



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MONIZE SANTOS PEIXOTO

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE
EXTRATO SECO PADRONIZADO À BASE DE *BAUHINIA FORFICATA* LINK**

RECIFE

2012

MONIZE SANTOS PEIXOTO

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE
EXTRATO SECO PADRONIZADO À BASE DE *BAUHINIA FORFICATA* LINK**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas na área de concentração: Produção e controle de qualidade de Medicamentos.

Orientador: Profa. Dra. Miracy Muniz de Albuquerque
Co-Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

RECIFE

2012

Catálogo na fonte
Bibliotecária Giseani Bezerra, CRB4-1738

P377s Peixoto, Monize Santos.
Obtenção, caracterização e avaliação toxicológica de extrato seco padronizado à base de Bauhinia forficata link / Monize Santos Peixoto. – Recife: O autor, 2012.
107 folhas : il. ; 30 cm.

Orientador: Miracy Muniz de Albuquerque.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Flavonoides. 2. Química - Caracterização. 3. Plantas - Farmacologia. I. Albuquerque, Miracy Muniz de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2012-096)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Recife, 27 de fevereiro de 2012.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 27 de fevereiro de 2012 e cuja Banca examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESEIDENTE ORIENTADOR E EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Miracy Muniz de Albuquerque.

(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. José Lamarthine Soares-Sobrinho.

(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Terezinha de Jesus Pereira da Silva.

(Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondani

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof^ª. Dr^ª. Nereide Stela Santos Magalhães

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina Lima Leite

Dedico este trabalho aos meus pais Gleide e Antônio pelo incentivo, dedicação e compreensão nos momentos de realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores, **Profa. Dra. Miracy Muniz e Prof. Dr. Pedro Rolim**, pelo valioso auxílio, incentivo e paciência na orientação deste trabalho.

Ao **Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM)** e ao meu querido orientador, pela valiosa orientação e conhecimentos transmitidos, incentivo, apoio e amizade oferecidos em mais uma etapa da minha vida acadêmica.

À minha equipe de projeto **Magaly Lyra, Rebeka Monteiro e Matheus Angelos**, pelo empenho e por todos os momentos disponibilizados na execução desse projeto.

Aos meus queridos amigos dos **Laboratórios de Tecnologia dos Medicamentos**, pelas experiências compartilhadas e apoio. Muito obrigada a todos!

À professora **Dr^a. Maique Weber Biavatti** pela concessão do padrão canferitrina e à **Klabin do Paraná Produtos Florestais Ltda** pelo fornecimento do material vegetal.

Aos professores e laboratórios parceiros: Prof. **Luiz Alberto de Lira** e Prof. **Haroldo Xavier** do Laboratório de Farmacognosia, Prof. **Almir Wanderley** do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-clínica de Produtos Bioativos, Prof. Fábio. Agradecemos pela colaboração e toda a ciência compartilhada com o nosso grupo de pesquisa.

Ao meu namorado **Elton Assis**, pela paciência e compreensão da minha ausência na elaboração deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa concedida para execução da primeira etapa deste trabalho.

E a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada a todos!

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A mágica presença das estrelas!”

Mário Quintana

RESUMO

O diabetes mellitus, por tratar-se de uma doença crônica e por apresentar um crescimento acentuado na sociedade brasileira, tornou-se alvo da comunidade científica na busca de novas alternativas terapêuticas. Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de comprovar as aparentes propriedades farmacológicas de espécies vegetais empregadas no tratamento desta enfermidade. Nesse contexto, a *Bauhinia forficata* Link, comumente conhecida como pata-de-vaca, figura entre as espécies mais utilizadas para esse fim. Dentre os representantes de *Bauhinia*, a que apresenta maior número de estudos referentes à atividade hipoglicemiante e antidiabética é a espécie referida. Embora, grande parte dos estudos farmacológicos apresente resultados relevantes, a avaliação da toxicidade tem sido pouco investigada. Esse constante interesse em seu estudo se mostra imperioso para sua utilização de forma segura e eficaz, possibilitando o desenvolvimento de formas farmacêuticas a partir de extratos vegetais secos para o tratamento de diabetes. O objetivo deste trabalho foi à obtenção, caracterização e avaliação toxicológica do extrato seco padronizado à base de *Bauhinia forficata* Link para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas. Os métodos extrativos avaliados foram percolação, maceração, aquecimento a 50°C, agitação a 200 rpm e agitação com aquecimento, sendo escolhido o método que extraiu o maior teor de flavonóides, este método teve os parâmetros de extração otimizados. O extrato sofreu processo de secagem por aspersão e por liofilização. O adjuvante de secagem utilizado na secagem por aspersão foi dióxido de silício coloidal na concentração de 20% (p/p). A avaliação toxicológica foi realizada através do estudo agudo e subcrônico. Diante dos resultados da avaliação dos métodos extrativos, a extração com agitação a 200 rpm, aquecimento a 50°C apresentou maior eficiência na extração de canferitrina e flavonoides totais. O melhor método foi otimizado avaliando os parâmetros massa planta/massa solvente, temperatura, teor de álcool do solvente extrator, velocidade de agitação. Na secagem dos extratos não foi observada influência nas características dos constituintes dos pós após secagem por aspersão, em relação ao extrato fluido através das técnicas utilizadas. Não houve alteração do ganho de massa, consumo de água e ração, dos parâmetros hematológicos e bioquímicos e morfológicos analisados em camundongos machos durante o tratamento por 30 dias consecutivos. No entanto, o aumento dos níveis de ALT e fosfatase alcalina indicam uma possível toxicidade hepática. Em suma a administração aguda e subaguda de extrato seco por aspersão de *Bauhinia forficata* Link não produziu efeitos tóxicos significativos em camundongos machos, mas novos estudos são necessários para avaliar melhor este achado. Por fim, os resultados obtidos neste trabalho contribuíram no processo de padronização de parâmetros de qualidade para a planta supracitada, possibilitando o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas.

Palavras-chave: extração, secagem, caracterização, flavonoides.

ABSTRACT

Diabetes mellitus, because it is a chronic disease and presents a sharp increase in Brazilian society, became the target of the scientific community in the search for new therapies. Several studies have been conducted with the objective of proving the apparent pharmacological properties of plant species used in the treatment of this disease. In this context, *Bauhinia forficata* Link, commonly known as cow's foot, is one the species most used for this purpose. Among the representatives of *Bauhinia*, the mentioned species presents the highest number of studies on hypoglycemic and antidiabetic. Although, most pharmacological studies provide relevant results, assessment of toxicity has been poorly investigated. This constant interest in its study is imperative for the safe and effective use, enabling the development of dosage forms from dried plant extracts for the treatment of diabetes. The objective of this study was the obtainment, characterization and toxicological evaluation of standardized dried extract based of *Bauhinia forficata* Link for the development of solid dosage forms. The extractive methods percolation, maceration, heating to 50 ° C, stirring at 200 rpm and stirring with heating were evaluated, being chosen the method that extracts the highest content of flavonoids and optimized parameters extraction. The extract has undergone drying process by spray-drying and lyophilization. The adjuvant used in the spray drying process was colloidal silicon dioxide concentration of 20% (w / w). The toxicological evaluation was performed using both acute and subacute tests. Considering the results of the evaluation of extractive methods, extraction with stirring at 200 rpm, heating to 50 ° C showed greater efficiency in the extraction of total flavonoids and kaempferitrin. The best method was optimized by evaluating the parameters plant mass/mass solvent, temperature, alcohol content of the organic solvent, stirring speed. The drying processes did not influence the characteristics of the constituents of the powder after spray drying, in relation to the fluid extract by means of techniques. There was no change in the mass gain, feed and water consumption, haematological parameters and biochemical and morphological analysis in male mice during treatment of 30 consecutive days. However, the increased levels of ALT, alkaline phosphatase indicate a possible liver toxicity. In short, acute and subacute administration of spray-dried extract of *Bauhinia forficata* Link did not produce significant toxic effects in male mice, but further studies are needed to further evaluate this finding. Finally, the results obtained in this work contributed to the standardization of quality parameters for the plant above mentioned, enabling the development of solid dosage forms.

Keywords: extraction, characterization, toxicology, flavonoids.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4. CAPÍTULO I	15
4.1. Artigo I - Aplicação de metodologias analíticas na caracterização de drogas vegetais e extratos secos para o desenvolvimento de fitoterápicos	16
5. CAPÍTULO II	39
5.1. Artigo II - Avaliação da influência dos métodos extrativos nos teores de canferitrina e flavonóides totais em folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link	40
6. CAPÍTULO III	59
6.1.1 Artigo III – Obtenção e caracterização físico-química do extrato seco por liofilização e produto seco por aspensão de <i>Bauhinia forficata</i> Link.....	60
7. CAPÍTULO IV	83
7.1.1 Artigo IV – Toxicidade aguda e subaguda de produto seco por aspensão de folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link	84
7. CONCLUSÃO	101
8. PERSPECTIVAS	103
REFERÊNCIAS	107

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus*, por ser uma doença crônica, é alvo de interesse na busca de novas alternativas de tratamento. De acordo com as projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS), a população diabética aumentará universalmente duas vezes até 2025, estimando-se que existirão aproximadamente 300 milhões de indivíduos diabéticos (SBD, 2010).

As plantas sempre foram uma fonte importante de muitos dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado. Segundo a Associação Brasileira de Empresas do Setor Fitoterápico, não existem dados oficiais sobre o tamanho desse mercado no Brasil. As estimativas variam entre US\$ 350 milhões e US\$ 550 milhões. Os pesquisadores acreditam que o país poderá ter um papel de liderança na área (ABIFISA, 2010).

No desenvolvimento de medicamentos oriundos de plantas medicinais, considerando as necessidades nacionais e aproveitando as potencialidades naturais do País, o governo tem incentivado e promovido a interação entre as instituições de ensino e pesquisa e o setor produtivo de bens e serviços (Sant'ana; Assad, 2004).

Relatórios etnobotânicos indicam que cerca de 1200 plantas no mundo apresentam potencial antidiabético, dos quais mais de três centenas foram relatados na literatura, identificando uma variedade de substâncias químicas com propriedades farmacológicas (Barbosa-Filho et al., 2005).

Nesse contexto, diversas atividades farmacológicas têm sido encontradas no vegetal *Bahúinia*, pertencente à família Fabaceae, cujas espécies são de amplo interesse medicinal, sendo empregadas em forma de chás e preparações fitoterápicas para o tratamento de diversas enfermidades. Dentre estes representantes, *B. forficata* Link é a mais utilizada, sendo comumente conhecida, pela comunidade rural, como “pata-de-vaca verdadeira” ou “insulina natural” (Silva; Filho, 2002; Arigony, 2005; Volpato et al., 2008).

A *Bauhinia forficata* Link é considerada uma espécie nativa da América do Sul, distribuindo-se pela Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Brasil; sendo que no Brasil, encontra-se distribuída principalmente nas regiões do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (Lorenzi; Matos, 2002; Vaz; Tozzi, 2005).

A abordagem etnofarmacêutica confirma o uso da *B. forficata* Link como planta medicinal potencialmente eficaz no tratamento da diabetes por apresentar propriedades antidiabéticas, hipoglicemiantes e diuréticas comprovadas através de diversos estudos realizados *in vitro* e *in vivo* (Sousa et al., 2004; Jorge et al., 2004; Cazarolli et al., 2006;

Menezes et al., 2007; Ruela et al., 2007; Volpato et al. 2008; Barbosa-Filho et al., 2005; Da Cunha, 2009; Silva, 2002; Pepato, 2002).

Estudos referentes à composição química e atividade farmacológica de *B. forficata* Link evidenciam que os glicosídeos flavonoídicos canferólicos e quercetínicos representam os principais constituintes químicos, sendo eles os responsáveis pela atividade antidiabética da espécie (Pizzolatti et al., 2003; Sousa et al., 2004).

Por *B. forficata* ser uma planta de grande interesse pela comunidade farmacêutica, sua espécie vegetal foi solicitada para gerar fitoterápicos que poderão ser disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Lusa; Bona, 2009). Em virtude da grande semelhança morfológica entre as diversas espécies de *Bauhinia*, a adulteração das preparações vegetais é muito comum e, aliado a isto, as condições pelas quais as plantas se desenvolvem podem alterar a composição do material vegetal (Engel et al., 2008).

O desenvolvimento de fitoterápicos inclui várias fases e envolve um processo interdisciplinar, multidisciplinar e interinstitucional. Uma etapa imprescindível consiste na padronização da manufatura de fitoterápicos para doses uniformes, atendendo os critérios de qualidade inerentes aos medicamentos. Portanto, a padronização é um pré-requisito para a constância dos efeitos terapêuticos e segurança do usuário (David et al., 2004). Sendo requisitos indispensáveis, portanto, ao seu registro no Brasil (Toledo et al., 2003; Brasil, 2010).

A padronização dos fitoterápicos é realizada com base no teor de uma substância marcadora presente no extrato, indicando que se a mesma estiver presente em quantidade apropriada, também os demais componentes estarão presentes (Klein et al., 2010).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter, caracterizar e avaliar a toxicologia de extrato seco padronizado à base de *Bauhinia forficata* Link.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência dos métodos extrativos nos teores de canferitrina e flavonóides totais no extrato de folhas de *Bauhinia forficata* Link e otimizar o melhor método extrativo.
- Avaliar o processo de secagem da solução extrativa selecionada pelos métodos de liofilização e secagem por aspersão.
- Caracterizar físico-quimicamente os extratos secos obtidos
- Realizar estudo toxicológico agudo e subagudo do produto seco por aspersão de folhas de *Bauhinia forficata* Link.

3. Capítulo I

3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.1 Artigo I – Aplicação de metodologias analíticas na caracterização de drogas vegetais e extratos secos para o desenvolvimento de fitoterápicos

Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS NA CARACTERIZAÇÃO DE DROGAS VEGETAIS E EXTRATOS SECOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS

Monize Santos Peixoto¹, Magaly Andreza Marques Lyra¹, Rebeka Priscila Maranhão Monteiro¹, Matheus Alves Angelos; Camila Bezerra Melo Figueirêdo¹; Evelyn Mirella Lopes Pina¹; Rosali Maria Ferreira da Silva.; Albuquerque, M.M. ¹; Rolim Neto, P. J. ^{1*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará - UFPA

RESUMO

Nos últimos anos, o aumento do uso de fitoterápicos pela população exige que diversos estudos sejam desenvolvidos, visando avaliar a eficiência de diferentes metodologias para a garantia de reprodutibilidade, padronização, segurança, eficácia e qualidade dessas variedades de matérias-primas vegetais. Este trabalho teve como objetivo destacar algumas metodologias utilizadas para caracterização das drogas e extratos secos vegetais. Estes métodos incluem os métodos espectrométricos (espectrofotometria no ultravioleta-visível, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de infravermelho próximo e espectroscopia Raman), cromatográficos (cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa), microscopia eletrônica de varredura, determinação de umidade residual, higroscopicidade, pycnometria a hélio, determinações de área superficial específica e tamanho de partícula a laser.

Palavras – chave: Controle de qualidade, drogas vegetais, extratos secos, fitoterápicos, metodologias analíticas.

ABSTRACT

In recent years, the increased use of herbal medicines by the population requires development of studies to evaluate the efficiency of different methodologies to ensure reproducibility, standardization, safety, efficacy and quality of these varieties of vegetable raw materials. This paper aims to highlight some methods used to characterize drugs and plant dry extracts. These methods include spectrometric methods (UV-visible spectroscopy, infrared spectroscopy, near infrared spectroscopy and Raman spectroscopy), chromatography (thin layer chromatography, high performance liquid chromatography and gas chromatography), scanning electron microscopy, determination of residual moisture, hygroscopicity, helium pycnometry, measurements of specific surface area and particle size laser.

Key-words: Quality control, vegetable raw drugs, dried extracts, phytopharmaceutical, analytical methodologies.

INTRODUÇÃO

A fitoterapia compreende uma prática terapêutica comumente utilizada e representa o tipo de tratamento mais acessível para uma parcela significativa da população (Klein et al., 2009; Souza-Moreira et al., 2010). Atualmente, este mercado tem movimentado altos valores financeiros em todo o mundo (Souza-Moreira et al., 2010). Em 2010, por exemplo, o mercado mundial de fitoterápicos movimentou cerca de US\$ 44 bilhões, enquanto que, no Brasil, apesar de não existirem dados oficiais, as estimativas apontam um movimento entre US\$ 350 a 550 milhões (Miotto, 2010; Silva, 2010).

Seguindo esta tendência atual, inúmeros estudos têm abordado a análise de espécies vegetais com potencial medicinal, de modo a contribuir com a descoberta de novas plantas medicinais e com o desenvolvimento de fitoterápicos (Mendez et al., 2011). Este desenvolvimento inclui uma série de etapas, tais como cultivo, coleta, secagem, moagem, extração e formulação e envolve um processo interdisciplinar, multidisciplinar e interinstitucional (Toleto et al., 2003; Borella et al., 2010). Conseqüentemente, se essas etapas não forem realizadas de forma satisfatória, poderão gerar alterações na composição química das substâncias ativas, interferindo na qualidade do produto final (Borella et al., 2010).

