados de *S. terebinthifolius* ou *P. colubrina*) alguma dificuldade pode ser vislumbrada no que tange a ausência de um marcador típico que permita o controle de qualidade de cada um dos macerados no produto acabado. Problema típico para produtos multidrogas e agravado pela inclusão em sua formulação de espécies, cujos empregos terapêuticos tradicionais estão associados à mesma classe de metabólitos secundários.

A análise comparativa dos cromatogramas da figura 35 revela um pico importante com tempo de retenção de aproximadamente 37 minutos que ocorre no macerado *P. colubrina* (Figura 35A), e que também apresenta as mesmas características no produto acabado (Figura 35C). Porém não é observado no macerado de *S. terebinthifolius* (Figura 35B).

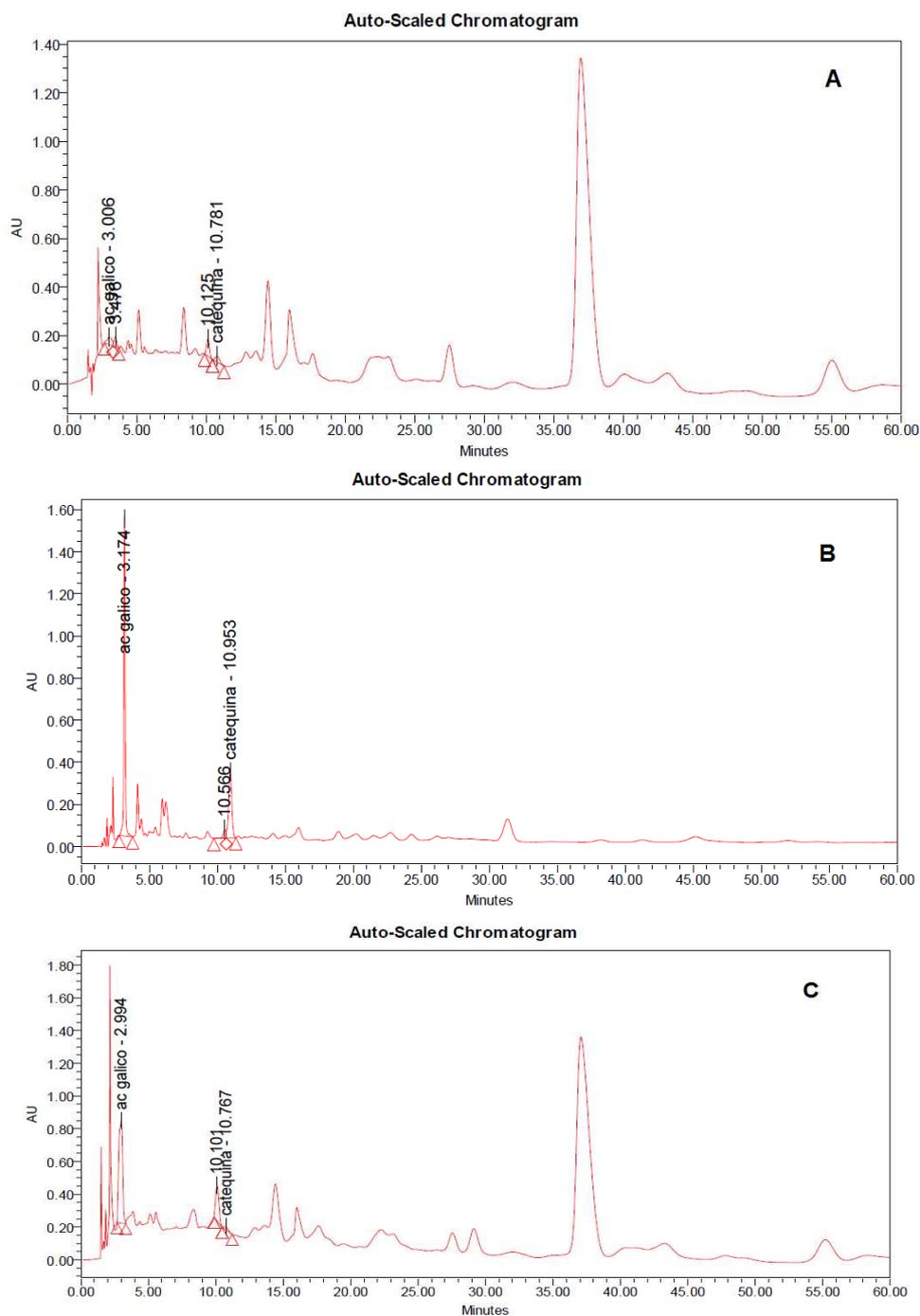


Figura 35 - Cromatogramas obtidos em 210 nm para as soluções extrativas de *P. colubrina* (A) e *S. terebinthifolius* (B); e, produto acabado (Elixir Sanativo®) (C).

Estudos ainda são necessários para confirmação da estrutura desta substância e sua utilização como marcador específico. Na figura 36 o espectro de UV do pico em questão.

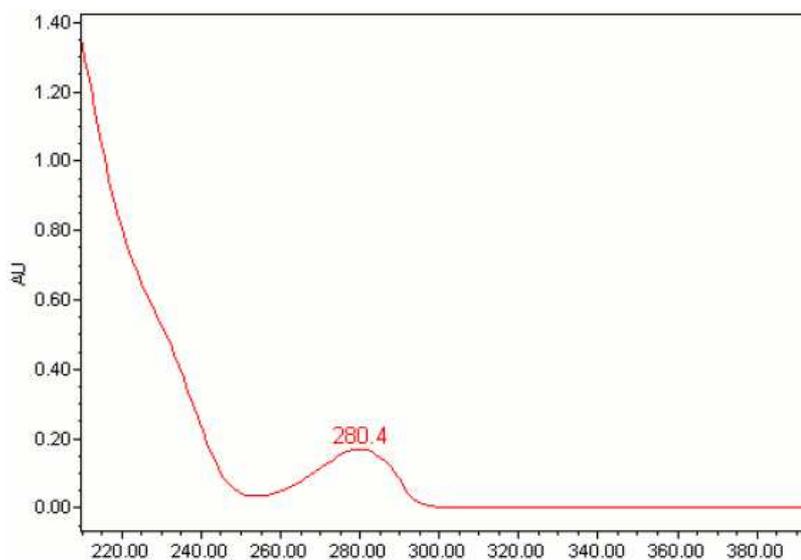


Figura 36 - Espectro de UV do pico com TR de 37 minutos, detectado em 210 ou 270 nm, e, presente no macerado de *P. colubrina* e no Elixir Sanativo®.