Portanto, o emprego de espécies vegetais como matéria-prima para produção de medicamentos, tem como pré-requisito a padronização das drogas e extratos vegetais através de diferentes técnicas, a fim de estabelecer suas especificações de qualidade e garantir seus critérios de eficácia e segurança (Klein et al., 2009). Este trabalho tem como objetivo destacar alguns métodos utilizados para caracterização das drogas e extratos secos vegetais. Estes métodos incluem os métodos espectrométricos (espectrofotometria no ultravioleta-visível, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de infravermelho próximo e espectroscopia Raman), cromatográficos (cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa), microscopia eletrônica de varredura, determinação de umidade residual, higroscopicidade, picnometria a hélio, determinações de área superficial específica e tamanho de partícula a laser.

TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

Métodos Espectrométricos

Espectrofotometria no ultravioleta-visível

A espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta/visível (UV-VIS) é um método analítico baseado na propriedade das espécies iônicas ou moleculares absorverem determinados comprimentos de onda da radiação UV/VIS. No processo de absorção da radiação, a energia dos fótons é transferida para as moléculas do meio em análise para provocar transições eletrônicas associadas a transições vibracionais e rotacionais (Leal et al., 2008).

Tendo em vista que os níveis energéticos das moléculas são quantizados, a absorção de energia pode ser considerada como um processo específico relacionado com a estrutura da espécie absorvente, a qual determina a energia envolvida na transição, e com a probabilidade de que esta ocorra. A intensidade da radiação que incide na amostra pode ser medida e relacionada com a concentração da espécie absorvente (Rocha; Teixeira, 2004).

Apesar de novas tecnologias surgirem a cada instante a espectrofotometria continua sendo uma ferramenta analítica importante na quantificação de princípios ativos por apresentar baixo custo, facilidade operacional, rapidez, reduzido gasto de solvente e ampla disponibilidade de espectrofotômetros UV/VIS nos laboratórios (Joubert, 2008). Documentos oficiais como as Farmacopéias Francesa, Européia e Brasileira ainda adotam a espectrofotometria UV-Vis como método de escolha para a análise quantitativa de várias classes de compostos químicos em material vegetal, principalmente se tais compostos estiverem em elevada quantidade (Chabariberi, 2009).

Os produtos fitoquímicos, por serem matrizes complexas, precisam de um sistema com alto desempenho para serem analisados. Neste sentido, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos, visando avaliar a eficiência de diferentes metodologias para a garantia de reprodutibilidade, padronização, segurança, eficácia e qualidade dessas variedades de matérias-primas vegetais.

Zhu e colaboradores (2009) quantificaram flavonóides por meio de espectrofotometria UV/VIS com o sistema cromogênico de NaNO_2 -Al $(\text{NO}_3)_3$ -NaOH em *Portulaca oleracea* L., uma tradicional planta medicinal da China. Por sua vez, Yu e colaboradores (2008) desenvolveram um método simples, rápido e eficiente para a determinação de flavonóides totais em *Scutellaria barbata* D. Don. Uma extração ultrassônica dinâmica foi realizada em um espectrofotômetro acoplado ao extrator, tendo como vantagem a pequena quantidade de amostra requerida (5 mg) e o rápido tempo de extração (12,5 min).

Öztürk e colaboradores (2010) descreveram um novo método espectrofotométrico para doseamento de ácido rosmarínico em extratos etanólicos de plantas. O método desenvolvido foi baseado na complexação do ácido rosmarínico com íons zircônio (IV), dando um máximo de absorvância a 362 nm. O método demonstrou ser mais rápido, barato e seletivo que os métodos convencionais para o doseamento desse composto.

Carvalho e colaboradores (2008) desenvolveram um estudo espectrofotométrico na região do UV/VIS aliado a uma prospecção fitoquímica para diferentes estágios fenológicos da *Brassica* sp. O perfil espectrofotométrico das concentrações globais relativas dos constituintes da planta, com relação ao seu crescimento vegetativo, foi traçado para extratos em água, etanol e diclorometano. Os resultados da prospecção fitoquímica mostraram a presença positiva de compostos fenólicos, flavonóides, triterpenos e esteróides para os extratos etanólicos e aquosos.

A espectrofotometria no UV/VIS também pode ser utilizada como método auxiliar na identificação botânica de vegetais, como descrito no trabalho de Valladão e colaboradores (2009) para a identificação da *Maytenus salicifolia*, cujo chá é usado topicamente para aliviar pruridos e sintomas alergiformes. Adicionalmente, a espectrofotometria no UV/VIS também é útil como metodologia auxiliar para o monitoramento de reações e a identificação de seus compostos intermediários. O estudo de Chen e colaboradores (2010), por exemplo, descreve o uso desta metodologia para caracterização espectroscópica dos cátions formados na oxidação de fenóis.

Espectroscopia no infravermelho (IV)

A espectroscopia no IV médio, em especial no modo de refletância difusa, é uma técnica muito utilizada para implementação de rotinas de análises no setor de controle de qualidade na indústria farmacêutica, devido ao seu baixo custo, rapidez e por não ser necessária a operação de solubilização de amostras. A técnica de espectroscopia IV foi utilizada satisfatoriamente em estudos dos compostos fenólicos de *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhland (*Eriocaulaceae*) (Maluf et al., 2010; Silva et al., 2007; Cunha-Filho; Sá-Barreto, 2007).

A espectroscopia no infravermelho próximo também vem sendo amplamente utilizada na indústria farmacêutica, inclusive na identificação de matéria-prima vegetal, produtos acabados e quantificação de princípios ativos (González & Pous, 1995; Blanco, Coelho & Iturriaga; 1998). A identificação é baseada na aplicação dos métodos quimiométricos aos

espectros de infravermelho próximo e permite melhor separação dos constituintes das amostras em relação à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), além dos metabólitos serem separados de acordo com o grupo funcional (Deisingh, 2005; De Almeida, 2006).

A espectroscopia no infravermelho próximo é um método quali-quantitativo rápido, não destrutivo, não requer reagentes e ainda traz a impressão digital de toda matriz. Em contrapartida, as desvantagens deste método para identificação de drogas são mudanças de umidade e posição da amostra. Portanto, estes parâmetros precisam ser controlados para se tornarem aceitáveis (Woo, et al., 2005; Gonzalez & Pous, 1995)

A utilização da espectroscopia no infravermelho próximo foi descrita para discriminação de espécies vegetais medicinais de acordo com sua localização geográfica (Woo et al., 2005; Woo et al., 1999). Esta técnica foi capaz de identificar o marcador decursina na amostra coreana de *Angelicae gigantis* Radix, distinguindo-a da espécie chinesa (Woo et al., 2005). Além disso, as espécies chinesas e coreanas de *Astragalus membranaceus* e *Ganoderma lucidum* foram diferenciadas quanto a origem após segunda derivatização do espectro de infravermelho próximo por reflectância. Os espectros também foram diferenciados utilizando o algoritmo componente principal (Woo et al., 1999).

Chen & Sorensen em 2000, Wang et al., 2005 desenvolveram um método por espectroscopia por infravermelho próximo para quantificação de ácido glicirrízico em raízes secas de *Glycyrrhiza uralensis*. Os métodos tiveram precisão e exatidão semelhantes ao CLAE. A espectroscopia de infravermelho próximo com o auxílio de correlação multiplicativa de sinal e filtro derivativo de Norris foi utilizada para classificação de amostras de alcaçuz de acordo com condições de crescimento, área geográfica e partes de plantas (Wang et al., 2007).

Espectroscopia Raman

A espectroscopia de Raman, durante as duas últimas décadas, tem sido uma ferramenta de pesquisa bastante usada na área farmacêutica. Embora haja uma abundância das publicações recentes que tratem das aplicações desta técnica, o número de estudos quantitativos ainda é limitado. Dentre os trabalhos existentes, diversos demonstram suas vantagens em comparação ao IV, sobretudo por não haver interferência de água nos espectros. No entanto, o alto custo do equipamento e a complexidade dos lasers e dos sistemas de detectores representam algumas de suas desvantagens (Aaltonen et al., 2008).

Em estudos a técnica foi utilizada com sucesso em análise dos frutos de *Luffa operculata* (L.) cogn. para verificação de diferenças de composição em função de sua região de origem (Aaltonen et al., 2008; Cruz et al., 2006).

Métodos Cromatográficos

Cromatografia em camada delgada (CDD)

A CCD é um dos métodos mais utilizados para a separação e identificação de produtos naturais, sendo largamente utilizado para o controle de qualidade de matérias-primas vegetais e fitoterápicos. Trata-se de uma técnica de adsorção líquido-sólido que promove a separação dos compostos pela diferença de afinidade das substâncias da mistura pela fase móvel e estacionária. Como grande parte dos compostos orgânicos é incolor utiliza-se um processo de revelação para que se possam analisar os resultados (César et al., 2007).

A técnica foi utilizada de modo satisfatório em estudos para a caracterização química qualitativa de diversos compostos em plantas, como exemplo, polifenóis em *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., com verificação de que as partes da espécie possuíam composição semelhante; no controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae), as quais analisadas por CCD levaram a conclusão que algumas amostras poderiam estar contaminadas com outras espécies de *Bauhinia* ou outras plantas de origem desconhecida; em diferentes tinturas de *Stryphnodendron barbatiman* para análise fitoquímica, como também em extrato de *Maytenus ilicifolia*, analisado em CCD com revelação na região do ultravioleta (UV) para confirmação da presença dos principais grupamentos químicos existentes e certificação da presença dos principais princípios ativos e marcadores; em *Priva lappulacea* (L.) Pers. (Verbenaceae) para análise do perfil fitoquímico; em *Senna alata* para determinação do perfil cromatográfico qualitativo e em folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) para obtenção de perfil cromatográfico (César et al., 2007; Fiuza et al., 2008).

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Diversas técnicas podem ser empregadas para o doseamento de metabólitos secundários em materiais vegetais, sendo a CLAE uma das que alcança maior destaque, em virtude de sua maior sensibilidade, precisão e exatidão em relação aos outros métodos. Tal

técnica permite a realização de uma análise química aprofundada de grupos de moléculas de várias classes metabólicas para uma caracterização da forma mais completa possível. Ademais, ainda é possível analisar compostos distribuídos em uma ampla faixa de polaridade, massa molecular e labilidade térmica (Volpato, 2005; Linden, 2007).

Em muitos casos torna-se muito difícil identificar a maior parte dos componentes por meio de abordagens comuns. Em geral, poucos marcadores farmacologicamente ativos são empregados para avaliar a qualidade e autenticidade de uma planta medicinal. É bastante comum a utilização da CLAE para análise de ervas medicinais, devido à facilidade da operação e também por ser uma técnica, a qual se pode utilizar componentes da amostra com volatilidade ou estabilidade limitada, ao contrário da cromatografia gasosa (CG). Outro destaque desse método analítico é que pode ser usada para analisar uma grande extensão de componentes de ervas medicinais.

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 14, de 31 de março de 2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o controle de qualidade de produtos derivados de plantas medicinais deve ser realizado através da utilização de metodologias analíticas devidamente validadas para identificação e quantificação de compostos ou classe de moléculas ativas presente na matéria-prima vegetal. A CLAE é um dos métodos analíticos que esta resolução define para o controle de qualidade de drogas vegetais.

Com a finalidade de solucionar problemas analíticos ou preparativos nas análises por CLAE é necessário além de uma instrumentação adequada uma combinação correta das condições experimentais, tais como: escolha da composição das fases estacionária e móvel, fluxo, temperatura do forno, tamanho de partícula e da coluna, volume de injeção, ou ainda determinar se o tipo de eluição será gradiente ou isocrático. Esses parâmetros são essenciais para se obter um resultado desejável, uma ótima resolução e separação dos picos (Ciolo, 1998).

A CLAE através do uso de sistema gradiente e solventes orgânicos permite a separação de compostos presentes em espécies vegetais, apresentando com uma técnica versátil e obtendo resultados com boa resolução (De Simon, 1995). Essa técnica cromatográfica demonstra ser importante ferramenta para a identificação de material vegetal, através do uso de marcadores químicos (Chabariberi et al, 2009).

Na literatura tem sido relatado diversos estudos para a determinação de flavonóides em espécies vegetais. Chen et al (2007) realizaram a determinação de 15 flavonóides, a partir de

uma espécie de *Herba epimedii* (família Berberidaceae). É válido salientar que a determinação quantitativa de flavonóides glicosídicos individuais é difícil porque não estão disponíveis para aquisição comercial padrões para a maioria destes compostos, o que implica em alto custo, além de tempos longos de análise e dificuldades inerentes à otimização das condições cromatográficas. Por esse motivo, é muito comum o uso da hidrólise dos glicosídios para liberar as agliconas para determinação dos flavonóides (Hoffmann-ribani; Rodriguez-amaya, 2008; César et al 2007).

Estudos também têm mostrado a utilização dessa técnica analítica na verificação de teores de isoflavonas (daidzeína, genisteína e gliciteína) no extrato seco de soja em cápsulas (César et al, 2007). Souza e colaboradores (2010) realizaram pesquisas aplicando a CLAE para quantificação de metilxantinas (cafeína, teofilina e teobromina), como também taninos como: catequina e epicatequina em pó de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae). Concomitante a esse estudo, os autores realizaram a comparação da metodologia por CLAE com o método espectrofotométrico para a determinação dos mesmos componentes. A partir da avaliação das metodologias, pode-se concluir que o emprego do método cromatográfico é mais indicado no controle de qualidade do guaraná em pó, por ser uma técnica precisa, sensível, específica e rápida. Estudos realizados sobre o perfil de flavonóides e alcalóides em folhas e extrato fluido de *Passiflora alata* Curtis contendo isovitexina foi realizado através de CLAE, comparado seus perfis cromatográficos com extrato de *P. incarnata* comercial e tintura de *P. actinia* (Müller, 2006).

Lopes e colaboradores (2009) desenvolveram um método analítico por CLAE para a análise dos flavan-3-óis presentes em extrato semipurificado das cascas de *Stryphnodendron adstringens*, *Stryphnodendron polyphyllum* e *Stryphnodendron obovatum*. Utilizaram soluções-padrões de ácido gálico e galocatequina e a metodologia desenvolvida mostrou-se viável à aplicação em plantas ricas em taninos nas três espécies vegetais.

Outros estudos tem mostrado a aplicação do CLAE, como a purificação dos isômeros triterpenos α -amirina e β -amirina nas espécies do gênero *Protium* (Burseraceae), através desta técnica permite a separação desses isômeros, haja vista que é praticamente impossível disso ser alcançado utilizando-se outras técnicas cromatográficas de eficiência limitada (Dias, 2011).

Cromatografia gasosa (CG)

A CG é uma das técnicas analíticas mais utilizadas graças ao seu alto poder de resolução, além de possibilitar a detecção em escala de nano e picogramas. O principal mecanismo de separação se dá pela partição dos componentes da amostra entre uma fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida. Possui vários detectores, sendo mais utilizados os detectores por ionização em chama e o de condutividade térmica, acoplados a espectrômetros de massa, o que possibilita a identificação imediata das substâncias presentes na amostra (Degani; Cass; Vieira, 1998).

Esta técnica foi utilizada para analisar extratos de alcalóides totais e dos produtos isolados de *Tabernaemontana angulata Mart. ex Müll. Arg., Apocynaceae*; análise qualitativa e quantitativa em óleos essenciais extraídos de folhas e galhos de *Zanthoxylum syncarpum Tull*; análise do perfil cromatográfico de *Mikania glomerata S.* e análise qualitativa de óleos essenciais de folhas de *Vernonia remotiflora e Vernonia brasiliiana* (Degani; Cass; Vieira, 1998; De Assis et al., 2009; Vieira et al., 2009; Bueno & Bastos, 2009; Maia; Torres; Pessoa, 2010).

Outras técnicas

Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) consiste numa das mais refinadas técnicas de análise micro-estrutural. Com um aumento de até 300.000 vezes, a MEV permite obter imagens tridimensionais detalhadas acerca da microestrutura de materiais sólidos, com grande precisão e confiabilidade (Dedavid, Gomes, Machado, 2007) e, desta forma, durante a caracterização de drogas e extratos secos de vegetais, proporciona maior elucidação acerca das características físicas e superficiais dos componentes da amostra (Iosio et al., 2011).

Para exemplificar a utilização desta técnica, vários estudos têm sido desenvolvidos objetivando a determinação da morfologia e do aspecto superficial dos extratos secos por *spray-dried*. Estas definições, por sua vez, corroboram com estudos adicionais sobre as características de fluxo e compressão que estes extratos secos ou mesmo seus granulados venham apresentar diante de uma forma farmacêutica sólida derivada. Neste caso, utilizando a MEV, um estudo realizado por Petrovick e colaboradores (2010) em torno do extrato seco de *Achyrocline satureioides* apontou diferenças significantes entre o pó obtido por *spray-dried* e o granulado, apresentando este último forma irregular e superfície rugosa, mas com melhor

fluxo e melhores características de compactação. Em contrapartida, as fotomicrografias para o pó revelaram a presença de partículas esteroideais com superfície porosa e áspera, porém de pequena dimensão, cujo fluxo e a compactabilidade não se mostraram adequados para a obtenção de formas farmacêuticas derivadas, especialmente por compressão direta.

Em outras situações, as análises por MEV podem elucidar o aspecto estrutural da mistura fármaco-excipiente sob determinadas condições, conforme análise realizada em torno do extrato seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia*, cuja adição do dióxido de silício coloidal 30% (m/v) sob temperatura de aspersão de 180°C, contribuíram para a formação de partículas esféricas, com menos aglomerados e distribuição granulométrica mais uniforme. Tais condições foram destacadas como fundamentais para o alcance de melhores propriedades de fluxo dos produtos secos por aspersão (Oliveira, 2009). Trabalho semelhante foi realizado para o extrato de *Glinus Lotoides* com adição do Aeroperl® 300 Pharma 30%, revelando melhoria na superfície do extrato bruto (Endale, Gebre-Mariam, Schmid, 2007), e para o extrato seco de *Phyllanthus niruri* com o Eudragit E, cuja granulação não resultou em mudanças estruturais (De Souza et al., 2007).

Silva, em 2010, analisou extratos secos obtidos por evaporação rotativa, leito de jorro, *spray dryer* e liofilização de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.), através de MEV. Foi observado que houve uma significativa melhora nas características farmacotécnicas do pó durante a secagem na preparação de extratos secos obtidos por *spray dryer* e leito de jorro, devido à adição de aerosil® à solução extrativa, como adjuvante de secagem.

A MEV foi também revelada como uma técnica aliada para avaliação morfológica da reprodutibilidade e a padronização de diferentes lotes de um extrato vegetal. Para a *Aleurites moluccana*, foi apontada similaridade nas características físicas, com presença de pós finos, com partículas esféricas e de superfície suave. Estas características, juntamente com a manutenção dos flavonóides constituintes, garantiram a reprodutibilidade adequada do extrato (Quintão et al., 2011).

Além disso, a técnica pode auxiliar para estimar as condições de produção, conforme discutido por Spaniol e colaboradores (2009), quando da avaliação do comportamento compressional de granulado contendo extrato de *Phyllanthus niruri* em compressoras excêntrica e rotativa. Ambas mostraram diferenças na porosidade e textura, especialmente com o aumento da força de compressão e dureza do comprimido; além das diferenças superficiais dos comprimidos, devido à compressão uniaxial da compressoras excêntrica. Estas

alterações irão influenciar no produto final, uma vez que estes produtos exibem parâmetros de qualidade diferentes.

Neste sentido, um estudo visando desenvolver um comprimido revestido utilizando *Tanacetum parthenium*, detectou por MEV que o pó deste extrato seco por *spray dried* apresentou partículas esféricas homogeneamente distribuídas, comum a este processo de secagem. Esta forma é vantajosa para uma forma farmacêutica, pois está associada a uma fluidez e densidade adequada (Chaves, Da Costa, Freitas, 2009). Da mesma forma, a técnica foi aplicada para o desenvolvimento de novos pellets emulsionantes de *Phytocomplex silymarin*, os quais apresentaram melhores características (forma esférica, superfície regular), sendo posteriormente selecionada a formulação com melhores resultados (Iosio et al., 2011).

Adicionalmente, durante os diferentes processos de extração, a MEV pode ser usada para detectar o efeito de ruptura na superfície da amostra, fazendo com que as substâncias químicas de dentro da célula sejam rapidamente liberadas para os solventes de extração circundantes. Desta forma, o estudo com *Radix Astragali* constatou que a extração por micro-ondas apresentou maior interrupção na superfície da amostra, devido ao brusco aumento de temperatura e pressão intracelular. Na extração por ultrassom, a penetração do solvente foi evidenciada pelo efeito de cavitação. Diferente da extração por refluxo de calor e Soxhlet, onde houve pouca destruição da microestrutura de amostra, com presença de algumas rupturas ligeiras na superfície. Na maceração foram observados poucos vincos leves superficiais (Yan et al., 2010).

Área Superficial Específica

Em uma mistura de partículas de vários tamanhos, ou seja, numa amostra polidispersa, duas propriedades são importantes: a textura e a área superficial das partículas individuais, e a variação do tamanho, número ou peso das partículas presentes (Silva, 2010).

A área superficial das partículas pode estar relacionada às propriedades físico-químicas e farmacológicas de um marcador. Clinicamente, a área da partícula do fármaco pode interferir em sua liberação da forma farmacêutica. Na produção de comprimidos e cápsulas, por exemplo, o controle da área das partículas do extrato seco é essencial na obtenção de propriedades de fluxo necessárias ao processo e de misturas homogêneas de grânulos e pós (Silva, 2010).

A medida da área superficial específica pode ser obtida por adsorção física de nitrogênio sobre o material, pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET). O método BET baseia-se na determinação do volume de N₂ adsorvido a diversas pressões relativas, na temperatura de nitrogênio líquido (77 K) (Silva, 2010).

Silva, em 2010, avaliou amostras de extratos secos por *spray dryer* de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.). Os valores de área superficial específica variaram inversamente com o tamanho médio de partícula das amostras analisadas. À medida que a área superficial específica aumentou, o valor do tamanho médio de partícula diminuiu.

Determinação do Tamanho de Partícula a Laser

A técnica, bastante utilizada tanto para drogas vegetais como para extratos secos, baseia-se em a luz ao interagir com a matéria particulada pode ser espalhada (mudança de direção) sem sofrer alteração de sua energia (espalhamento Rayleigh). Este espalhamento é função do tamanho da partícula. Portanto, a distribuição do tamanho de partículas pode ser determinada pela análise do espalhamento de luz produzido. O equipamento Microtac[®] S3500, por exemplo, emprega um sistema de três lasers operando em conjunto com um arranjo de fotodetecção que varre ângulos de espalhamento unificado da luz (UST – Unified Scatter Technique) (Silva, 2010).

Em geral, quanto menor o tamanho da partícula, melhor a solubilidade do extrato seco, aumentando, conseqüentemente a biodisponibilidade do insumo vegetal (Silva, 2010).

Determinação da umidade residual

A determinação da umidade residual nas matérias-primas vegetais é um ensaio de grande relevância do ponto de vista tecnológico para produção de fitoterápicos (Garcia-Amoedo; De Almeida-Muradian, 2002; Nunes et al., 2009). O alto teor de água propicia a proliferação de fungos e bactérias, além de favorecer a atividade hidrolítica de diversas enzimas presentes nas células vegetais, possibilitando de tal modo a degradação dos princípios ativos pelos processos de hidrólise, mesmo em um curto espaço de tempo (Corrêa et al., 2004; Borges et al., 2005. Nunes et al., 2009). A umidade também influencia a qualidade farmacotécnica dos materiais sólidos pulverulentos, podendo afetar, em especial, suas características reológicas e a estabilidade físico-química (Mendez et al., 2011). Por outro lado, as drogas vegetais geralmente necessitam de uma quantidade mínima de água para sua

conservação adequada (Antonelli-Ushirobira et al., 2004). De modo geral, o teor de umidade estabelecido nas diferentes farmacopeias varia entre 8 a 14%, com poucas exceções especificadas em monografias (Antonelli-Ushirobira et al., 2004).

Sendo assim, esta determinação constitui um importante parâmetro de controle de qualidade, sendo útil como indicativo de eficiência de secagem, estabilidade e conservação das matérias-primas vegetais (Alves et al., 2008; Da Costa et al., 2009; Nunes et al., 2009). Assim como, também pode fornecer dados acerca do rendimento de extração, já que a secagem influi no estado de integridade das estruturas celulares, expondo-as mais ou menos ao contato com solventes (Da Costa et al., 2009). Este parâmetro deve então ser adequadamente avaliado na seleção das operações produtivas, incluindo a extração e a secagem, e na manipulação e seleção das condições de armazenamento, em nível de ambiente e de material de acondicionamento (Mendez et al., 2011).

Diversos métodos analíticos podem ser empregados na determinação de umidade residual em matérias primas vegetais, destacando-se os seguintes ensaios: determinação da perda por dessecação pelo método gravimétrico, balança por infravermelho e ou termogravimetria, e determinação de água pelo método volumétrico (Karl Fisher), todos descritos na Farmacopeia Brasileira (2010).

O método gravimétrico é tradicionalmente utilizado para avaliação da umidade residual do pó e extratos secos de diversas espécies vegetais, tais como *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt. (pariri) (Alves et al., 2008), *Cynara scolymus* L. (alcachofra) (Mendez et al., 2011), *Calendula officinalis* L. (calêndula) (Nunes et al., 2009) e *Paullinia cupana* Kunth (guaraná) (Araújo et al., 2006).

Em relação ao método gravimétrico, a balança por infravermelho possui a vantagem de requerer menor tempo para a realização das análises, podendo ser mais útil para as análises de controle de qualidade de um laboratório mais equipado onde o número de amostras geralmente é grande (Garcia-Amoedo; De Almeida-Muradian, 2002). No entanto, dependendo do aparelho utilizado, diferentes programações podem ser feitas e os resultados das análises podem variar, dependendo do programa selecionado, sendo necessário validar a metodologia de acordo com as condições de secagem estabelecidas (Borges et al., 2005).

Migliato e colaboradores (2007) empregaram adequadamente este método para determinação da umidade residual de frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (jambolão) e Borges e colaboradores (2005) evidenciaram através de validação que a determinação de água em analisador de umidade foi precisa, reprodutível e exata para a análise das seguintes

matérias-primas vegetais: *Calendula officinalis* L. (calêndula), *Foeniculum vulgare* Miller (funcho), *Maytenus ilicifolia* Mart ex. Reissek. (espinheira-santa) e *Passiflora alata* Curtis (maracujá). Além do mais, também demonstraram uma similaridade dos resultados desta metodologia em relação à determinação de água pelo método gravimétrico nas drogas vegetais supracitadas, possuindo ainda a vantagem de ser mais rápida e prática. No entanto, os autores recomendaram que os parâmetros desta análise sejam prévia e corretamente estabelecidos e que seja feita uma validação da metodologia para cada matéria-prima, de modo a confirmar que os parâmetros selecionados são adequados para obtenção de resultados correspondentes aos obtidos através dos métodos tradicionais.

Ammon e colaboradores (1985) aplicaram com sucesso o método volumétrico na determinação de água em folhas de duas espécies de *Eucalyptus leucoxylon* e *Eucalyptus globulus*, apontando a vantagem do método para avaliação de plantas que contém óleos essenciais, tendo em vista que o mesmo, diferentemente dos métodos que empregam o calor, não apresenta efeito destrutivo sobre os outros componentes presentes nas drogas e extratos vegetais.

A termogravimetria (TG) é uma das técnicas de análise térmica em que as variações de massa da amostra (perda ou ganho) são monitoradas em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura. A partir da derivada primeira da curva TG obtém-se a curva termogravimétrica derivada (DTG) com registro de picos relacionados às etapas de perda ou ganho de massa, permitindo assim uma melhor definição de onde se iniciou e finalizou as variações de massa. Por essas características, essa técnica pode então ser empregada para determinação do teor de umidade residual em drogas vegetais (Araújo et al., 2006; Farmacopeia Brasileira, 2010). O equipamento utilizado é constituído basicamente de uma termobalança na qual a substância é inserida em um porta-amostra sob programa controlado de temperatura e atmosfera especificada, como nitrogênio, por exemplo. Esse dispositivo que possibilita o aquecimento e medição simultânea da massa do analito (Farmacopeia Brasileira, 2010).

Em relação às técnicas tradicionais, como gravimetria, a TG apresenta as seguintes vantagens: permite reduzir o tempo de análise, utiliza menor quantidade de amostra (Araújo et al., 2006; Da Silva et al., 2001), o registro da perda de massa ocorre de maneira automatizada, evitando os erros provocados por manipulações excessivas do operador com a amostra (Da Silva et al., 2001), os erros de análise inerentes à manipulação das amostras são minimizados,

ademais é possível realizar a determinação simultânea dos teores de umidade e cinzas (Araújo et al., 2006).

Da Silva e colaboradores (2001) avaliando o teor de umidade em amostras de pó e farelo da vagem de *Prosopis juliflora* (SW) D. C. J. (algaroba) a diferentes temperaturas de secagem (55, 65, 75, 85, 95 e 105°C), por meio de método gravimétrico (estufa e mufla), analisador de umidade e termogravimetria, verificaram uma boa correlação entre os valores percentuais de umidade obtidos para as duas amostras estudadas, nas diversas temperaturas de secagem, por todos os métodos avaliados. Entretanto, os autores sugeriram que o método termogravimétrico foi mais preciso, tendo em vista que apresentou os menores desvios padrão dos teores de umidade.

Avaliação da higroscopicidade

A avaliação da higroscopicidade consiste na determinação da estabilidade de pós frente à umidade relativa em temperatura ambiente, sendo um dos parâmetros de seleção das técnicas de secagem dos extratos vegetais líquidos, bem como de suas condições de armazenamento (Mendez et al., 2011). Um produto extremamente higroscópico, de acordo com as condições ambientais de armazenagem do produto e da impermeabilidade da embalagem, tende a entrar em equilíbrio com as condições termodinâmicas do ar ambiente, perdendo ou ganhando água, evento que pode afetar sua estabilidade e conservação (Anselmo; Mata; Rodrigues, 2008). O fenômeno de higroscopicidade de produtos sólidos porosos é estudado por meio das equações que descrevem as isotermas de sorção de água, que são representações matemáticas da relação existente entre o teor de umidade do material em equilíbrio com diferentes valores de atividade de água e uma determinada temperatura. O conhecimento dessa relação de interdependência auxilia na identificação do tipo de forças que intervêm na ligação da água com os elementos de composição do produto, permitindo certas avaliações da sua estabilidade, durante o armazenamento, podendo servir como parâmetro indicativo de embalagens apropriadas para melhor conservação do produto e vida-de-prateleira do produto industrializado. (Corrêa; Júnior; Stringheta, 2000)

Mendez e colaboradores (2011) avaliaram a higroscopicidade do extrato seco de *Passiflora alata* Curtis (maracujá-doce), expondo-o à ambientes de 35 e 70 % de umidade relativa em temperatura ambiente, por tempos de 2, 4, 6, 8, 10 e 14 dias. Os autores

observaram uma tendência de higroscopicidade do material em ambientes de elevada umidade relativa, em virtude da rápida propriedade de adsorção de umidade e aumento de peso de aproximadamente 18% (p/p), nos dois primeiros dias de exposição a 70% de umidade relativa. Apesar do estabelecimento do equilíbrio a partir do quarto dia, foi verificado um aumento total de peso de 21,44% (p/p) ao final dos 14 dias de ensaio, com mudança na coloração e observação de princípio de aglomeração. Por outro lado, o aumento de peso do material exposto à umidade relativa de 35% foi de 2,21% após 14 dias, ilustrando uma diferença de comportamento em condições de baixa umidade. Por sua vez, Anselmo; Mata; Rodrigues (2008) apontaram a baixa higroscopicidade do extrato seco de urucum (*Bixa Orellana* L.), através da determinação das isotermas de equilíbrio higroscópico nas temperaturas de 10 a 50°C e teor de água de equilíbrio de 6 a 22% base úmida.

CONCLUSÃO

O trabalho demonstra a importância das diferentes técnicas analíticas existentes para caracterização e controle de qualidade das matérias-primas vegetais, seus produtos intermediários e fitoterápicos, de modo que os mesmos possam ser utilizados terapêuticamente de modo seguro e eficaz.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da FACEPE e do CNPq.

REFERÊNCIAS

- Aaltonen, J.; Gordon, K.C.; Strachan, C.J.; Rades, T. Perspectives in the use of spectroscopy to characterize pharmaceutical solids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 34, p. 159-169, 2008.
- Alves, M. S. M.; Mendes, P. C.; Vieira, J. G. de P.; Ozela, E. F.; Barbosa, W. L. R.; Júnior, J. O. C. S. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 215-221, 2010.
- Ammon, D. G.; Barton, A. F. M.; Clarke, D. A.; Tjandra, J. Rapid and Accurate Chemical Determination of the Water Content of Plants Containing Volatile Oils. **Analyst**, v. 110, p. 917-920, 1985.
- Anselmo, G. C. dos S.; Mata, M. E. R. M. C.; Rodrigues, E. Comportamento higroscópico do extrato seco de urucum (*Bixa Orellana* L.). **Ciênc. agrotec.**, v. 32, n. 6, p. 1888-1892, 2008.

Araújo, A. A. de S.; Mercuri, L. P.; Seixas, S. R. S.; Storpirtis, S.; Matos, J. do R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, 2006.

Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S.; De la Pezuela C. Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. Critical review. **Analyst**, v. 123, n. 8, p. 135–150, 1998.

Borella, J. C.; Ribeiro, N. S.; Teixeira, J. C. L.; Carvalho, D. M. A. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonóides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 193-197, 2010.

Borges, D. B.; Farias, M. R.; Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P. Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 229-236, 2005.

Budal, R. M. Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas. (Dissertação) Florianópolis: Faculdade de química, UFSC; 2003.