Diante da dificuldade em estabelecer um marcador específico para o macerado de *S. terebinthifolius*, foi desenvolvida nova análise cromatográfica empregando comprimento de onda de 340 nm, mais apropriado para compostos que apresentem cromóforo maior que o de taninos tais como agliconas flavonoídicas e seus heterosídeos.

Conforme esperado, a adoção de comprimento de onda de 340 nm não promoveu absorção por parte dos padrões de taninos empregados neste estudo. Os poucos sinais observados apresentaram intensidade que não puderam ser diferenciadas da variabilidade intrínseca do método (Figura 37).

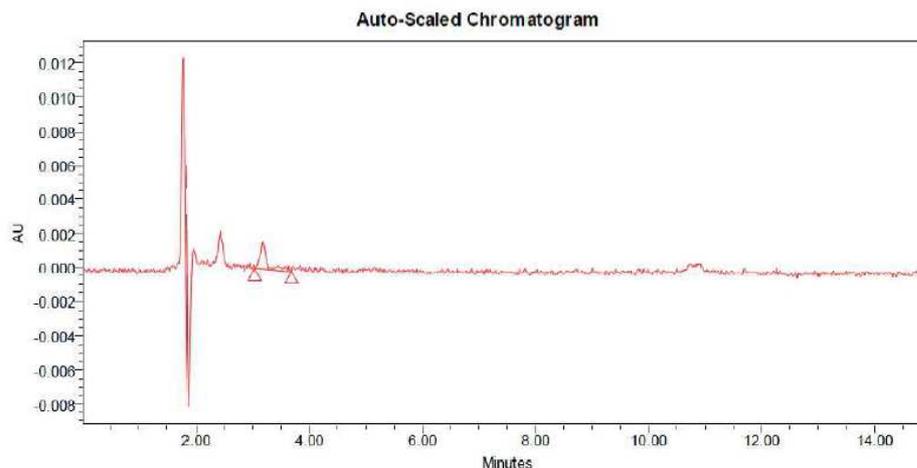


Figura 37 - Cromatograma para os padrões de ácido gálico e de catequina em 340 nm.

A comparação preliminar das áreas observadas em todas as condições experimentais está apresentada na tabela 21. Embora inferências acerca da concentração dos compostos ainda não possam ser realizadas, os dados permitem confirmar o incremento na sensibilidade quando adotado o comprimento de onda de 210 nm no lugar de 270 nm; assim como, a ausência de sinal para os padrões quando adotado o comprimento de onda de 340 nm para detecção.

Tabela 22. Áreas dos picos referentes aos marcadores observados nas diversas amostras e detectados em 210, 270 ou 340 nm.

λ (nm)	MARCADOR QUÍMICO					
	Ácido Gálico			Catequina		
	210	270	340	210	270	340
Amostras						
Extrato de <i>P. colubrina</i>	755696	80688	N.D.	565924	37506	N.D.
Extrato de <i>S. terebinthifolius</i>	10893958	4440198	N.D.	5162293	329898	N.D.
Elixir Sanativo [®]	12272928	4851039	N.D.	373529	177083	N.D.

N.D. – não detectável

A figura 38 apresenta os cromatogramas obtidos para as amostras em 340.

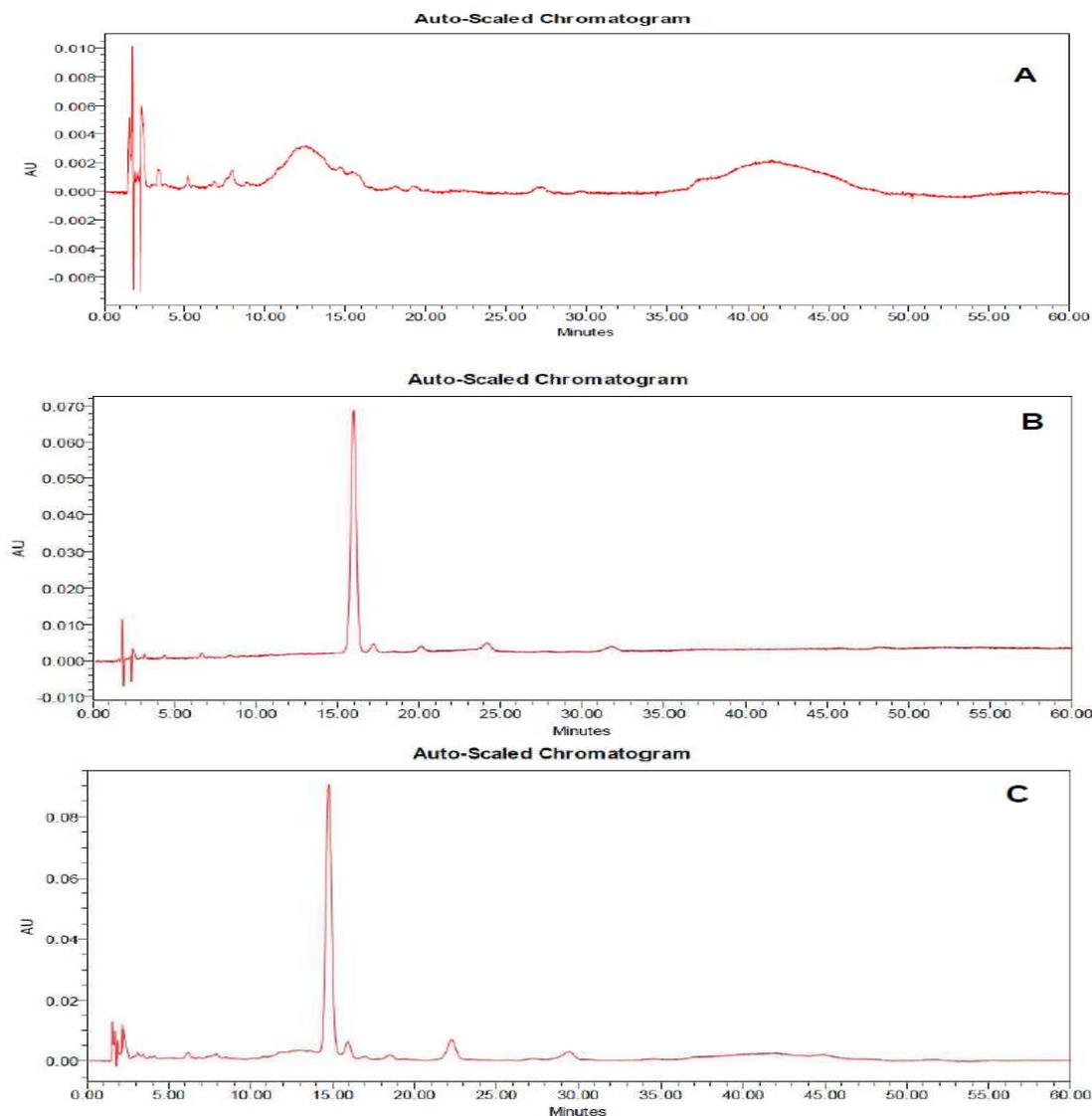


Figura 38 - Cromatogramas obtidos em 340 nm para as soluções extrativas de *P. colubrina* (A) e *S. terebinthifolius* (B); e, produto acabado (Elixir Sanativo[®]) (C).