Bueno, P. C. P.; Bastos, J. K. A validated capillary gas chromatography method for guaco (*Mikania glomerata* S.) quality control and rastreability: from plant biomass to phytomedicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 218-223, 2009.

Carvalho, C. A.; Silva, M. B; Oliveira, T. G; Lima, J. M; Rosa, M. B. Estudo espectrométrico de diferentes estágios fenológicos da *Brassica oleracea* var. capitata. **Revista brasileira de farmacognosia**, v.18, n.2, 2008.

César, I. C.; Braga, F. C.; Soares, C. D. V.; Nunan, E. A.; Barbosa, T. A.F.; Campos, L. M. M. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 616-625, 2007.

César, I. C.; Braga, F. C.; Soares, C. D. V.; Nunan, E. A.; Barbosa, T. A.F.; Campos, L. M. M. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 616-625, 2007.

Chabariberi, R. A. O.; Pozzi, A. C. S.; Zeraik, M. L.; Yariwake, J. H. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 860-864, 2008.

Chaves, J. S.; Da Costa, F. B.; Freitas, L. A. P. D. Development of enteric coated tablets from spray dried extract of feverfew (*Tanacetum parthenium* L:). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 573-584, 2009.

Chen, S.; Peng, H. M.; Webster, R. D.; Infrared and UV-vis spectra of phenoxonium cations produced during the oxidation of phenols with structures similar to vitamin E. **Electrochimica Acta** 55 (2010) 8863–8869.

Chen, X. J., Guo, B. L., Li, S. P., Zhang, Q. W., Tu, P. F., & Wang, Y. T. Simultaneous determination of 15 flavonoids in *Epimedium* using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography. A**, 1163(1-2), 96-104, 2007.

Chen, Y e Sørensen, L. K. Determination of marker constituents in radix *Glycyrrhizae* and radix *Notoginseng* by near infrared spectroscopy. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 367, n. 5, p. 491-6, 2000.

Ciolo, R. Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC, 1ª ed., São Paulo, p. 8, 1998.

Corrêa, P. C.; Júnior, P. C. A.; Stringheta, P. C. Estudo do fenômeno de adsorção de água e seleção de modelos matemáticos para representar a higroscopicidade do café solúvel. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.2, n.1, p.19-25, 2000.

Cruz, R.J.; Elizabeth Regina de Castro Borba, E. R. C.; Moreno, A. J. D, Freire, P. T. C. *Luffa operculata* (L.) cogn.: Influência de fatores ambientais. **Universidade Regional do Cariri-URCA caderno de cultura e ciência**. v.1, n.1, p. 41-45, 2006

Cunha-Filho, M. S. S., Sá-Barreto, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.

Da Costa, R. S.; Ozela, E. F.; Barbosa, W. L. R.; Pereira, N. L.; & Júnior, J. O. C. S. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (*spray-drying*) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira Farmácia**, v. 90, n. 3, p. 169-174, 2009.

Da Silva, S. A.; Souza, A. G.; Da Conceição, M. M.; Alencar, A. L. S.; Prasad, S.; Cavalheiro, J. M. O. Estudo termogravimétrico e calorimétrico da algaroba. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 460-464, 2001.

De Almeida, A. A. Uso de métodos quimiométricos e otimização das condições experimentais para análise de chás comerciais de *camellia sinensis*. Dissertação de Mestrado em Química dos Recursos Naturais, p. 62-65, Universidade Estadual de Londrina, 2006.

De Assis, C. M.; Moreno, P. R. H.; Young, M. C. M.; Campos, I. P. de A.; Suffredini, I. B. Morfoanatomia, Isolamento e avaliação da atividade biológica dos alcalóides majoritários de *Tabernaemontana angulata* Mart. ex Müll. Arg., Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 626-631, 2009.

De Simon, B. F.; Estrella, I.; Herndndez, T. Flavonoid separation by capillary electrophoresis. effect of temperature and pH. **Chromatographia**, v. 41, n. 7/8, 1995.

De Souza, T. P.; Martínez-Pacheco, R.; Gómez-Amoza, J. L.; Petrovick, P. R. Eudragit E as Excipient for Production of Granules and Tablets From Phyllanthus niruri L Spray-Dried Extract. **AAPS PharmSciTech**, v.8, n. 2, 2007.

Dedavid, B. A.; Gomes, C. I.; Machado, G. Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores, Porto Alegre : EDIPUCRS, 60 p. ISBN: 978-85-7430-702-2, 2007.

Degani, A. L. G.; Cass, Q. B.; Vieira, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, p. 21-25, 1998.

Deisingh, A. K. Pharmaceutical counterfeiting. **The Analyst**, v. 130, n. 3, p. 271-9, 2005.

Dias, M. O.; Hamerski, L.; Pinto, A. C. Separação semipreparativa de a e b-amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quim. Nova**, v. 34, v. 4, p. 704-706, 2011.

Endale, A.; Gebre-Mariam, T.; Schmidt, P. C. Granulation by roller compaction and enteric coated tablet formulation of the extract of the seeds of Glinus lotoides loaded on Aeroperl 300 Pharma. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 31-8, 2008.

Farmacopeia Brasileira. 5ª. ed. São Paulo: Atheneu; 2010.

Fiuza, T. S.; Rezende, M. H.; Sabóia-Morais, S. M. T.; Bara, M. T. F.; Tresvenzol, L. M. F.; De Paula, J. R. Caracterização farmacognóstica das folhas de Eugenia uniflora L (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 01 – 11, 2008.

Garcia-Amoedo, L. H.; Almeida-Muradian, L. B. Comparação de metodologias para a determinação de umidade em geléia real. **Química Nova**, Vol. 25, No. 4, 676-679, 2002.

González, F.; Pous, R. Quality control in manufacturing process by near infrared spectroscopy. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 13, n. 4-5, p. 419-23, 1995.

Hoffmann-ribani, R.; Rodriguez-amaya, D. B. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. **Química nova**, v. 31, n. 6, p.1378-1384, 2008.

Iosio, T.; Voinovich, D.; Perissutti, B.; Serdoz, F.; Hasa, D.; Grabnar, I.; Dall'Acqua, S.; Zara, G. P.; Muntoni, E.; Pinto, J. F. Oral bioavailability of silymarin phytocomplex formulated as self-emulsifying pellets. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 18, n. 6, p. 505-12, 2011.

Joubert, E.; Manley, M.; Botha, M. Evaluation of Spectrophotometric Methods for Screening of Green Rooibos (*Aspalathus linearis*) and Green Honeybush (*Cyclopia genistoides*) Extracts for High Levels of Bio-active Compounds. **Phytochemical Analyses**, v. 19, p. 169–178, 2008.

Klein, T.; Longhini, R.; Bruschi, M. L.; Mello, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

Leal, A. A. X.; Henriques, C. A.; Luna, A. S. Validação e estimativa da incerteza do método de determinação de fósforo por Espectrofotometria Uv-Vis. **Rev Anal**; 32: 28-34. 2008

Linden, R.; Sartori, S.; Kellermann, E.; Souto, A. A. Identificação de substâncias em análise toxicológica sistemática utilizando um sistema informatizado para cálculo de parâmetros cromatográficos e busca em bases de dados. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 468-475, 2007.

Lopes, G. C.; Sanches, A. C. C. De Toledo, C. E. M.; Isler, A. C.; De Mello, J. C. P. Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, 2009.

Lu, Y.; Zhang, X.; Lai, J.; Yin, Z.; Wu, W. Physical characterization of meloxicam- β -cyclodextrin inclusion complex pellets prepared by a fluid-bed coating method. **Particuology**, v. 7, p. 1–8, 2009.

Maia, A. I. V.; Torres, M. C. M.; Pessoa, O. D. L. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* E *Vernonia brasiliana*: Composição química e atividade biológica. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 584-586, 2010.

Maluf, D. F.; Pontarolo, R.; Cordeiro, G. A.; Nagata, N.; Peralta-Zamora, P. Determinação de sibutramina em formas farmacêuticas através de espectroscopia no infravermelho com refletância difusa e métodos de calibração multivariada. **Química Nova.**, v. 33, n. 3, p. 649-652, 2010.

Mendez, A. S. L.; Simionato, N. O.; Valduga, A. T.; Reginatto, F. H. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.**, v. 32, n.1, p. 105-111, 2011.

Migliato, K. F.; Moreira, R. R. D.; Mello, J. C. P.; Sacramento, L. V. S.; Corrêa, M. A.; Salgado, H. R. N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007.

Mioto, R. **País deixa de gerar US\$ 5 bi por ano com fitoterápicos**. Disponível em: <http://www.abifisa.org.br/noticias_ver.asp?news=3594>. Acesso em: Agosto 2011.

Müller, S. D.; Vasconcelos, S. B.; Coelho, M.; Biavatti, M. W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 399–403, 2005.

Nery, C. G. C.; Pires, M. A. S.; Pianetti, G. A.; Vianna-Soares, C. D. Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p. 61, 2008.

Nunes, K. M.; Barbosa, W. L. R.; Ozela, E. F.; Júnior, J. O. C. S. Padronização da Tintura de *Calendula officinalis* L. para seu Emprego em Formulações Semi-sólidas Fitoterápicas. **Latin American Journal of Pharmaceutics**, v. 28, n. 3, p. 344-50, 2009.

Oliveira, O. W. Parâmetros de produção e caracterização de produto seco de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek – celastraceae – em torre de secagem por aspersão. Dissertação de mestrado, 94 p., Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

Oliveira, O. W.; Petrovick, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

Öztürk, M.; Duru, M.E.; Ince ,B.; Harmandar ,M.; Topçu, G. A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1352-1356, 2010.

Pena, E. Q.; Vieira, C.B.; Da Silva, C. A.; Seshadri, V. Araújo, F. G. S. Caracterização dos parâmetros de porosidade de concentrados de minérios de ferro pelo método de adsorção de nitrogênio. **Tecnologia em Metalurgia e Materiais**, 2008, v.4, n.4, p. 53-57.

Petrovick, G. F.; Petrovick, Pedro R. e Bassani, V. L. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae: development of granules from spray dried powder. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 796-803, 2010.

Quintão, N. L. M.; Meyre-Silva, C.; Silva, G. F.; Antonialli, C. S.; Rocha, L. W. Lucinda-Silva, R. M.; Malheiros, A.; Souza, M. M.; Filho, V. C.; Bresolin, T. M. B. *Aleurites moluccana* (L.) Willd. Leaves: Mechanical Antinociceptive Properties of a Standardized Dried Extract and Its Chemical Markers. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2011, p. 179890, 2011.

Resolução - RDC Nº 14, de 31 de Março de 2010.

Rocha, F. R. P.; Teixeira, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, n.5, p. 807-812. 2004

Silva, M. A., Sumitami, J. S. A., Vilegas, W.; Santos, L. C.. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 319–324, 2007.

Sousa, S. A.; Alves, S. F.; Paula, J. A. M.; Fiuza, T. S.; Paula, J. R.; Bara, M. T. F. Determinação de taninos e metilxantinas no guaraná em pó (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 866-870, 2010.

Silva, R.M.F. *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.): Obtenção Tecnológica de Formas Farmacêuticas. **Tese de doutorado**. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010, 186 p.

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, n. 3, p. 435-440, 2010.

Spaniol, B.; Bica, V. C.; Ruppenthal, L. R.; Volpato, M. R.; Petrovick, P. R. Compressional behavior of a mixture of granules containing high load of *Phyllanthus niruri* spray-dried extract and granules of adjuvants: comparison between eccentric and rotary tablet machines. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 3, p. 1013-23, 2009.

Toledo, A. C. O.; Hirata, L. L.; Buffon, M. C. M.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta*, v. 21, p. 7-13. 2003.

Valladão, F. N.; Miranda, R. S. M.; Vale, F. H.; Valladão, S. A.; Silva, G.D. F.; Duarte, L. P.; Carvalho-okano, R. M.; Messias, M. C. T. B.; Viera filho, S. A. Four Brazilian *Maytenus salicifolia* Reissek (Celastraceae) groups studied by TLC and UV/Vis spectrophotometry. **Rev. bras. farmacogn.** vol.19 no.3 João Pessoa July/Sept. 2009.

Vieira, M. G. S.; De Freitas, J. V. B.; Neto, M. N. de L.; Gramosa, N. V. Constituintes químicos voláteis das folhas e galhos de *Zanthoxylum syncarpum* Tull. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p.391-393, 2009.

Volpato, A. M. De M. Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico. Tese de doutorado em química, 115 p., Universidade Federal do Paraná, 2005.

Wang, L.; He, Y.; Qiu, Z. C.; Wang, X. R.; Lee, F. S. C. Determination of glycyrrhizic acid in *glycyrrhiza uralensis* fisch by fiber optic near infrared spectroscopy. **Spectrosc. Spectral Anal.**, v. 25, n. 9, p. 1397-1399, 2005.

Wang, L.; Lee, F. S. C. e Wang, X. Near-infrared spectroscopy for classification of licorice (*Glycyrrhizia uralensis* Fisch) and prediction of the glycyrrhizic acid (GA) content. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 83-88, 2007.

Woo, Young-Ah; Kim, Hyo-Jin; Cho, J. Identification of Herbal Medicines Using Pattern Recognition Techniques with Near-Infrared Reflectance Spectra. **Microchemical Journal**, v. 63, n. 1, p. 61-70, 1999.

Woo, Young-Ah; Kim, Hyo-Jin; Ze, Keum-Ryon; Chung, H. Near-infrared (NIR) spectroscopy for the non-destructive and fast determination of geographical origin of *Angelicae gigantis* Radix. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 36, n. 5, p. 955-9, 2005.

Yan, Ming-Ming; Liu, Wei; Fu, Yu-Jie; Zu, Yuan-Gang; Chen, Cai-Yun; Luo, Meng. Optimisation of the microwave-assisted extraction process for four main astragalosides in *Radix Astragali*. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1663-1670, 2010.

Zhu, H.; Wang, Y.; Liu, Y.; Xia, Y.; Tang, T. Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV–Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. **Food Analytical Methods**, v. 3, n. 2, p. 90-97, 2009.

4. Capítulo II

4.1. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS EXTRATIVOS NOS TEORES DE CANFERITRINA E FLAVONÓIDES TOTAIS EM EXTRATOS DE FOLHAS DE *Bauhinia forficata* Link.

4.1.1 Artigo II – Avaliação da influência dos métodos extrativos nos teores de canferitrina e flavonóides totais em extratos de folhas de *Bauhinia Forficata* Link

Artigo submetido ao journal of agricultural and food chemistry

AValiação DA INFLUêNCIA DOS MÉTODOS EXTRATIVOS NOS TEORES DE CANFERITRINA E FLAVONÓIDES TOTAIS EM EXTRATOS de FOLHAS DE *Bauhinia forficata* Link.

Magaly Andreza Marques Lyra¹, Monize Santos Peixoto¹, Rebeqa Priscila Maranhão Monteiro¹, Matheus Alves Angelos¹, Graziella Silvestre Marques¹, Larissa Araújo Rolim¹, Miracy Muniz de Albuquerque³, Luiz Alberto de Lira Soares², Pedro José Rolim-Neto¹

¹Laboratório de Tecnologia dos medicamentos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

²Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

³Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, Departamento de Ciências Farmacêuticas.

RESUMO

Bauhinia forficata Link é uma espécie nativa da América do Sul bastante utilizada no tratamento da diabetes mellitus, devido à atividade antidiabética atribuída aos compostos flavonoídicos, principalmente o marcador canferitrina, presente nas folhas deste material vegetal. O objetivo do trabalho foi avaliar a influência das condições de extração no teor de canferitrina e teor de flavonoides totais. Os métodos avaliados foram percolação, maceração, aquecimento a 50°C, agitação a 200 rpm e agitação a 200 rpm com aquecimento a 50° C. A extração com agitação a 200 rpm, aquecimento a 50°C apresentou maior eficiência na extração de canferitrina e flavonoides totais. O melhor método foi otimizado avaliando os parâmetros massa planta/massa solvente, temperatura, teor de álcool do solvente extrator, velocidade de agitação.

Palavras-chave: métodos extrativos, canferitrina, flavonoides.

ABSTRACT

Bauhinia forficata Link is a native species from South America. The content of kaempferitrin in leaves of *B. forficata* L. is an important marker for quality control of the raw material, since this marker is only present in the leaves of this plant. The influence of extraction conditions on the content of Kaempferitrin and total flavonoids was evaluated. The methods were percolation, maceration, heating to 50 °C, stirring at 200 rpm, stirring and heating. The extraction with stirring at 200rpm and heating to 50°C had higher efficiency in the extraction of total flavonoids and kaempferitrin. The best method was optimized by evaluating the parameters mass plant/ mass solvent, temperature, alcohol content in the extractive solvent and stirring speed.

Keywords: Extractive methods, kaempferitrin, flavonoids.