A análise das amostras adotando comprimento de onda 340 nm revelou um pico que com tempo de retenção de cerca de 15 minutos que está presente apenas no macerado de *S. terebinthifolius* e no produto acabado, estudo ainda são necessários para identificação desse composto e sua identificação com marcador específico para o produto intermediário de *S. terebinthifolius* quando inserido no produto acabado. Na figura 39 apresentamos o espectro de UV para o pico.

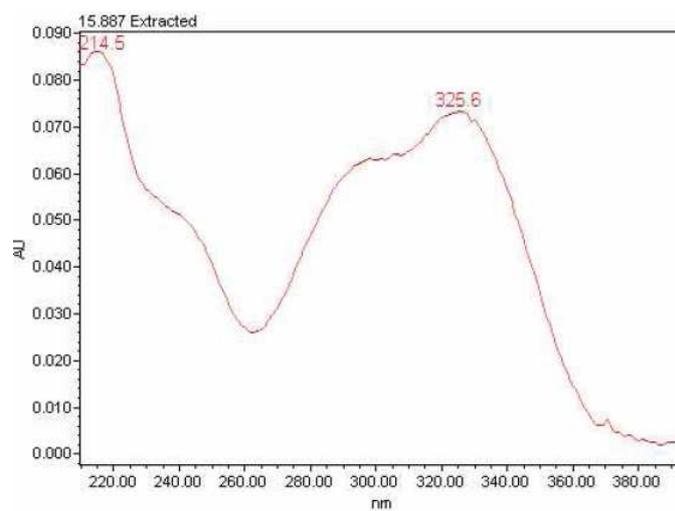


Figura 39 - Espectro de varredura do pico com TR de 15 minutos, detectado em 340 nm, e, presente no macerado *S. terebinthifolius* e no Elixir Sanativo®.



CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos é possível concluir que:

- A caracterização e avaliação da qualidade das drogas vegetais empregadas nestes estudos, determinação de água (11,86 e 10,48 %, para *S. terebinthifolius* e *P. colubrina*, respectivamente) e determinação de cinzas totais (11,3 e 8,2 %, para *S. terebinthifolius* e *P. colubrina*, respectivamente) estão de acordo com as especificações dos códigos oficiais;
- O medicamento fitoterápico Sanativo[®], apresentou parâmetros físico-químicos de acordo com os limites preconizados pela literatura específica. Ademais, foi detectado elevado rendimento em sólidos totais, característica favorável ao desenvolvimento de formas sólidas;
- Considerando a avaliação microbiológica, o medicamento fitoterápico Sanativo[®] foi aprovado no ensaio, indicando uma produção em condições assépticas e/ou poder antimicrobiano dos taninos presentes e constituintes majoritários;
- O método analítico desenvolvido apresentou um fator de retenção de 0,30 para o ácido gálico e 1,36 para catequina, resolução de 18,2, fator de cauda de 1,8 e 1,63, para ácido gálico e catequina, respectivamente e pratos teóricos acima de 2000. Todos esses fatores indicam uma separação adequada entre os picos e simetria dos picos, o que resulta em uma boa adequabilidade de sistema.
- O método se mostrou robusto quanto à velocidade do fluxo, temperatura de forno de coluna e diferentes colunas, contudo sugere que estes fatores sejam controlados.

- A linearidade para o ácido gálico e para catequina atende as especificações da RE 899 de 29 de maio de 2003, e o método foi considerado linear e atende uma faixa de 70 a 120% da concentração definida. Contudo a linearidade dos marcadores sofre interferência da matriz a 120%.
- O método apresenta reprodutibilidade e precisão intermediária adequadas com DPR% dentro do limite especificado.
- Os limites de detecção e de quantificação para ACG e CTQ foram de 3,25 e 0,863, e 9,57 e 2,55 µg/mL, respectivamente.
- A exatidão apresentou recuperação de 100,02 % e 101,32 % para ACG e CTQ, respectivamente.
- O método para quantificação de ácido gálico e catequina no medicamento fitoterápico Sanativo[®] esta validado.
- Os taninos parecem ser apropriados para o controle de qualidade das matérias-primas vegetais produtos intermediários derivados das espécies vegetais estudadas.
- A investigação de marcadores alternativos e específicos para cada droga revelou a possibilidade da identificação de composto a ser utilizado como marcador de *P. colubrina* e um marcador para *S. terebinthifolius*.
- O desenvolvimento de marcadores específicos será fundamental a purificação e elucidação estrutural dos mesmos, uma vez que correspondem à única alternativa para acompanhamento de estudo de estabilidade da composição química durante todo ciclo produtivo sem sofrer interferência de outros componentes da formulação.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F. Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos – Paraíba, Brasil. PNE, p.112, 1996.

AMORIN, M.M.R.; SANTOS, L.C. Tratamento de vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. *Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia*, v. 25, p. 95-102, 2003.

ANDRADE Jr, R.G.; GINANI, J.S.; LOPES, G.K.B.; DUTRA, F.; ALONSO, A.; HERMES-LIMA, M. Tannic acid inhibits in vitro iron-dependent free radical formation. *Biochimie*, v. 88, p. 1287-1296, 2006.

AMSEL, R.; TOTTEN, P.A.; SPIEGEL, C.A.; CHEN, K.C.; ESCHENBACH, D.; HOLMES, K.K; Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *American Journal Medical*, v. 74, p.14-22, 1983.

AQUINO NETO, F.R. e NUNES, D.S.S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO. M. C. C; BISPO, M. S.; Ferreira, S. L. C.; Andrade, J. B. Multivariate optimisation of the experimental conditions for determination of three methylxanthines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Talanta*, v. 67, p. 1007-1013, 2005.

ARRUDA, V. M. Avaliação farmacológica das atividades anti-inflamatórias, analgésica e anti-ulcerogênica do fitoterápico Sanativo. Dissertação. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

ARAÚJO, E.L. Aroeira da praia – Estudo farmacognóstico e da atividade biológica de *Schinus terebinthifolius*, Raddi (Anacardiaceae). Dissertação de Mestrado do Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE, Recife, 2002.

BALBACH, A. A Flora Nacional na Medicina Doméstica, v. 1, São Paulo. Editora M.V.P., p. 369,1984.

BALENTINE, D.A.; WISEMAN, S.A.; BOUWENS, L.C.M; The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.37, p. 693–704, 1997.

BANDARANAYAKE, W.M.; Quality Control, Screening, Toxicity, and Regulation of Herbal Drugs. *Modern Phytomedicine*, p. 25-57, 2006.

BERTOLDI, M.C. Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus Terebinthifolius* Raddi). Tese. Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

BERTOL, G. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade de matérias-primas e produto contendo uncaria tomentosa (willd.) dc. – rubiaceae. Curitiba, Dissertação. Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Paraná.

BORIO, E. B. L.; CECY, C.; YASSUMOTO, Y. Contribuição ao estudo farmacognóstico da casca do caule da aroeira *Schinus terebinthifolius* Raddi – Anacardaceae. *Ciência e Cultura*. v.25, p. 631-634, 1973.

BRAGA, R. A. Plantas do nordeste, especialmente do Ceará, *Imprensa oficial*, Fortaleza, 2ª ed., p 540, 1960.

BRASIL, 2003. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RE N.º 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

BRASIL, 2010a. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 10 de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências.

BRASIL, 2010b. Fundação Oswaldo Cruz, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, e.5, v. 1, Atheneu, Brasília.

BRUNETON, J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. *Lavoisier Technique and Documentation*. Paris. 2 ed., 1993.

BUCHI, D.F.; SOUZA, W. Internalization of surface components during Fc-receptor mediated phagocytosis by macrophages. *Cell Structure Function*, v.18, p. 399-407, 1993.

BUDAVARI, S. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 12 ed. Whitehouse Station, N.J.: Merck & Co, Inc, 1996.

BULHÕES. G.C.C.; SILVA, A.M.N.; SÁ, M.A.M. Abordagem Fitoquímica de Plantas Nativas do Nordeste Brasileiro. *Anais da Faculdade de Farmácia, UFPE*, v. 15, p.33-38, 1976.

BURGESS, C.; O'DONOHUE, A.; GILL, M. Agony and ecstasy: a review of MDMA effects and toxicity. *European Psychiatry*. v.15, p. 287-294, 2000.

CAMPELO, J.P.; MARSOIOLI, A.J. Terebentifolic acid and bauerenone: new triterpenoid ketones from *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, v.14, p. 2300, 1975.

CARLINI, E.A.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 2, p.140-146, 2010.

CAVALHER-MACHADO, S.C; ROSAS, E.C.; BRITO, F.A.; HERINGE, A.P.; OLIVEIRA, R.R.; KAPLAN, M.A.C.; FIGUEIREDO, M.R.; HENRIQUES. M.G.O.M. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *International Immunopharmacology*, v.8, p. 1552-1560, 2008.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P .S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n. 2, p. 314 -319, 2008.

CARVALHO, M. G.; FREIRE, F. D.; RAFFIN, N. F.; ARAGÃO, C. F. S.; MOURA, T. F. A. L. LC Determination of gallic acid in preparations derived from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Chromatographia*, v. 69, s, p. 249-253, 2009.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos: Estratégias e Validação. Editora Eduscar, p.77, 2001.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analyses - Viewpoint and discussion. *Journal Chromatography, B*, v. 689, p. 175-180, 1997.

CERUKS, M.; ORIANA, P.R.; FÁVERO, A.; LAGO, J.H.G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (anacardiaceae), *Química Nova*, v.30, p. 597-599, 2007.

CHANDRAN, S.; SINGH, R. S. P. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie*, v. 62, p. 4-14, 2007.

CHUNG, K. T.; WONG, T. Y.; WEI, C-I.; HUANG, Y-W.; LIN, Y. Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 38, s. 1, p. 421-464, 1998.

CIOLA, R. Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC. São Paulo: Edgard Blücher, 1998.

COUTINHO, I.H.I.L.S.; TORRES, O.J.M.; MATIAS, J.E.F.; COELHO, J.C.U.; STAHLKE JÚNIOR, H.; AGULHAM, M.A.; BACHLE, U.; CAMARGO, P.A.M.; PIMENTEL, S.K.; DE FREITAS, A.C.T. Efeito do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 21, s.3, p. 50-54, 2006.

CORRÊA, P. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil. Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, v.5, 1978.

CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. IBDF, v.6, 1984.

CRUZ, G.L. Aroeira In: *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*, 2º Ed., Rio de Janeiro, p. 70-72, 1982 .

DALCIN, E. Base de dados sobre árvores ornamentais. 2001. Disponível em: <http://juazeiro.cnip.org.br/edalcin/arvores/taxa/428.shtml>. Acesso em: 05 agosto de 2009.

DALLUGE, J.J; NELSON, B.C.; Determination of tea catechins. *Journal of Chromatography A*, v.881, p. 411-424, 2000.

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A.J. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemistry and Systematic Ecology*, v. 27, p. 445-459, 1999.

DE MELO JÚNIOR, E.J.M.; RAPOSO, M.J.; LISBOA NETO, J.A.; DINIZ, M.F.A.; MARCELINO JÚNIOR, C.A.C.; SANTANA, A.E.G. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats. Microbiological and microscopic analysis. *Phytomedicine*, v.9, p. 109-116, 2002.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R.J. dos. Propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Visão Acadêmica*, Curitiba, v.5, n. 2, p. 83-90, 2004.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, N.R.M. Atividade Antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. In: *Ciências. Agrotecnicas*, Lavras, v. 29, n. 3, p. 617-622, 2005.

DELGOBO, C. L., GORIN, P. A., TISCHER, C. A., IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. *Carbohydrate Research*, v 320, p. 167-175, 1999.

DESMARCHELIER, C.; LISBOA, R. R.; COUSSIO, J., CICCIA, G.; Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the “Caatinga” region in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 67, p. 69-77, 1999.