INTRODUÇÃO

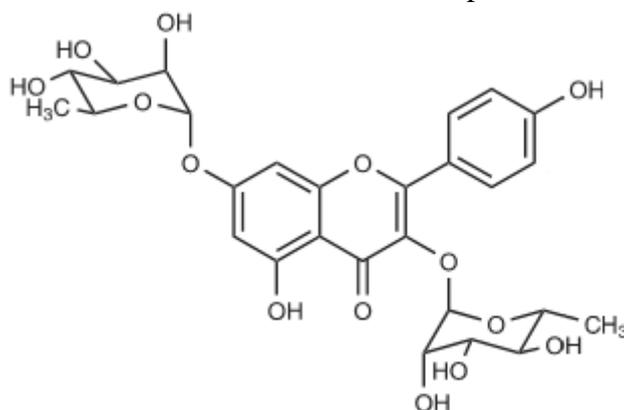
As plantas medicinais possuem uma longa história de uso tradicional, amplamente difundida tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos na busca por moléculas complexas que têm atividade biológica benéfica (Chaves, Costa & Freitas, 2009; Yu et al., 2006).

No Brasil, programas oficiais de saúde têm incentivado a exploração e/ou a produção sustentada de espécies medicinais, que vem sendo gradativamente implementados por muitos governos estaduais e municipais (Borgo et al, 2010). Dentre as espécies medicinais relacionadas pelo Ministério da Saúde com grande potencial para torna-se fitoterápico, figura a *Bauhinia forficata* Link (Brasil, 2011) conhecida tradicionalmente na medicina popular brasileira como pata-de-vaca (Da Cunha et al, 2010).

B. forficata L. é uma planta arbórea da família Fabaceae (Leguminosae) que se encontra distribuída na Ásia e bem adaptada e desenvolvida em várias regiões do Brasil (Oliveira et al, 2005; Jorge et al, 2004). O gênero *Bauhinia* é bastante amplo, com cerca de 300 espécies, das quais 200 são brasileiras. Muitas delas são utilizadas como hipoglicemiantes e dentre tais espécies, *B. forficata* Link é bastante empregada com esse fim (Tzeng et al., 2009).

De acordo com Sousa et al. (2004), o efeito hipoglicêmico e potencial antioxidante em *B. forficata* Link é devido a presença de flavonóide canferitrina (canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo) (Figura 1), sendo confirmado o potencial antidiabético por outros autores (Da Cunha et al, 2010; Pepato et al., 2004; Jorge et al, 2004).

Figura 1 - Estrutura química do canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo (canferitrina).



A obtenção de soluções extrativas padronizadas a partir de drogas vegetais representa uma etapa imprescindível para o desenvolvimento de um fitoterápico, esta padronização

geralmente é realizada com base no teor de uma substância marcadora presente no extrato, indicando que se a mesma estiver presente em quantidade adequada, os demais componentes também estarão igualmente representados. Isto porque, na etapa de extração, os diversos componentes ativos das plantas medicinais devem ser preservados, a fim de garantir sua ação farmacológica (Klein et al, 2009).

Diferentes técnicas de extração têm sido publicadas (Stecher et al., 2006), desde os métodos mais simples tais como maceração, percolação, a digestão, às mais exaustivas e sofisticadas, como a extração com fluido supercrítico, extração de líquido pressurizado, extração assistida por microondas, e várias outras modificações dos mesmos (Sultana et al., 2008).

Desta forma, a avaliação de métodos extrativos e otimização de parâmetros do seu processo, visa melhorar a eficiência da extração dos princípios ativos contidos em plantas medicinais (Meyer, 2008). O processo de otimização envolve a análise da extração sob condições diversas, tais como: comparação entre métodos, temperatura de extração e emprego de diferentes líquidos extratores ou agitação a fim de aumentar a solubilidade de compostos presentes na matriz vegetal (Longhini et al., 2007).

Portanto, o presente trabalho teve por objetivo contribuir para o desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas, a partir de folhas de *B. forficata* L., visando otimizar o teor de flavonóides totais e canferitrina, selecionados como marcadores farmacológicos, através da avaliação dos seguintes processos extrativos: maceração, percolação, extração com agitação, extração com aquecimento e extração com agitação e aquecimento. Assim como, após seleção do método extrativo mais eficiente foram analisados os seguintes parâmetros para otimização da técnica: teor de massa de planta/massa do solvente, teor alcoólico da solução extrativa e velocidade de agitação.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As folhas de *B. forficata* L. foram obtidas em Telêmaco Borba – PR e coletado em abril/2010 na Fazenda Monte Alegre e gentilmente cedido pelo fornecedor Klabin do Paraná Produtos Florestais Ltda, sendo a identificação botânica e depósito de exsicata realizado no Herbário da Universidade Estadual do Maringá, sob registro nº 150 e confirmada no Jardim

Botânico do Rio de Janeiro – RJ, Brasil, pela especialista em identificação de espécies do gênero *Bauhinia*, Ângela Vaz.

O material vegetal foi submetido à secagem em estufa industrial, a uma temperatura de 40°C, durante 52 h, e posteriormente, pulverizadas em Moinho de Marca D'Andrea Martel. A caracterização do pó vegetal foi realizada segundo os parâmetros: análise granulométrica, perda por dessecação, teor de cinzas e teor de extrativos, análises estas importantes para padronização da matéria-prima vegetal (Marques et al., 2011a).

Reagentes e vidrarias

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: ácido fosfórico, acetonitrila grau cromatográfico e etanol (Dinâmica[®]). Cloreto de alumínio (AlCl₃) (Vetec[®]), etanol 70%, Água destilada e ultrapurificada (Millipore-Q-Gard[®]1, USA). . Como padrão de flavonóide, utilizou-se canferitrina, que foi gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. Maique Weber Biavatti (Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis / SC). Utilizaram-se vidrarias volumétricas calibradas com certificado de calibração por lote do fabricante Satelit[®].

Equipamentos

Os equipamentos utilizados no estudo foram balança analítica Bioprecisa[®], modelo FA2104N, banho maria digital com sistema de aquecimento Nova Ética[®], agitador mecânico Marconi[®] modelo MA259, espectrofotômetro UV-Vis mini- 1240 Shimadzu[®], reator de aço inoxidável de 5L marca Lufenco[®], percolador de bancada de aço inoxidável de 1L. As análises por CLAE foi realizada em cromatógrafo a líquido Shimadzu[®] (UFLC, Japão) controlado pelo Software LC Solution 1.0 e constituído por bomba LC-20 AT, degaseificador DGU – 20A₅, injetor automático Sil- 20A e detector de arranjo de diodos (DAD) SPD – M20A.

Métodos extrativos

As amostras foram preparadas a partir de 167,0 g do material vegetal e 1000 mL de solução hidroalcoólica 70%. As soluções extrativas foram obtidas pelos métodos de maceração (método I), percolação (método II), extração com agitação (método III), extração com aquecimento (método IV) e extração com agitação e aquecimento (método V). Os

extratos obtidos foram resfriados à temperatura ambiente (25°C) e filtrados em algodão. As amostras foram preparadas em triplicata.

Nos processos extrativos de percolação e maceração, a droga vegetal ficou em contato com o solvente por 7 dias em equipamento correspondente (Silva, R.M.F, 2010). Na extração com aquecimento utilizou-se a temperatura em 50°C, já na extração com agitação à temperatura ambiente foi utilizada uma rotação de 200 rpm e na extração por aquecimento e agitação utilizaram-se estas mesmas condições de temperatura e agitação, sendo o tempo de extração 1 hora para os três métodos.

Otimização do método extrativo

Avaliação do teor massa de planta (mp)/ massa do solvente (ms) , do teor alcoólico e da velocidade de agitação

Após seleção do melhor método extrativo, foram avaliados os seguintes parâmetros: teor de *mp/ ms* nas proporções 1:5 (m/v) e 1:10 (m/v), concentração de etanol na solução extrativa (0, 30, 50 e 70%) e velocidade de agitação (150, 200, 300 rpm), para avaliar a influência das condições de extração nos Teor de Flavonoides Totais (TFT) e Canferitrina (CNF).

Avaliação dos interferentes lipofílicos

O efeito dos interferentes lipofílicos no TFT das soluções extrativas foi avaliada em função do teor alcoólico do líquido extrator, comparando-se os teores das preparações a 50 e 70% (v/v) etanol:água (Petry et al., 1998). A metodologia de extração foi a mesma descrita para a obtenção da solução extrativa

O pré-tratamento das amostras, visando a retenção de interferentes lipofílicos, foi feito por extração em fase sólida Strat Phenomenex® (C18E 80 mg/mL) e ativada com 3 mL da solução hidroetanólica de respectiva concentração. Para cada extrato foram utilizados alíquotas de 2,8 mL e colocadas na coluna C18E 80 mg/mL com eluição de 3mL da solução hidroetanólica para a obtenção da fração A e posteriormente a adição no mesmo cartucho de 3 mL de éter de petróleo para a obtenção da fração B (Muller, 2006; Martins et al., 2008).

As amostras foram diluídas nas concentrações de leitura previamente definidas e analisadas por espectrofotometria de acordo com a metodologia de TFT. O mesmo procedimento foi repetido para a obtenção de ambas as frações, sem a adição de AlCl₃, para a

obtenção das soluções de compensação. Os espectros de absorção da fração A e B, na faixa de 200 a 500 nm, foram obtidos 30 min após a adição de AlCl_3 .

Caracterização das soluções extrativas de *B. forficata*

Determinação do pH

O pH da solução extrativa foi determinado em potenciômetro (Micronal B474) calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0. O resultado foi calculado pela média de três determinações (Farmacopeia Brasileira, 2010).

Determinação da densidade

A solução extrativa foi adicionada em picnômetro de 25 mL pesado antes e após o enchimento. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram obtidos pelo quociente da massa da solução extrativa pelo volume ocupado no picnômetro (Farmacopéia Brasileira, 2010).

Estabilidade da solução extrativa

As soluções extrativas foram armazenadas em local protegido da luz na temperatura ambiente e avaliada quanto ao TFT a cada 24 horas por 5 dias.

Avaliação do Resíduo Seco (RS)

Amostras de 20 g da solução extrativa foram colocadas em pesa-filtros previamente tarados. Após evaporação em banho-maria, sob agitação ocasional, os pesa-filtros foram colocados em estufa a 105°C por 2 horas, resfriados em dessecador e, então, pesados (Farmacopeia Brasileira, 2011). Este procedimento foi repetido até obtenção de peso constante. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Avaliação do TFT

A determinação do TFT foi realizada pelo método espectrofotométrico Vis, de acordo com a metodologia desenvolvida e validada por Marques et al., 2011b. Alíquotas da solução

extrativa foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, onde se adicionaram 2,0 mL de solução etanólica de AlCl_3 (2,5%, m/v). Em seguida, ajustou-se o volume com a solução hidroalcoólica (40%, v/v). Após 30 min da adição da solução de cloreto de alumínio, a absorbância foi medida a $\lambda = 408$ nm. Utilizou-se como branco a solução extrativa após diluição, sem adição de cloreto de alumínio. O teor de flavonóides foi expresso em quercetina. calculado segundo a equação 1 (De Souza et al., 2010).

$$\text{TFT} = A \cdot \text{FD} / e \cdot m \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde A é a absorvância lida, FD é o fator de diluição da amostra, m é a massa da solução extrativa (g), e = $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 500$, absorção específica do complexo AlCl_3 - quercetina.

Avaliação do teor de Canferitrina (CNF)

Preparação da amostra

Uma alíquota de 3,0 mL da solução extrativa foi transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL, a qual foi diluída com solução etanólica 40 % (v/v).

Obtenção da solução padrão

Preparou-se uma solução etanólica do padrão CNF a 50,0 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas desta solução foram diluídas em etanol para obter as concentrações de 3,0; 5,0; 7,0; 10,0; 13,0 e 15,0 $\mu\text{g/mL}$.

A determinação de CNF foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de acordo com a metodologia desenvolvida e validada por Marques et al., 2011b. Empregou-se uma pré-coluna C_{18} Restek[®] (10 mm \times 4mm, 5 μm) e uma coluna C_{18} Restek[®] (250 mm \times 4,6 mm, 5 μm), mantida a 40 °C. Os padrões e as amostras foram eluídos através de um gradiente de fase móvel composta por ácido fosfórico:água 0,02% (v/v) (pH = 2,5) (A) e acetonitrila (B) como descrito na tabela 1. O fluxo foi de 1 mL/min e o volume de injeção de 20 μL . A capacidade extrativa de CNF foi calculada de acordo com a equação 2, resultante da equação da curva padrão.

$$\% = (A+482,81)/31140 \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde A corresponde a área do cromatograma.

Tabela 1 - As condições de gradiente da fase móvel composta por ácido fosfórico: água 0,02% (pH = 2,5) (A) e acetonitrila (B).

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	85	15
5	85	15
5.01	85	15
30	70	30
30.01	70	30
32.00	80	20
32.01	80	20
35	85	15

Análise estatística

Para acompanhamento do experimento foram obtidos os desvios padrão (dp) e os coeficientes de variação (CV%). O teor de CNF e flavonoides totais obtidos através dos diferentes métodos extrativos foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação dos Métodos extrativos

Na avaliação de processos extrativos em materiais vegetais é de suma importância a utilização de técnicas analíticas modernas que possibilitem resultados rápidos, confiáveis, de baixo custo e seguros a laboratórios de pesquisa e produção (Silva; Aragão, 2009). No entanto, a determinação clássica espectrofotométrica do TFT, tem sido complementada com a CLAE no doseamento de flavonoides em extratos vegetais, a qual tem se destacado bastante (Rodrigues; Gonçalves; Silva, 2004).

Diante dos critérios avaliados para a escolha do melhor método extrativos (maiores teores de CNF e flavonóides totais e % RS), estão descritos na Tabela 2 os resultados da análise das soluções extrativas obtidas pelos diferentes métodos.

A determinação do RS, TFT e CNF demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa entre todas as soluções extrativas analisadas ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$).

Tabela 2 - Resultados do TFT e CNF e da % de RS obtidos por diferentes métodos extrativos.

	Teor de CNF ($\mu\text{g/mL}$) \pm dp	TFT (mg/mL) \pm dp	Resíduo seco (%) \pm dp
Método I	10,05 \pm 0,30	1,67 \pm 0,03	4,75 \pm 0,01
Método II	9,39 \pm 0,65	1,47 \pm 0,01	4,08 \pm 0,01
Método III	4,47 \pm 0,12	0,97 \pm 0,01	1,70 \pm 0,01
Método IV	4,57 \pm 0,24	1,06 \pm 0,02	2,65 \pm 0,01
Método V	11,62 \pm 0,11	2,03 \pm 0,02	5,09 \pm 0,01

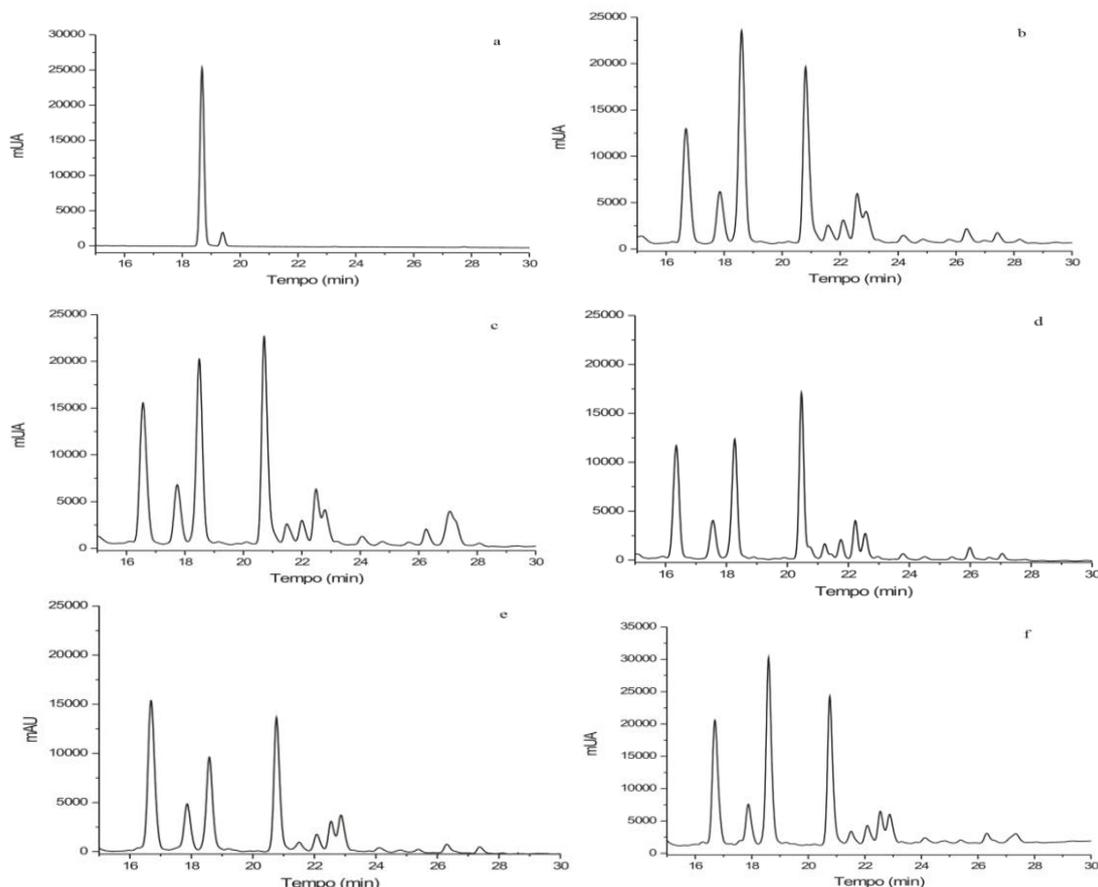
Comparando-se os métodos de extração I a III, que têm em comum a extração sem aquecimento, com os métodos IV e V, que utiliza calor na extração dos metabólitos, o método V mostrou-se o mais eficiente diante dos maiores teores de CNF e flavonóides totais, o que está provavelmente relacionado ao somatório de efeito das duas variáveis (agitação e aquecimento). O RS apresentou aumento proporcional aos teores de CNF e TFT, se destacando também com a maior % no método V.

Comparando-se os métodos III, IV e V, observa-se que as variáveis (agitação e aquecimento) quando aplicadas isoladamente apresentam baixa extração de flavonóides totais e CNF, porém quando associadas (método V) ocorre incremento em mais de 100% na extração de CNF e em mais de 85% o TFT quando comparada aos métodos III e IV.

A determinação do RS, TFT e CNF demonstrou que houve diferença significativa entre todas as soluções extrativas analisadas ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$).

Na análise cromatográfica do marcador CNF, evidenciou-se um pico no tempo de retenção (t_r) de 18,2 min. A Figura 2 apresenta os cromatogramas do padrão e das soluções extrativas pelos diferentes métodos extrativos. A curva de calibração da CNF mostrou-se linear na faixa de concentração empregada, apresentando coeficiente de regressão (R^2) 0,9986 e equação da reta $y = 31140x - 482.87$.

Figura 2 - Perfil cromatográfico do padrão de CNF ($t_r = 18,20$ min) (a); Perfil cromatográfico dos flavonoides (CNF) presentes na *B. forficata* L. pelo método de maceração (b); percolação (c); extração com agitação (d) Extração com aquecimento (e) e extração com agitação e aquecimento (f).



Diante dos resultados, o método V que utilizou temperatura e agitação, foi o que mais extraiu flavonoides. Estes fatores influenciaram positivamente o deslocamento da constante de equilíbrio de saturação da solução extrativa, aumentando a solubilidade desses metabólitos secundários. Em relação ao tempo de extração, este método com apenas 1 hora de duração mostrou ser mais eficaz, rápido e viável industrialmente que os métodos tradicionais (métodos I e II) na extração de CNF e flavonóides totais.

Otimização do método extrativo

Avaliação da velocidade de agitação e da temperatura

Os resultados do TFT da variação da velocidade de agitação e temperatura do método de extração V estão apresentados na Tabela 3. Através de análise por ANOVA verificou-se

que não houve diferença estatística entre as velocidades 150, 200 e 300 rpm, sendo selecionada a velocidade 200 rpm, pois a 150 rpm, o equipamento funciona em sua capacidade mínima. Não houve diferença estatística significativa na variação das temperaturas analisadas (40, 50 e 60°C) optando-se pela menor temperatura, haja vista a labilidade de ligações glicosídicas (Keinänen, 1993).

Na avaliação destes parâmetros, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas, por isso não foi avaliados por CLAE para o monitoramento da CNF.

Tabela 3 - Resultados do TFT sobre os parâmetros de velocidade de agitação e temperatura.

Parâmetro	(% p/p)	TFT (Média ± dp)
Velocidade de agitação	150	1,65 ± 0,02
	200	1,76 ± 0,01
	300	1,64 ± 0,01
Temperatura	(°C)	TFT (Média ± dp)
	40	1,86 ± 0,01
	50	1,97 ± 0,01
	60	1,86 ± 0,01

Avaliação do teor massa de planta (mp)/ massa do solvente (ms) e do teor alcoólico

Na Tabela 4 estão apresentados os percentuais de flavonoides totais e CNF extraídos diante da variação dos parâmetros teor mp/ms e teor alcoólico do solvente extrator. Em ambos os parâmetros foram verificadas diferenças estatísticas, sendo necessária a análise por CLAE para o monitoramento da CNF.

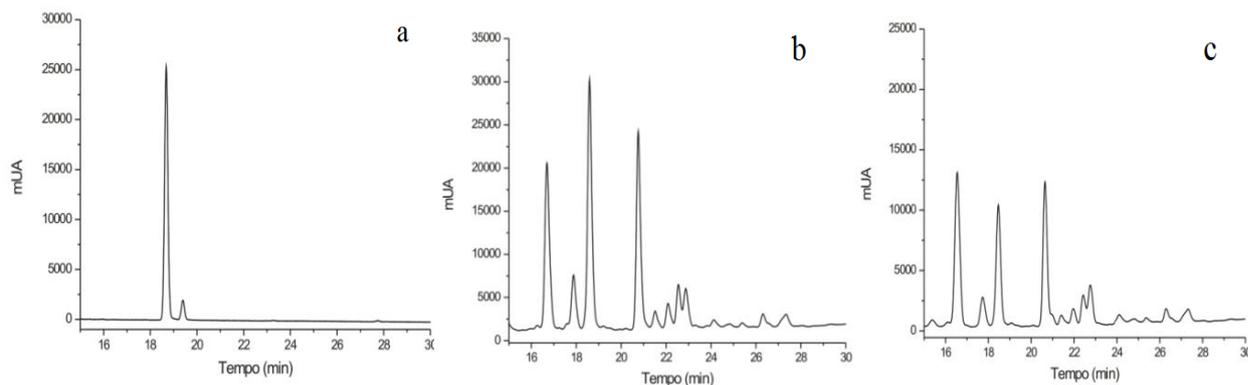
Tabela 4 - Resultados da variação do TFT e teor de CNF sobre os parâmetros teor de mp/ms e teor alcoólico do líquido extrator.

Parâmetro	(% p/p)	TFT (Média ± dp)	CNF (Média ± dp)
Teor de mp/MS	01:05	1,85 ± 0,02	11,62 ± 0,08
	01:10	0,97 ± 0,01	4,91 ± 0,05
Teor alcoólico	(°GL)		
	30	1,44 ± 0,03	6,24 ± 0,23
	50	1,87 ± 0,01	13,14 ± 0,43
	70	2,03 ± 0,05	11,62 ± 0,11

Na avaliação da proporção mp/ms verificou-se que assim como a CNF a quantidade de flavonoides extraídos, aumenta com a aumento da relação mp/ms, indicando que não houve

saturação do solvente na proporção mp/ms 01:05 (Figura 3). Esta proporção de mp/ms resultou em uma tintura 1:2. A obtenção de extrato fluido não foi possível devido à molhabilidade incompleta do pó de folhas ao aumentarmos a proporção mp/ms.

Figura 3 - Perfil cromatográfico do padrão CNF (a), da proporção mp/ms 01:05 (b) e da proporção mp/ms 01:10 (c).



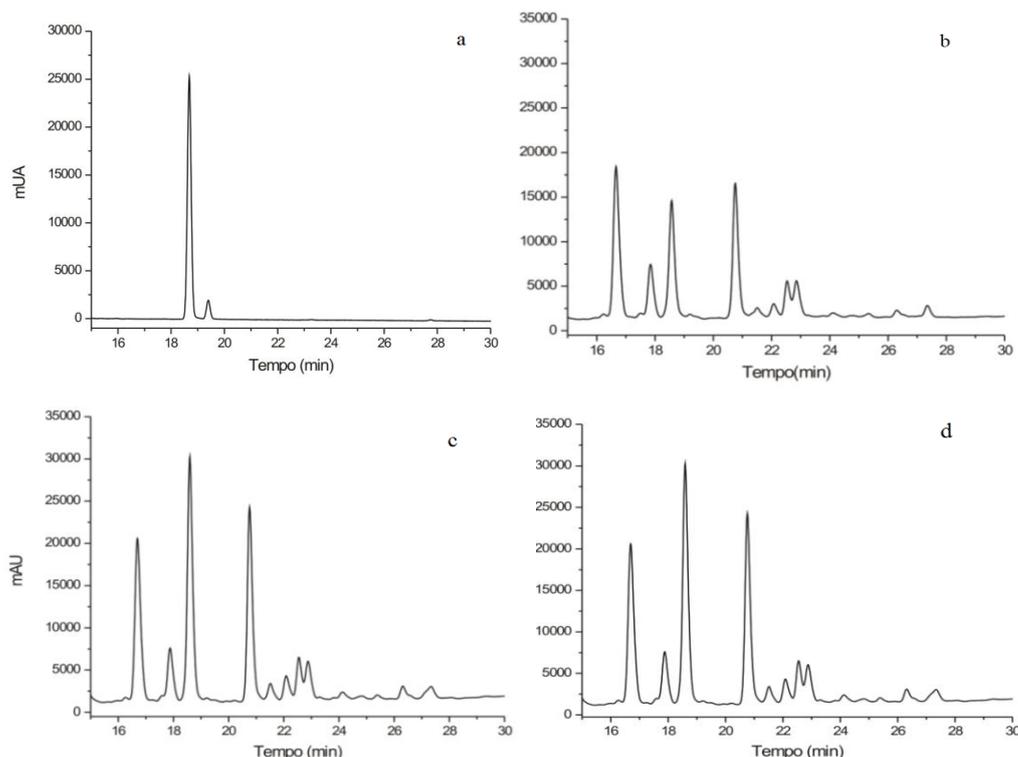
A resposta em relação à extração de CNF e flavonoides totais não foram semelhantes ao variar a proporção de etanol no líquido extrator, houve aumento do TFT com o aumento da graduação alcoólica, enquanto que houve redução do teor de CNF quando o teor alcoólico foi 70%.

A extração de princípios ativos a partir de insumos vegetais ocorre através da solubilização destes no líquido extrator, neste processo a constante dielétrica tem fundamental importância (Medeiros; Kanis, 2010). Quando analisamos a variação do teor alcóolico na extração da CNF, observamos que utilizando etanol 50% como líquido extrator houve incremento na extração de CNF em 110,57% quando comparado ao etanol 30%, já na utilização de etanol 70% houve redução de 11,57% na extração de CNF quando comparado ao solvente extrator etanol 50%

A utilização da solução hidroetanólica a 50% foi o que apresentou maior eficiência extrativa para CNF, uma vez que esta concentração de etanol proporcionou redução da constante dielétrica e conseqüente incremento na solubilidade das substâncias semi-polares como os flavonoides (Medeiros; Kanis, 2010; Silva; Aragão, 2009). O baixo teor de CNF com a solução hidroetanólica a 30% pode ter ocorrido devido à hidrólise química na presença de água, para isso a adição de solventes não aquosos de baixa toxicidade torna-se necessário para redução da degradação de compostos flavonoidicos (Keinänen, 1993).

Os cromatogramas dos extratos obtidos a partir da *B. forficata* L. (Figura 4) utilizando diferentes proporções de álcool demonstraram perfil químico semelhante.

Figura 4 - Perfil cromatográfico do padrão CNF (a), do teor alcoólico de 30° GL (b), de 50° GL (c) e de 70° GL (d).



Avaliação de Interferentes lipofílicos

Petry et al. (1998) observou aumento da interferência lipofílica em função do aumento do teor alcoólico do solvente extrator em folhas de *Passiflora alata*. Foram analisadas soluções extrativas com 20, 40 e 80% de etanol, as soluções preparadas com etanol a 20 e 40% não foram estatisticamente diferentes em relação ao TFT após tratamento em coluna de extração em fase sólida.

Diante dos autores que avaliaram a presença de interferentes lipofílicos em extratos vegetais, Petry et al. em folhas de *Passiflora alata*. observou um aumento da interferência lipofílica em função do aumento do teor alcoólico do solvente extrator, alterando o TFT após tratamento em coluna de extração em fase sólida¹⁹.

Ao analisarmos as soluções extrativas de *B. forficata* L. com 50 e 70% de etanol, não observamos evidências de interferentes lipofílicos no TFT com aumento do teor alcoólico

(Figura 5 e 6). Porém, a ausência de tal interferência não foi suficiente para explicar a falta de linearidade obtida entre a quantificação de flavonoides totais por espectrometria UV-Vis e a quantificação de CNF por CLAE frente a diferentes teores alcoólicos do solvente extrator, pois foi verificado que o TFT aumenta, mas não aumenta o teor de CNF.

Figura 5 - Espectro de absorção da fração hidroalcoólica 70% (a) e 50% (b) obtida por EFS de uma solução extrativa diluída de *B. forficata* L.

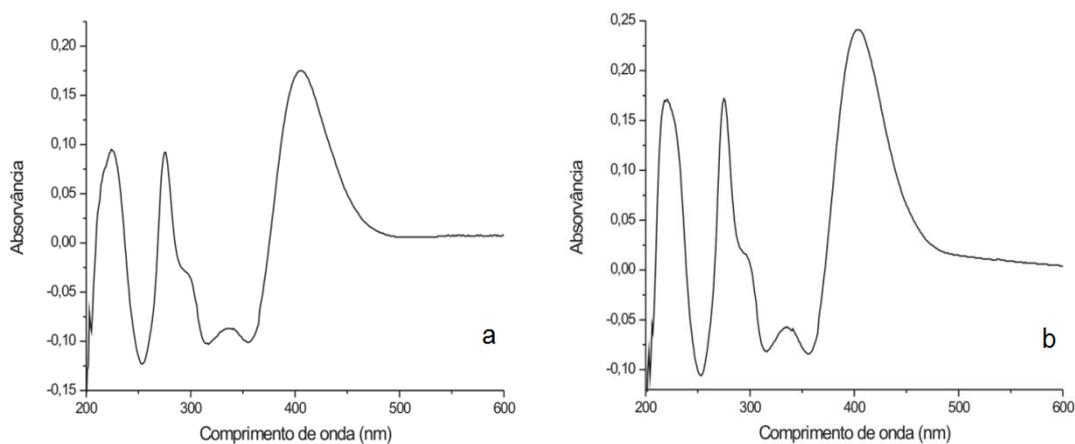
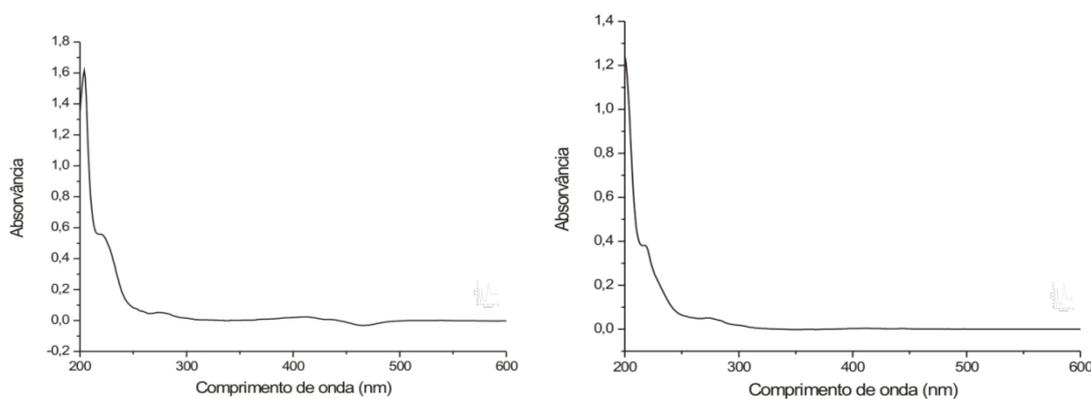


Figura 6 - Espectro de absorção da fração de éter de petróleo obtida por EFS de uma solução extrativa diluída hidroalcoólica 70% (a) e 50% (b) de *B. forficata* L.



Caracterização da solução extrativa

Os resultados da caracterização da solução extrativa obtido pelo método V nas condições otimizadas (50 °C, 200 rpm, 1:5 (mp/ms) e solução hidroetanólica 50%) estão apresentados na Tabela 5.

A determinação do pH foi importante para avaliar interferências na qualidade do extrato, pois o pH fornece indicativos gerais sobre a natureza química dos compostos

presentes na solução extrativa, no entanto, mudanças nestes valores podem acarretar em alterações na estabilidade de compostos flavonoidicos.

O valor de pH verificado na solução extrativa analisada foi 6,13, próximo a neutralidade, o que é bastante importante para a estabilidade dos compostos nos diferentes processos futuramente empregados.

A determinação da densidade é útil na monitorização da massa do extrato através do volume final da solução extrativa, geralmente antes de se iniciar um processo de secagem para obtenção de extrato seco.

A densidade da amostra analisada foi 1,014, valor próximo ao da água, a qual está presente nos extratos hidroetanólicos.

Tabela 5 - Resultados da caracterização da solução extrativa obtida pelo método nas condições otimizadas.

Parâmetro analisado	Média \pm dp
pH	6,13 \pm 0,02
Densidade relativa (g/mL)	1,014 \pm 0,003
RS (%)	4,75 \pm 0,02

O resíduo seco é um parâmetro importante na seleção de soluções extrativas, haja vista que no processo de secagem, o baixo teor de sólidos gera porosidade na partícula resultando em pós com baixa densidade e inadequados na formulação de formas farmacêuticas sólidas (Oliveira; Petrovick, 2010). Esses resultados indicam que o solvente constituído por 50% de etanol, foi capaz de extrair maiores teores de metabólitos da planta nas condições estabelecidas.