DE SOUZA, T.P. Desenvolvimento tecnológico e otimização de formas farmacêuticas sólidas contendo alto teor de produto seco por asperção de *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). Porto Alegre, 2004. Tese de doutorado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DRASARA, P.; MORAVCOVA, J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. *Journal Chromatography B*, v. 812, p. 3-21, 2004.

DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on health promotion properties of tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 12, p. 404-421, 2001.

EMEA. The European Medicines Agency: *Guidelines on Quality of Herbal Medicinal Products/Traditional Medicinal Products*, EMEA/CVMP/81400 Review. London, 2005.

EMEA. The European Medicines Agency: Reflection paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products. *Doc. Ref. EMEA/HMPC/253629/2007*, London, 2008.

ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C. Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. *Journal of Chromatography A*, v. 897, p. 161-170, 2000.

FARAG, S.F. Polyphenolic compounds from the leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Journal Pharmaceutical Science*, v. 31, p. 319-329, 2008.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., DE MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2000.

FEBRAFARMA. Fitoterápico atrai investimentos. Disponível em: <http://www.febrafarma.org.br/areas.php?area=pu&secao=38&modulo=materias>. Acesso em agosto de 2007.

FERREIRA, M. S. Otimização de solução extrativa e desenvolvimento tecnológico de produto seco por asperção de *Psidium guajava* L. Natal, 2009. Dissertação. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

FISH, M.S.; JOHNSON M.N.; HORNING, E.C. Tertiary-amine oxide rearrangements. *Journal of the American Chemical Society*, v. 78, p. 3668-3671, 1956.

FRANCISCO, M.L.DL., RESURRECCION, A.V.A. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. *Food Chemistry*, v. 117, n. 2, p. 356-363, 2009.

GARCIA, L.C.; NOGUEIRA, A.C.; ABREU, D.C.A. Influência do envelhecimento acelerado no vigor de sementes de *Anadenanthera colubrina*. *Ciência Florestal*, v.14, n.1, p. 85-90, 2004.

GENNARO, A. R. Remington Farmácia. ed. 19, vol. 2, Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1999.

GIL, E.S.; Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. 2ª Ed. São Paulo. Pharmabooks, 2007.

GRAHAM. H.N. Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, v. 21, p. 334-350, 1992.

GRUENWALD, J.; BRENDLER, T.; JAENICKKE, C.; Physicians desk references (PDR) for herbal medicines. *Medical Economic Co*, p. 858, 2000.

GUNDIDZA, M; GWERU, N.; MAGWA, M.L.; MMBENGWA, V.; SAMIE, A. The chemical composition and biological activities of essential oil from the fresh leaves of *Schinus terebinthifolius* from Zimbabwe. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 24, p. 7164-7169, 2009.

GUTIERREZ-LUGO, M. T.; DESCHAMPS, J. D.; HOLMAN, T. R., SUAREZ, E.; TIMMERMANN, B. N. Lipoxygenase inhibition by Anadanthoflavone, a new flavonoid from the arial parts of *Anadenanthera colubrine*. Letter. *Planta Médica*. v. 70, p. 263-265, 2004.

GUYOT. S.; MARNET. N.; LARABA. D.; SANONER. P.;DRILLEAU. J.F. Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a french cider apple variety (*Malus domestica* var. Kermerrien). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 1698-1705, 1998.

HAGERMAN, A. E.; RIEDL, K. M., JONES, J. A., SOVIK; K. N.; RITCHARD, N. T.; HARTZFELD, P.W. High molecular weight plant polyphenolics (Tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, n.5, p. 1887-1892, 1998.

HARNLY, J. M.; BHAGWAT, S.; LIN, L.-Z. Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, v. 389, n.1, p.47–61, 2007.

HASLAM, E. Plant Polyphenols. Vegetable Tannins Revisited. Cambridge University Press, Cambridge, p. 90-117, 1989.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, v. 59, p. 205-215, 1996.

HASLAM, E.; CAI, Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural Products Reports*, v. 11, n. 1, p. 41-66, 1994.

HATTORI, T.; KUSUMOTO, L.T.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl transferase from *Streptococcus mutans*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 38, p. 717-720, 1990.

HERGERT, H. L. Economic importance of flavonoid compounds; wood and bark. In: *The chemistry of flavonoid compounds*. New York: *The Macmillan Company*, p. 553-595, 1962.

HILL, J.O.; KORSE, S.; LIM, S.; SCOLLARY, G.R.; A thermometric enthalpy titration (TET) study of some Australian wines. *Thermochimica acta*. v. 209, p. 301-311, 1992.

HILLIS, W. E. The distribution and formation of polyphenols within the tree. In: *Wood extractives and their significance to the pulp and paper industry*. New York: *Academic press*, p. 60-131, 1962.

HOLLMAN, P.C H.; HERTOOG, M.G.L.; KATAN, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, v. 57, p. 43-46, 1996.

HOEPFNER, E.M.; RENG, A.; SCHIMIDT, P.C. Fiedler Encyclopedia of excipients for Pharmaceutical, Cosmetics and Related Area. 5 ed, v. 2, 2002.

HOSTETTMANN, K., WOLFENDER, J. L., RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Medica*, v. 63, p. 2-10, 1997.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. Oberkirch, 2001. Disponível em: <http://www.labcompliance.com/solutions/free_literature.aspx?sm=b_d>. Acesso em: 11/07/2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE HARMONIZATION (ICH). Validation of analytical procedures. Text and Methodology - Q2(R1). Geneva, 2005. Disponível em: <www.bioforum.org.il/Uploads/Editor/karen/q2_r1_step4.pdf>. Acesso em: 11/03/2009.

INOUE, M.; SUZUKI, R.; KOIDE, T.; SAKAGUCHI, N.; OGIHARA, Y.; YABU, Y.; Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 204, n. 2, p. 898-904, 1994.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, v. 29, n. 1, p. 81-96, 2008.

IVANOVIC, D.; MEDENICA, M.; NIVAUD-GUERNET, E.; GUERNET, M. Effect of pH on the retention behaviour of some preservatives-antioxidants in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, v. 40, p. 652-656, 1995.

KASSEM, M. E. S.; EL-DESOKY, S. K.; SHARAF, M. Biphenyl esters and biflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. *Chemical Nature Compounds*, v. 40, n.5, p. 447-450, 2004.

KRAAL, P.; JANSEN, B.; NIEROP, K.G.J.; VERSTRATEN, J.M. Copper complexation of tannic acid in aqueous solution. *Chemosphere*, v. 65, p. 2193-2198, 2006.

KEINAMEN, M.; JULKUNN-TIITTO, R. High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. *Journal of Chromatography A*, v. 793, p. 370-377, 1998.

KOIDE, T.; NOSE, M.; YABU, Y.; OHTA, N. Trypanocidal effects of gallic acid and related compounds. *Planta Medica*, v. 64, p. 27-30, 1998.

KROES, B.H.; VAN DEN BERG, A.J.J.; QUARLES VAN UFFORD, H.C.; VAN DIJK, H.; LABADIE, R.P. Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta Medica*, v. 58, n. 6, p. 499-504, 1992.

KROGH, R.; TUNES, R.A.; ANDRICOPULO, A.D.; Structure-activity relationships for the analgesic activity of gallic acid derivatives. *Il Farmaco*, v.55, p. 730-735, 2000.

JAIN, M.K.; YU, B.Z.; ROGERS, J.M.; SMITH, A.E.; BOGER, E.T.A.; OSTRANDER, R.L.; RHEINGOLD, A.L. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase a 2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, v. 39, n.3, p. 537-547, 1995.

JARDIM, I.C.L.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos da Cromatografia. Campinas, SP, Editora Unicamp, p. 273-397, 2006.

JENKE, D.R.; Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. Part II. Guidelines for primary validation parameters. *Instrumentation Science and Technology*, v.26, p. 19-35, 1998.

JORGE, L. I. F., MARKMANN B. E. O. Exame químico e microscópico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira). *Revista de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 17, p. 139-145, 1996.

LAMPE, K.F.; FAGERSTROM, R. Plant Toxicity and Dermatitis. Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1968.

LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Carlos: Editora RIMa, 2004.

LEE, H. S. HPLC analysis of phenolic compounds. *Food analysis by HPLC*, Ed. 2. New York, Marcel Dekker Inc, 2000.

LEITE, F. Validação em análise química. 5 ed. Campinas: Editora Átomo, 2008.

LENZI, M.; ORTH, A.I. Characterization of the functional reproductive system of the pink-pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 26, n. 2, p. 198-201, 2004.

LI, S.; HAN, Q.; QIAO, C.; SONG, J.; CHENG, C.H.; XU, H. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese Medicine*, v. 3, n. 7, p. 1-16, 2008.

LIMA, L. R.; XAVIER, S. H.; MEIRA, J. L.; ROLIM NETO, P. J. Development and validation of the gravimetric quantification of the glucoside resin in phytomedicine containing *Operculina macrocarpa* (L.) Urban. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, v. 16, n. 4, 2006a.

LIMA, C. R.; COSTA-SILVA, J. H.; LYRA, M. M. A.; ARAÚJO, A. V.; ARRUDA, V. M.; DIMECH, G. S.; EVÊNCIO, L. B.; FRAGA, M. C. C. A.; LAFAYETTE, S. S. I.; WANDERLEY, A. G. Atividade cicatrizante e estudo toxicológico pré-clínico do fitoterápico Sanativo®. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 25, p. 544-549, 2006b.

LIMA, L.B.; VASCONCELOS, C.F.B; MARANHÃO, H.M.L.; LEITE, V.R.; FERREIRA, P.A.; ANDRADE, B.A.; ARAÚJO, E.L.; XAVIER, H.S.; LAFAYETTE, S.S.L.; WANDERLEY, A.G. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 126, p. 468-473, 2009.

LINDEN, R.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. P.; BASSANI, V. L. Response surface analysis applied to the preparations of tablets containing a high concentration of vegetable spray-dried extract. *Drug Development and Industry Pharmacy*, v. 26, p. 441-446, 2000.

LIU, M.; LI Y.; CHOU, G.; CHENG, X.; ZHANG, M.; WANG, Z. Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb *Radix Salviae Miltiorrhizae*. *Journal Chromatography A*, v. 1157, p. 51-55. 2007.

LLOYD, H. A.; JAOUNI, T. M.; EVANS, S. L.; MORTON, J. F. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, v.16, p.1301-1302, 1997.

LONGHINI, R. Avaliação de interações do ácido gálico frente a adjuvantes empregados em formas farmacêuticas sólidas. Dissertação. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2 ed. São Paulo: Editora Onstituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2008.

LUCENA, P.L.H.; RIBAS FILHAS, J.M.; MAZZA, M.; CZECZKO, N.G.; DIETZ, U.A.; CORREA NETO, M.A.; HENRIQUES, G.S.; SANTOS, O.J.; CESCHIN, A.P.; THIELE, E.S. Avaliação da ação da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 21, p. 46-51, São Paulo, 2006.

MAIA, G.N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. 1ed., p. 413, São Paulo, 2004.

MALIK, M.S., MAHMUD, S., SATTER, A., Studies on the essential oil of *Schinus terebinthifolius*. *Science International* (Lahore), v. 6, p. 351–352, 1994.

MATOS, F. J. A. Farmácias vivas. 4ªed, Fortaleza: Imprensa Universitária, 2002.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 3 ed, Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.

MARTINEZ MJ, GONZALEZ AN, BADELL BJ. Actividad antimicrobiana del *Schinus terebinthifolius* Raddi(copal). *Revista Cubana Plantas Medicinai*s, v. 1, n. 3, p. 37-9, 1996.

MARTORELLI, S.B.F.; PINHEIRO, A.L.B.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; BRAVO, F. Efeito anti-inflamatório e cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (AROEIRA) a 30% em orobase – estudo “*in vivo*”. *International Journal of Dentistry*, v.10, p.80-90, 2011.

MARSTON A, HOSTETTMANN K 1985. Review article number 6: Plants moluscicidas. *Phytochemistry*, v.24, p.639-652, 1985.

MEDAL, J.C., VITORINO, M.D., HABECK, D.H., GILLMORE, J.L., PEDROSA, J.H., DE SOUSA, L.P. Host specificity of *Heteroperreyia hubrichi* Malaise (*Hymenoptera: Pergidae*) a potential biological control agent of Brazilian Peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Biological Control*, v. 14, p. 60-65, 1999.

MEDEIROS, K.C.P., MONTEIRO, J.C., DINIZ, M.F.F.M., MEDEIROS, I.A., SILVA, B.A., PIUVEZAM, M.R.. Effect of the activity of the brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Raddi in inflammatory models. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, p. 23-28, 2007.