Estabilidade da solução extrativa

A solução extrativa apresentou TFT constante ao longo dos 5 dias de estudo, conforme demonstrado na Tabela 6. Não houve alterações significantes nas características organolépticas da solução extrativa, apenas leve precipitação que segundo a Farmacopeia Brasileira (2010) é aceitável desde que a composição do extrato não sofra modificações significativas.

Tabela 6. Estabilidade da solução extrativa durante dias.

Tempo (dia)	TFT (mg/mL \pm dp)
1	1,46 \pm 0,01
2	1,47 \pm 0,01
3	1,46 \pm 0,01
4	1,45 \pm 0,01
5	1,45 \pm 0,01

CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a metodologia de extração influencia diretamente o teor de CNF e o TFT em folhas de *B. forficata* L. Os parâmetros TFT, teor de CNF e RS foram críticos na seleção do método extrativo mais eficiente. A extração com agitação a 200 rpm e aquecimento a 40°C por 1 hora obteve maior eficiência de extração em menor tempo.

Na otimização do processo de extração as variáveis tempo de agitação e temperatura não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$), enquanto que as variáveis teor alcoólico e relação mp/ms diferiram significativamente. Os resultados são considerados úteis para um desenvolvimento em larga escala para extração de flavonoides a partir de folhas de *B. forficata* L., visto que o método de obtenção do extrato é rápido, conveniente e viável industrialmente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da FACEPE, do CNPQ e à Klabin do Paraná Produtos Florestais Ltda pelo fornecimento das folhas de *Bauhinia forficata* Link.

REFERÊNCIAS

Borgo, J.; Xavier, C. A. G.; Moura, D. J.; Richter, M. F.; Suyenaga, E. S. Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonoides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 1, p. 12-17, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, fevereiro de 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2011.

Chaves, J.S., Da Costa, F.B., Freitas, L.A.P. Development of enteric coated tablets from spray dried extract of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45 (3), 2009.

Da Cunha, A. M.; Menon, S.; Menon, S.; Couto, A. G.; Urger, C. B.; Biavatti, M. W. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. *Phytomedicine*, v. 16, p. 6-7, 2010.

Farmacopeia Brasileira, 5ª. ed., São Paulo: Atheneu; 2010.

Jorge, A. P.; Horst, H.; Sousa, E.; Pizzolatt, I M. G.; Silva, F. R. M. B. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. *Chemico-Biological Interactions*, v. 149, p. 89–96, 2004.

Keinänen, M. Comparison of methods for the extraction of flavonoids from birch leaves (*Betula pendula* Roth.) carried out using high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v.41, n.11, p.1986-1990, 1993.

Klein, T.; Longhini, R.; Bruschi, M. L.; Mello, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciência Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

Longhini, R.; Raksa, S. M.; Oliveira, A. C. P.; Svidzinski, T. I. E.; Franco, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 3, p. 388-395, 2007.

Martins, M. B. G.; Castro, A. A.; Cavalheiro, Alberto J. Caracterização anatômica e química de folhas de Jacaranda puberula (Bignoniaceae) presente na Mata Atlântica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, v. 18, n. 4, 2008.

Marques, G. S. *Desenvolvimento e avaliação de metodologias analíticas para quantificação de flavonóides totais e canferitrina em folhas de Bauhinia forficata link*. 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pernambuco, Recife. 2011.

Marques, G. S.; Lyra, M. A. M.; Monteiro, R.P.M.; Peixoto, M. S.; Leão, W. F.; Rolim Neto, P.J; Xavier, H. S.; Soares, L. A. L. Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. No prelo.

Marques, G. S.; Monteiro, R.P.M.; Leão, W. F.; Lyra, M. A. M.; Peixoto, M. S.; Rolim, L. A. R.; Rolim Neto, P. J; Xavier, H. S.; Soares, L. A. L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. *Química Nova*. No prelo.

De Medeiros, J. ; Kanis, L. A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 5, p. 96-802, 2010.

Meyer, M.D., Terry, L.A. Development of a Rapid Method for the Sequential Extraction and Subsequent Quantification of Fatty Acids and Sugars from Avocado Mesocarp Tissue. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 7439–7445.

Muller, S.D. *Influência de Diferentes Sistemas de Solventes no Processo de Extração de Calendula officinalis L. (Asteraceae)*. 2006. 72 p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. 2006.

Oliveira, C. Z., Maiorano, V.A., Marcussi, S., Sant'Ana, C.D., Januário, A.H., Miriam, V. L., Sampaio, S.V., França, S.C., Pereira, P.S., Soares, A.M. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *Journal of Ethnopharmacology*, 98, (2005), 213–216.

Oliveira, O.W.; Petrovick, P.R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

Petry, R. D.; De Souza, K. C. B.; Bassani, V. L.; Petrivick, P. R.; Ortega, G. Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcoólicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Porto Alegre, v. 70, n. 12, p. 7-9, 1998.

Pepato, M.T.; Baviera, A.M.; Vendramini, R.C.; Brunetti, I.L. Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Complementary and Alternative Medicine*, v. 4, 1-7, 2004.

Rodrigues, P.O.; Gonçalves, T.C., Silva, W.B. Influência de Diferentes Sistemas de Solventes no Processo de Extração de *Calendula officinalis L. (Asteraceae)*. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, v. 23, n. 1, p. 27-31, 2004.

Silva, I. D. D.; Aragão, C. F. S. Avaliação de parâmetros de extração da *Cinchona Vahl* por métodos farmacopéicos e não farmacopéicos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 3, p. 776-780, 2009.

Silva, R. M. F. *Peperomia pellucida L. (H.B.K.): Obtenção tecnológica de formas farmacêuticas*. 2010. 80 p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pernambuco, Recife. 2010.

Sousa, E. *et al.* Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3, 7-O(-)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 5, p. 829-832, 2004.

De Souza, A. P. T. B.; Barni, S. T.; Ferreira, R. A.; Couto, A. G. Desenvolvimento Tecnológico de Soluções Extrativas Hidroetanólicas das Flores de *Calendula officinalis L.* Empregando Planejamento Fatorial. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 29, n. 1, p. 13-21, 2010.

Stecher, G.; Bakry, R.; Feuerstein, I.; Huck, C. W.; Bonn, K.G. K. Phytoanalysis challenges and solutions. In *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical*

Issues; Teixeira de Silva, J. A., Ed.; Global Science Books: London, U.K., **2006**; Vol. 4, pp 109–130.

Sultana, T.; Stecher, G.; Mayer, R.; Trojer, L.; Qureshi, M.N.; Abel, G., Popp, M., Bonn, G.K. Quality Assessment and Quantitative Analysis of Flavonoids from Tea Samples of Different Origins by HPLC-DAD-ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 3444–3453

Tzeng, Y.M.; Chen, K.; Rao, Y.K., Lee, M.J. Kaempferitrin activates the insulin signaling pathway and stimulates secretion of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *European Journal of Pharmacology*, 607 (**2009**) 27–34.

Yu, J.; Dandekar, D.V.; Toledo, R.T.; Singh, R.K; Patil, B.S. Supercritical Fluid Extraction of Limonoid Glucosides from Grapefruit Molasses. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 6041-6045.

5. Capítulo III

5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO SECO POR LIOFILIZAÇÃO E PRODUTO SECO POR ASPERSÃO DE *Bauhinia forficata* Link.

5.1.1 Artigo III – Obtenção e caracterização físico-química do extrato seco por liofilização e produto seco por aspersão de *Bauhinia forficata* Link.

Artigo a ser submetido na Powder Technology

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO SECO POR LIOFILIZAÇÃO E PRODUTO SECO POR ASPERSÃO DE *Bauhinia forficata* Link.

Monize Santos Peixoto¹, Magaly Andreza Marques de Lyra¹, Matheus Alves Angelos¹, Rebeqa Priscila Maranhão Monteiro¹, Adriana Fernandes Campos², Fábio Santos de Souza³, Miracy Muniz de Albuquerque¹, Pedro José Rolim-Neto^{1*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

²Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba – UFPB

RESUMO

Bauhinia forficata Link (pata-de-vaca) consiste em um vegetal com efeitos antidiabético e potencial antioxidante, devido principalmente à presença de compostos flavonoídicos, em destaque a canferitrina. Extratos vegetais secos têm sido utilizados na obtenção de diferentes formas farmacêuticas. O objetivo deste artigo foi avaliar dois métodos de secagem, a liofilização e a secagem por aspersão, sobre as propriedades físico-químicas dos extratos secos de folhas de *B. forficata* Link por técnicas termogravimétricas, espectroscópicas, cromatográficas, dentre outras. O adjuvante de secagem utilizado na secagem por aspersão foi dióxido de silício coloidal na concentração de 20% (p/p). Não foi observada influência nas características dos constituintes do extrato após secagem por aspersão, em relação ao extrato fluido através das técnicas utilizadas. O extrato seco liofilizado apresentou elevada higroscopicidade. O conhecimento prévio das características físico-químicas dos extratos secos é importante para o desenvolvimento e controle de fitoterápicos, os quais são essenciais para garantir qualidade do medicamento.

Unitermos: *Bauhinia forficata*, métodos de secagem, extratos secos, caracterização.

ABSTRACT

Bauhinia forficata Link (cow's foot) consists of a plant with potential antioxidant and antidiabetic effects, mainly due to the presence of flavonoid compounds, highlighted kaemferitrin. Dried plant extracts have been used to obtain different dosage forms. The aim of this study was to evaluate two methods of drying, freeze drying and spray drying on the physicochemical properties of dry extracts of leaves of *B. forficata* Link by thermogravimetric, spectroscopy, chromatographic techniques, despite others. The adjuvant used for the spray drying process was colloidal silicon dioxide at a concentration of 20% (w/w). There was no influence on the characteristics of the constituents of the extract after spray drying in relation to the fluid extract with the techniques used. The lyophilized dried extract showed high hygroscopicity. Prior knowledge of the physico-chemical properties of dry extracts is important for the development and control of herbal medicines, which are essential to ensure quality of the product.

Keywords: *Bauhinia forficata*, drying methods, dried extracts, characterization.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são importantes fontes de medicamentos atualmente disponíveis no mercado com diversas propriedades terapêuticas, entre elas, cerca de 1200 espécies no mundo apresentam potencial antidiabético, em sua maioria pertencente às famílias Fabaceae, Asteraceae e Lamiaceae (TROJAN-RODRIGUES et al., 2012).

Bauhinia forficata Link (conhecida como pata-de-vaca devido ao aspecto característico bilobado das folhas), pertencente ao gênero *Bauhinia* e família Fabaceae (ANDRADE et al., 2011, VOLPATO et al., 2008), consiste em uma espécie com efeitos antidiabético e potencial antioxidante, comprovados através de diversos estudos realizados *in vitro* e *in vivo* (DA CUNHA et al., 2010; VOLPATO et al., 2008; MENEZES et al., 2007). Estas atividades são atribuídas principalmente à presença de compostos flavonoídicos, em destaque a canferitrina (canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo) (TZENG et al., 2009; JORGE et al., 2004).

Extratos vegetais secos têm sido utilizados como produtos finais e intermediários na obtenção de diferentes formas farmacêuticas, com o intuito de se obter maior concentração e homogeneidade de constituintes químicos, estabilidade físico-química e microbiológica, maior facilidade de padronização e melhores características tecnológicas (SILVA, 2006; VASCONCELOS et al., 2005).

Na obtenção de extratos secos, a escolha do processo de secagem é motivada pela potencialidade dos diferentes equipamentos secadores. Dentre as tecnologias utilizadas, tem-se a liofilização, aplicados à secagem de vários produtos naturais como frutas e vegetais (VANAMALA et al., 2005), e a secagem por aspersão, uma das técnicas de secagem mais difundidas na indústria de fitoterápicos, devido à sua estabilidade e possibilidade de controle das características do produto final (MOREIRA, 2009).

No entanto, os extratos secos geralmente são higroscópicos e tem baixas propriedades reológicas, de compressibilidade e compactabilidade. Por estas razões, faz-se necessário o uso de adjuvantes de secagem, em particular, o dióxido de silício coloidal que, por sua vez, alteram as características tecnológicas do produto e melhoram os rendimentos de extratos secos (GALLO et al., 2011; TUYEN, 2010).

A produção industrial de extratos secos estáveis e com boas propriedades de fluxo é um grande desafio para a indústria de fitomedicamentos, por isso, num método de secagem devem-se evitar alterações indesejáveis e manter a qualidade do produto seco, sendo necessário avaliar o efeito dos parâmetros operacionais nas propriedades físicas dos pós, para

ajudar a identificar as condições ótimas de secagem e seu efeito sobre características das partículas (LEÓN-MARTÍNEZ; MÉNDEZ-LAGUNAS; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, 2011).

A compreensão das propriedades dos pós é essencial na otimização do processo em termos de funcionalidade e custo. Sabe-se que as propriedades químicas e físicas de produtos, tais como solubilidade, porosidade, distribuição e tamanho das partículas, densidade dos pós e presença de umidade, podem ser influenciadas por diferentes técnicas de secagem (LIU, 2011).

Diversas ferramentas analíticas são utilizadas para caracterizar esses tipos de insumos farmacêuticos ativos, as quais são importantes no conhecimento prévio das características físico-químicas dos pós, possibilitando o controle adequado dos processos de produção, essencial para garantir qualidade do medicamento, assegurando sua eficiência e segurança (NERY et al., 2008; SOARES-SOBRINHO et al., 2009).

Devido à importância dos produtos secos de origem vegetal na produção de medicamentos fitoterápicos, esse estudo teve como objetivo avaliar a influência de dois métodos de secagem, a liofilização e a secagem por aspersão, sobre as propriedades físico-químicas do extrato de folhas de *Bauhinia forficata* Link. As ferramentas analíticas analisadas foram: espectrofotometria UV/Vis, cromatografia líquida de alta eficiência, análise térmica, microscopia eletrônica de varredura, tamanho de partícula, superfície específica, difração de raios-X, espectroscopia no infravermelho, características reológicas, teor de umidade e higroscopicidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As folhas de *B. forficata* L. foram coletadas em abril de 2010, na Fazenda Monte Alegre em Telêmaco Borba – PR e gentilmente cedidas pela Klabin do Paraná Produtos Florestais Ltda[®]. A identificação botânica e depósito de exsicata foram realizados no Herbário da Universidade Estadual do Maringá, sob registro nº150 e confirmada no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pela especialista em identificação de espécies do gênero *Bauhinia*, Ângela Vaz. As folhas foram secas em estufa industrial, a uma temperatura de 40°C, durante 52 h e, posteriormente, pulverizadas em moinho de facas D’Andrea Martel[®].

Obtenção da solução extrativa

A solução extrativa (SE) foi obtida através do método de extração otimizado com aquecimento a 40°C em banho-maria digital Nova Ética[®] e agitação a 200 rpm por 1 h, utilizando agitador mecânico Marconi[®] modelo MA259. As amostras foram preparadas a partir de 167 g do material vegetal e 1000 mL de solução hidroetanólica (50% v/v). O extrato foi resfriado à temperatura ambiente (25°C) e filtrado em algodão.

Caracterização da solução extrativa

Determinação do pH, densidade e avaliação do resíduo seco

O pH da solução extrativa foi determinado em potenciômetro (Micronal[®] B474) calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0. A densidade realizada com o auxílio de um picnômetro e o resíduo seco (RS) calculado com auxílio de pesa-filtro. Os resultados foram calculados pela média de três determinações e todos os procedimentos realizados segundo a Farmacopéia Brasileira 5ª edição.

Método analítico

Espectrofotometria Ultravioleta (UV)

A determinação do teor de flavonoides totais (TFT) foi realizada pelo método espectrofotométrico UV, de acordo com a metodologia desenvolvida e validada por MARQUES et al, em 2011.

As soluções das amostras do produto seco por aspersão de *Bauhinia forficata* 20%, 30% (PSA) e extrato seco liofilizado (ESL) foram obtidas a partir de diluições das soluções-mãe de concentrações baseando-se no resíduo seco de 4,77; 5,77 e 6,20% respectivamente. Alíquotas das soluções extrativas e das soluções do PSA e ESL foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, onde se adicionaram 2,0 mL de solução etanólica de AlCl₃ (2,5% m/v). Ajustou-se o volume, em seguida, com a solução hidroalcoólica (40% v/v). Após 30 min da adição da solução de cloreto de alumínio, a absorbância foi medida em comprimento de onda 408 nm. Foram utilizadas como branco as respectivas soluções extrativas, após diluição, sem adição de cloreto de alumínio. O teor de flavonóides foi expresso em quercetina e calculado segundo a equação 1(SOUZA et al., 2010).

$$\text{TFT} = A \cdot \text{FD} / e \cdot m \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde A é a absorbância lida, FD é o fator de diluição da amostra, m é a massa da solução extrativa (g), e = $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 500$, absorção específica do complexo AlCl₃- quercetina.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A curva-padrão foi preparada a partir de solução etanólica de canferitrina a 50 µg/mL. O preparo e o doseamento de todas as soluções extrativas na análise por CLAE procederam às mesmas condições descritas anteriormente. Todas foram previamente filtradas em membrana (Milipore®) com diâmetro nominal de poro de 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo, em triplicata.