MÉNDEZ, C. D. M. V.; FORSTER, M. P.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A.; RODRÍGUEZ, E. M.; ROMERO, C. D. Content free compounds in bananas from Tenerife (Canary Islands) and Ecuador. *European Food Research in Technology*, v. 217, n. 4, p. 287-290, 2003.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48; n. 3, p. 577–599, 2000.

METCHE, M. Tanins, nature et propriétés, Groupe Polyphénols. Nancy, v. 10, p. 11-32, 1980.

MIGLIATO, K.F.; MOREIRA, R.R. D.; MELLO, J.C. P.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORREA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Controle de Qualidade do Fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007.

MIYAUCHI, Y.; YOSHIMOTO, T.; MINAMI, K. Extractives of heartwood. Extractives from the heartwood of *Piptadenia colubrine* sp. *Mokuzai Gakkaishi*, v. 22, n. 1, p. 47-50, 1976.

MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; AMORIM, E. L. C.; ARAUJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. *Revista Árvore*, v. 29, p. 999 -1005, 2005.

MORETÃO, M. P.; BUCHI, D. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of an acid heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. *Immunology Letters*, v. 89, p.175-185, 2004.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. Medicinal plants of Brazil. Michigan: Reference Publications, p. 501, 2000.

MORTON, J.F. Brazilian pepper – its impact on people, animals and the environment. *Economic Botany*, v. 32, p. 353-359, 1978.

MOURELLE, J.A.F., CAO, M.C.F.L., RODRÍGUEZ, F.M., GUTIÉRREZ, Z.P., Actividad anti-inflamatoria del *Schinus terebinthifolius* (Copal) en ratas. *Revista Cubana de Farmacia*, v. 27, p. 139–144, 1993.

MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, v. 91, n. 1, p. 3-20, 2001.

NASCIMENTO, T. G. Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para quantificação simultânea de fármacos em plasma humano. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba, 2004.

NETTO, E.M.; SHUQAIR, N.S.M.S.A.Q.; BALBINO, E.E.; CARVALHO, A.C. Comentários sobre o Registro de Fitoterápicos. *Revista Fitos.* v. 1, n. 3, p. 9-17, 2006.

NGOKWEY, N. Home remedies and doctors' remedies in Feira (Brazil). *Social Science and Medicine*, v.40, n. 8, p. 1141-1153, 1995.

NIEMETZ, R.; GROSS, G.G.G. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry*, v. 66, p. 2001- 2011, 2005.

NOZELLA, E.F. Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes. Dissertação - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo, p. 58, 2001.

OKUDA, T., YOSHIDA, T., HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry*, v. 32, p. 507-521, 1993.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu, 1998.

OLIVEIRA, A.B., BRAGA, F.C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. *Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica*, v. 1, p. 49-58, 2003.

OLIVEIRA, M.A.C. Fitoterápico: Perfil Fitoquímico, Controle e Validação da Metodologia Analítica. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE, Recife, 2005.

OLIVEIRA, A.H.; BERRETTA, A.A. Avaliação da qualidade de insumos farmacêuticos a base de calêndula e própolis utilizados pelas farmácias magistrais. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 4, n. 2, p. 169-174, 2007.

OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZITUMANI, A.; SOBUE, S.; FIJIWARA, T. KABAWATA, S.; HAMADA, S. Oolong tea poluphenols inhibit experimental dental

caries in SPF rats infected with *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, v. 27, p.124-129, 1993.

PAULO, P.T.C; DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A; MORAIS, L.C.S.L.; ANDRADE, B.B.; SANTOS, H.B. Ensaio clínicos toxicológicos, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 1A, p. 68-76, 2009.

PACHTER I. J., ZACHARIAS, D. E., RIBEIRO, O. Indole Alkaloids of *Acer saccharinum* (the Silver Maple), *Dictyoloma incanescens*, *Piptadenia columbrina*, and *Mimosa hostilis*. *Journal Organic Chemistry*, v. 24, p. 1285-1287, 1959.

PECKOLT T. Aroeirinha: Congresso Médico Brasileiro. *Revista Flora Medicinal*, v .5, p. 3-20, 1939.

PERTUZATTI, P. B.; JACQUES, A. C.; BARCIA, M.T.; SGANZERLA, M.; SANTANNA, L. A. ; ZAMBIAZI, R. C. . Quantificação de taninos condensados e hidrolisados na casca e polpa de Mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). In: XVII Congresso de Iniciação Científica/ X Encontro de Pós-Graduação, 2008, Pelotas. XVII Congresso de Iniciação Científica/ X Encontro de Pós-Graduação, 2008.

PESSOA, W.S. Avaliação do Elixir Sanativo[®] sobre o processo de alveolite dental induzida em ratos (*Rattus novergicus albinus*). Recife, 2008. Dissertação. Mestrado em Patologia - Universidade Federal do Ceará.

PESSUTO, M.B.; COSTA, I.C.; SOUZA, A.B.; NICOLI, F.M.; MELLO, J.C.P. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reiss. *Química Nova*, v.32, p. 412-416, 2009.

PETROVICK, P.R.; GONZALEZ ORTEGA, G.; BASAN, V.L. From a Medicinal Plant to a Pharmaceutical Dosage form. A (Still) Long Way for the Brazilian Medicinal Plants. *Ciência e Cultura*, v. 49, p. 364- 369, 1997.

PETRY, R. D. Desenvolvimento e validação de métodos de doseamento de flavonóides de *Passiflora edulis* Sims. (maracujá). Porto Alegre, 1999. Dissertação. Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional; Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1926-1978, v.1.

PISO, G. História natural e médica da Índia Ocidental. Trad. Mário Lobo Leal. Rio de Janeiro IMEC/INL, 1957.

PIZZI, A. Tanin-Based adhesives. In: PIZZI, A. (ed) wood adhesives: *Chemistry and technology*, New York, Marcel Dekker, p. 177-246, 1993.

PORTO, P.A.L.S. Estudo da Actividade Antioxidante de Catequinas e Procianidinas Oligoméricas. Dissertação, Mestrado em Química, Faculdade Ciências do Porto, 2002.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. Técnica farmacêutica e farmácia galênica. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa. 3º ed, v. II, p. 183-207, 1990.

QUEIROZ, C.R.A.A.; MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). *Revista Árvore*, v. 26, n.4, 2002.

RAMESH, H.P.; YAMAKI, K.; TSUHIDA, T. T. Effect of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. *Carbohydrate Polymers*, v. 50, p. 79-83, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n.5, 2004.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A.M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v 15, n.1, p.65-70, 2005.

RITCHEY, J G.; WATERHOUSE, A.L. A standard red wine: monomeric phenolic analysis of commercial cabernet sauvignon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 50, p.91-100, 1999.

RICHTER, R.; REUB, S.W.V.; KÖNIG, V.W.A. Spirocyclopropane-type sesquiterpene hydrocarbons from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Phytochemistry*, v. 71, p. 1371-1374, 2010.

ROBISON, M. M; ZHANG, X. The world medicines situation 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges. WHO, 3 ed., 2011.

RUIZ, A.R.; TORRE, R.A.; ALONSO, N.; VILLAESCUSA, A.; BETANCOURT, J.; VIZOSO, A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidans*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.52, p. 123-127, 1996.

SAKAGAMI, H.; KURIBAYASHI, N.; IIDA, M.; SAKAGAMI, T.; TAKEDA, M.; FUKUCHI, K.; GOMI, K.; OHATA, H.; MOMOSE, K.; KAWAZOE, Y.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Induction of DNA fragmentation by tannin and lignin-related substances. *Anticancer Research*, v.15, p. 2121-2128, 1995.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: Simões, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. BALBACH, A. As plantas curam. São Paulo: EDEL, Brasil, p. 108–109, 1986.

SANTOS, C.A.M. Plantas medicinais: herbarium, flora et scentia. São Paulo: Ícone, 1988.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, p.615-656, 2004.

SANTOS, S.B.S; LIMA, A.C.A; MELO, A.R.S.; FRAZÃO, C.S.; CHERPAK, G.L. Comparação da eficácia da aroeira oral (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com omeprazol em pacientes com gastrite e sintomas dispépticos: estudo randomizado e duplo-cego. *Gastrenterologia Endoscopia Digestiva*, v.29, n.4, p. 118-125, 2010.

SARSUR NETO, J. M.; LISBOA, S. M.; BRANDÃO, M. G. L.; COELHO, M. M. Avaliação farmacológica preliminar do extrato liofilizado de angico (*Piptadenia colubrina* Bth) / Preliminary pharmacologic evaluation of freeze-dried extract of angico (*Piptadenia colubrina* Bth). *Revista de Farmácia e Bioquímica*, v. 42, p. 31-42, 1989.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., DE MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS / Editora UFSC, 2004.

SCHMOURLO, G. MENDONÇA, A.F; ALVIANO, C.S.; COSTA, S.S. Screening of antifungal agentes using etanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, p. 563 -568, 2005.

SESSO, H.D., GAZIANO, J.M., BURING, J.E. AND HENNEKENS, C.H. Coffee and tea intake and the risk of myocardial infarction. *American Journal Epidemiology*, v.149, p.162-167, 1999.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 57-66, 2003.

SKOOG, D.A. Princípios de análise instrumental. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SKOPP, G.; SCHWENKER, G. Biflavonoids from *Schinus terebenthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Zeitschrift für Naturforschung B*, v. 41, n. 11, p. 1479-82, 1986.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L.; *Practical HPLC method development*. 2th ed. New York: John Wiley & Sons.1997.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., DE MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS / Editora UFSC, 2004.

SINGH, A.K., SINGH, L., GUPTA, K.C., BROPHY, J.J., Essential oil of leaves and inflorescence of *Schinus terebinthifolius*: an exotic plant of India. *Journal Essential Oil Research*, v. 10, p. 697-699, 1998.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes, *Revista de Nutrição*, v. 15, n.1, p. 71-81, 2002.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P.R. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2000.

SOONG, Y.Y.; BARLOW, P.J. Isolation and structure elucidation of compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, v. 1085, p. 270-277, 2006.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N; PIETRO. R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, p. 435-440, 2010.

STAHL, E., KELLER, K., BLINN, C., Cardanol, a skin irritant in ink pepper. *Planta Medica*, v. 48, p. 5-9, 1983.

STASI DI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*, v. 73, n. 1, p. 69-91, 2002.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Analytical method development and validation. New York: Marcel Dekker, 1997.

TOKARNIA, C.H., PEIXOTO, P.V., BRITO, M.F., DUARTE, M.D., BRUST, L.A.C. Estudos experimentais com plantas cianogênicas em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 19, p. 84-90, 1999.

TRUGILHO, P. F.; CAIXETA, R.P.; LIMA, J. T.; MENDES, L.M. Avaliação do conteúdo de taninos condensados de algumas espécies típicas do cerrado mineiro.

Revista Cerne; 1997. Disponível em:<<http://www.dcf.ufla.br/cerne/revistav3n1-1997/Publica%c3%87%c3%830.doc>> Acesso em: 19 de setembro de 2009.

VALLADÃO, D. M. S.; IONASHIRO, M.; NETTO, J. Z. Determinação de fármacos diuréticos em associação por cromatografia em camada delgada e espectrofotometria. *Química Nova*, v. 31, n. 1, p. 44-48, 2008.

VERZA, S.G.; KREINECKER, M. T.; REIS, V; HENRIQUES, A.T; ORTEGA, G.G. Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. *Química Nova*, v. 30, n. 4, p. 815-820, 2007.

VESSMAN, J.; STEFAN, R.I.; STADEN, J F.V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D.T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H.; Selectivity in analytical chemistry, *Internacional Union of Pure and Applied Chemistry*, v. 73, p. 1381-1386, 2001.

WANG, H.; HELLIWELL, K., YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food Chemistry*, v. 68, p.115 -121, 2000.

WANG, Y.; YANG, X.; LI, K., LI, C.; LI, L.; LI, J.; HUANG, H.; HE, Y.; YE, C.; SONG, X. Simultaneous determination of theanine, gallic acid, purine alkaloids, catechins, and theaflavins in black tea using HPLC. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 45, p.1263–1269, 2010.

WATSON, D.G. *Pharmaceutical analysis*, Livingstone: Churchill, 1999.

WAY, T.D., LIN, H.Y., HUA, K.T., LEE, J.C., LIE, W.H., LEE, W.H., SHUANG, C.H.; LIN, J.K. Beneficial effects of different tea flowers against human breast cancer MCF-7 cells. *Food Chemistry*, v. 114, p. 1231-1236, 2009.

WELLS, J.I. *Pharmaceutical Preformulation*, Chichester: Ellis Horwood, Nova York, John Willey, 1988.

YANG, C.; LANDAU, J. Effects of tea consumption on nutrition and health. *Journal Nutrition*, v. 130, p. 2409-2412, 2000.

ZUO, Y. CHEN, H., DENG, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, v. 57, p. 307- 316, 2002.