O perfil cromatográfico dos extratos foi obtido utilizando o método validado por Marques (2011) em cromatógrafo a líquido Shimadzu® controlado pelo Software LC Solution 1.0 e constituído por bomba LC-20 AT, desgaseificador DGU – 20A₅, injetor automático Sil-20A e detector de arranjo de diodos (DAD) SPD – M20A. Empregou-se coluna C₁₈ Restek® (250 mm x 4,6 mm, 5µm), mantida a 40°C e protegida por uma pré-coluna C₁₈ Restek® (10 mm x 4mm, 5 µm). Os padrões e as amostras foram eluídos através de um gradiente de fase móvel composta por ácido fosfórico: água 0,02% v/v (pH = 2,5) (A) e acetonitrila (B) como descrito na Tabela 1. O fluxo foi de 1 mL/min e o volume de injeção de 20 µL. O flavonóide canferitrina, cedido pela Prof^a. Dr^a. Maique Weber Biavatti (Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis / SC), foi utilizado como padrão.

Tabela 1 - Condições de gradiente da fase móvel composta por ácido fosfórico: água 0,02% (pH = 2,5) (A) e acetonitrila (B).

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	85	15
5	85	15
5.01	85	15
30	70	30
30.01	70	30
32.00	80	20
32.01	80	20
35	85	15

Para acompanhamento dos experimentos, foram obtidos os desvios padrão (dp) e os coeficientes de variação percentual. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para avaliação do TFT e CNF (canferitrina) nas soluções extrativas antes e após o processo de secagem.

Obtenção do extrato seco

Liofilização

As soluções extrativas obtidas foram submetidas à desalcoolização em evaporador rotativo Fisatom[®], em temperatura não superior a 50°C. Em seguida, os extratos foram submetidos à liofilização, utilizando um equipamento Líotop[®] L101, a uma pressão negativa de 29×10^{-6} mmHg e temperatura de -60 °C. O tempo de secagem foi 100 horas.

Secagem por aspersão

Na secagem por aspersão da solução extrativa, foi utilizado um mini *spray dryer* Lab-Plant[®] SD-05. À solução extrativa, adicionaram-se 20 e 30% de dióxido de silício coloidal (Aerosil[®] 200) em relação ao resíduo seco. As condições operacionais empregadas nesse trabalho foram: temperatura de entrada 170°C, pressão do ar 0,9 bar e vazão de alimentação do extrato 8 mL/minuto.

O rendimento do processo foi calculado através da divisão do pó coletado pela quantidade inicial de sólidos presentes na solução extrativa adicionada de dióxido de silício coloidal

Caracterização dos extratos secos

Espectroscopia no Infravermelho

As amostras foram analisadas utilizando espectrômetro FT-IR PerkinElmer[®] (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio. Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando uma média de 10 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} em comprimento de onda na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} .

Comportamento Reológico

Ângulo de repouso

O ângulo de repouso foi avaliado através da passagem de uma quantidade padronizada de pó (30 g) em funil de altura fixa (10 cm), com diâmetros superior e inferior de 8,3 e 0,7 cm, respectivamente, em superfície plana coberta com papel milimetrado. O ângulo de repouso (α) é determinado pela equação: $\text{tg } \alpha = H/R$ (equação 2), onde H é a altura e R é o raio do cone. O tempo de escoamento é medido em segundos (VIANA, 2006; RATES; OLIVEIRA, 2007).

Determinação da Densidade Aparente e de Compactação (Fator de Hausner, Índice de Carr, Índice de Densificação)

Na determinação da densidade aparente (ρ_a) dos extratos secos, utilizou-se uma amostra de 20 g e transferidos para uma proveta graduada de 50 mL para medida do volume ocupado pelo pó. A densidade compactada (ρ_c) foi determinada em equipamento *Tap density* Varian[®]. O pó contido na proveta foi submetido a 10 e 500 quedas. A partir dos valores de densidade, foram calculados o fator de Hausner (FH), Índice de Compressibilidade (IC) e Índice de densificação (ID), segundo as equações 3, 4 e 5, respectivamente (SCHÜSSELE; BAUER-BRANDL, 2003).

$$\text{FH} = \frac{\rho_c}{\rho_a} \quad (4) \qquad \text{IC} = \frac{\rho_c - \rho_a}{\rho_c} \times 100 \quad (4) \qquad \text{ID} = \frac{V_{10} - V_{500}}{V_{10}} \quad (5)$$

onde: V_{10} = volume do pó após 10 quedas; V_{500} = volume do pó após 500 quedas.

Determinação da umidade

Amostras de 0,5 g das amostras foram colocadas em pesa-filtros previamente tarados. Os pesa-filtros foram colocados em estufa a 105°C por 2 horas, resfriados em dessecador e, então, pesados. Este procedimento foi repetido até obtenção de peso constante (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Ensaio de Higroscopicidade

Para determinar a estabilidade dos extratos secos em relação à umidade, as amostras foram acondicionadas em pesa-filtros e, em seguida, colocadas em dessecador. As condições de umidade relativa foram 69 e 88%, com soluções apropriadas de NaCl e BaCl₂, respectivamente, em temperatura ambiente (CHU e CHOW, 2000).

A umidade relativa foi confirmada através de um termohigrômetro digital J.Prolab[®] modelo SH 122. As amostras foram analisadas, em triplicata, através da perda por dessecação, nos tempos 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das superfícies das partículas das amostras foram analisadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura ambiental FEI, Quanta[®] 200 FEG. As amostras foram dispostas em fitas de carbono sem metalização.

Análise de superfície específica e tamanho de poros

A determinação da superfície específica e a isoterma de adsorção foram obtidas pelo método Brunauer-Emmet-Teller (BET), que utiliza o princípio da adsorção de um gás na superfície de um sólido, que neste estudo utilizou-se o gás nitrogênio (BRUNAUER, 1938; SILVA, 2010).

Para a realização deste ensaio, utilizou-se um analisador de área superficial e tamanho de poros –ASAP 2420 Micromeritics[®], munido de software próprio para determinar a superfície específica (S_{BET}) e porosidade (tamanho de poros e volume de poros e microporos). A distribuição do tamanho de poros do PSA e ESL foram analisadas pelo método Barret-Joyner-Halenda (BJH). As amostras foram degaseificadas a 50°C para remover qualquer material adsorvido no interior dos poros e na superfície do material (BARRET, 1951).

Análise granulométrica a laser

A distribuição e o tamanho de partículas das amostras foram determinados em analisador de tamanho de partículas a laser Microtac[®] S3500. As amostras foram previamente

dispersas em hexano e mantidas sob agitação no banho ultrassônico Unique[®] mod. USC-1400^a (SILVA, 2010).

Análise Térmica

As curvas termogravimétricas das amostras foram obtidas em triplicata por meio de termobalança, modelo DTG- 60H acoplado ao aparato DTA-TG, sob atmosfera de nitrogênio, fluxo de 50 mL.min⁻¹, razão de aquecimento 10°C.min⁻¹. As massas das amostras foram cerca de 5 mg, acondicionadas em cadinho de alumina. Verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de oxalato de cálcio.

Difração de raios- X

Os resultados de difração de Raios-X de pó foram obtidos utilizando difratômetro Siemens[®] (X- Ray Diffractometer, D-5000) equipado com ânodo de cobre. As amostras foram preparadas em suportes de vidro com fina camada de material dos pós sem solventes e analisadas no intervalo de $1,5 < 2\theta < 90^\circ$, velocidade de digitalização 2 θ /s e tamanho da fenda 0,02°.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização da solução extrativa

A determinação do pH foi importante para avaliar interferências na qualidade do extrato, pois o pH fornece indicativos gerais sobre a natureza química dos compostos presentes na solução extrativa. No entanto, mudanças nestes valores podem acarretar em alterações na estabilidade de compostos flavonoídicos. O valor de pH da solução extrativa analisada foi 6,13, a densidade da amostra analisada foi 1,014 e o resíduo seco 5,09%

Avaliação do teor de flavonóides totais (TFT) e de canferitrina

Os flavonóides são os principais compostos presentes na *B. forficata* Link que apresentam diversas atividades farmacológicas, em destaque o flavonóide CNF. Na Tabela 2, encontra-se descritos os TFT e CNF da solução extrativa (SE), PSA e ESL.

Observa-se que os TFT dos ESL foram ligeiramente inferiores aos PSA. Esse menor teor no ESL pode ser atribuído à interferência do processo, o qual utiliza temperatura para a retirada do solvente não aquoso antes de submeter ao processo de liofilização.

No entanto, a análise estatística mostrou que os métodos de secagem não tiveram efeito significativo sobre os teores flavonoides nas amostras secas, podendo-se inferir que as frações flavonoidicas foram relativamente estáveis durante o processo de secagem

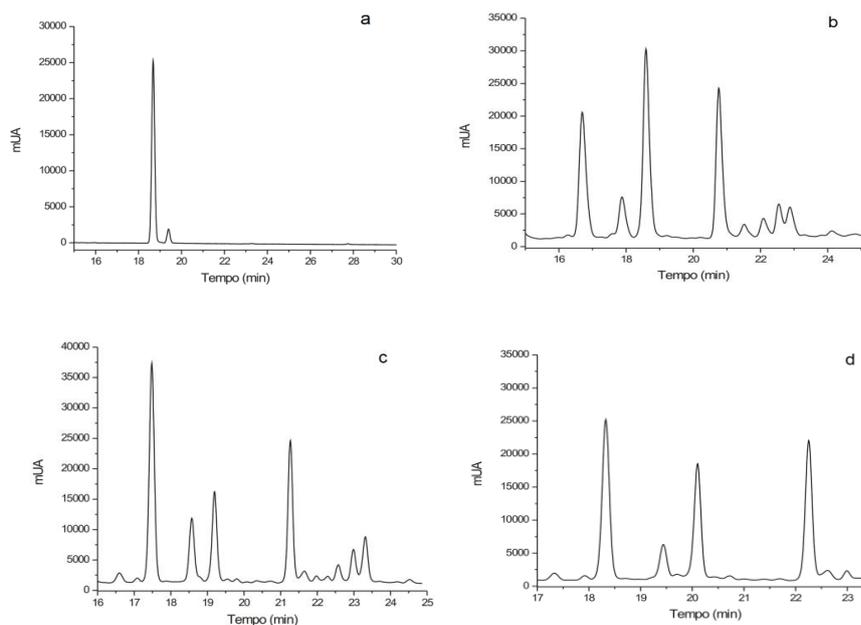
Tabela 2 - Análise de TFT e CNF nos extratos fluidos, PSA e ESL.

	TFT (mg/mL) ± dp	Teor de CNF (µg/mL) ± dp
SE	1,67 ± 0,01	6,61 ± 0,03
PSA 20%	1,64 ± 0,02	8,13 ± 0,02
PSA 30%	1,66 ± 0,02	7,75 ± 0,01
ESL	1,59 ± 0,01	6,21 ± 0,01

Conforme o cromatograma apresentado na Figura 1, observa-se que a SE e os extratos secos apresentaram perfis químicos semelhantes, sugerindo que o procedimento de secagem não tenha interferido na integridade de seus constituintes, entre eles a CNF.

Os tempos de retenção (t_r) na análise de CLAE dos extratos, foram próximos de 18,64 ± 0,05 min conforme o t_r reportado para a canferitrina.

Figura 1 - Perfil cromatográfico do padrão CNF (a), SE (b), PSA (c) e ESL (d).



Espectroscopia no Infravermelho (IV)

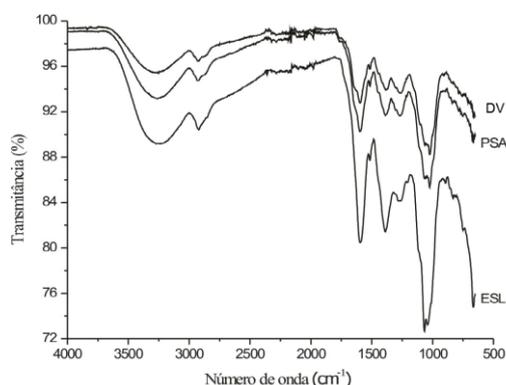
A espectroscopia de IV, durante as duas últimas décadas, tem sido uma ferramenta de pesquisa bastante usada na área farmacêutica. Embora haja uma abundância das publicações recentes que tratem das aplicações desta técnica, o número de estudos quantitativos é ainda limitado na área de produtos naturais (AALTONEN et al., 2008).

A Figura 2 apresenta os espectros obtidos da droga vegetal (DV), PSA e ESL, onde se evidencia fortes bandas de absorções na região de 3500-3200 cm^{-1} , sugerindo a presença de hidroxilas, absorções na região de 1700-1600 cm^{-1} com bandas alongadas característicos de grupamentos de compostos carbonílicos (cetonas, aldeídos, ésteres, lactonas) e uma faixa compreendida de 1100 – 1331 cm^{-1} característicos de éteres. As atribuições das bandas apresentadas foram realizadas por comparação com os resultados publicados de espectros vibracionais e considerações teóricas dos compostos estudados.

Estas bandas sugerem a presença de uma ampla classe de metabólitos secundários (flavonóides, proantocianidinas, leucoantocianidinas, triterpenos, esteroides e outros), pois a identificação de compostos orgânicos em matrizes complexas com diferentes composições químicas tais como materiais de plantas, apresentam geralmente bandas características de grupamentos majoritários com impressões digitais únicas (ZIÉMONS et al, 2004).

Na análise dos espectros de absorção no IV (Figura 2) da DV (droga vegetal), PSA e ESL, foi evidenciada a presença dos mesmos constituintes após o processo de secagem em comparação à DV, devido à semelhança do perfil espectral. Porém, uma análise em dados da literatura evidencia que espectros de absorção no IV são geralmente semelhantes em amostras vegetais, tendo em vista o grande número de compostos presentes na matriz.

Figura 2 - Espectros de absorção no IV das amostras: DV, PSA e ESL.



DV: droga vegetal, PSA: produto seco por aspersão, ESL: extrato seco liofilizado.

Comportamento Reológico

O fluxo de pós é uma propriedade de suma importância ao considerarmos formas farmacêuticas sólidas, e a medida do ângulo de repouso é um método simples de caracterização do comportamento de pós durante o escoamento.

Na avaliação do fluxo dos pós, como esperado para os extratos secos vegetais, as amostras não apresentaram escoamento, e possivelmente apresentariam ângulo de repouso superior a 30°, ou seja, com propriedades de fluxo deficientes (CHAVES et al., 2009).

Os resultados da caracterização reológica dos extratos secos estão sumarizados na Tabela 3. O PSA e o ESL apresentaram valores superiores a 20% no IC e 1,35 para o FH, indicativo de materiais com características de empacotamento mais estáveis dificultando a capacidade de escoamento, pois IC mede de forma indireta o fluxo e empacotamento dos pós, quanto menor, melhores serão essas características reológicas (THOMAS; POURCELOT, 1991).

Pós com IC acima de 25%, como o ESL podem ter suas propriedades fluxo melhoradas mediante emprego de deslizantes, como a adição de dióxido de silício à solução extrativa, pois reduz a adesividade do extrato ao equipamento e incrementa suas características reológicas através de melhora na morfologia do pó, da distribuição do tamanho da partícula e da fluidez (RUNHA, 2001). No entanto, o PSA apresentou propriedade de fluxo extremamente fraca mesmo com o uso de deslizante (SCHÜSSELE; BAUER-BRANDL, 2003).

O PSA apresentou baixa densidade, enquanto que o extrato liofilizado apresentou-se três vezes mais denso. A densidade bruta de sólidos é um dado importante na produção de medicamentos por fornecer previsão do tamanho de invólucros de cápsulas e de alimentadores de máquinas, extratos secos muito pouco densos não são muito interessantes ao considerarmos fitoterápicos, visto que o aporte destes geralmente é muito grande.

Tabela 3 – Resultados da caracterização reológica dos extratos secos (PSA e ESL).

Parâmetros	ESL	Especificações (USP 34)	ESL	Especificações (USP 34)
ρ_a	0,24 g/mL	----	0,66 g/mL	----
ρ_c	0,4 g/mL	----	0,89 g/mL	----
FH	1,68	>1,6 (extremamente baixo)	1,36	1,35-1,45 (baixa)
IC	40,5 %	26-31 (baixa)	26,3 %	26-31 (baixa)
ID	31 mL	* < 20 mL	4 mL	* < 20 mL

ρ_a : densidade bruta, ρ_c : densidade compactada, FH: fator de Hausner, IC: índice de compressibilidade, ID: índice de densificação.

O ID fornece informações sobre o comportamento do pó quando submetido à movimentação e que valores inferiores a 20 mL sugerem que o pó apresenta razoável propriedade de fluidez (GUYOT et al., 1995).

Diante dos resultados da análise do ID, sugere-se que o ESL possui este índice dentro da faixa especificada, diferente do PSA, que se mostrou inadequada para as características reológicas. Porém, os resultados de todos os parâmetros reológicos devem ser avaliados simultaneamente para que se tenham informações conclusivas.

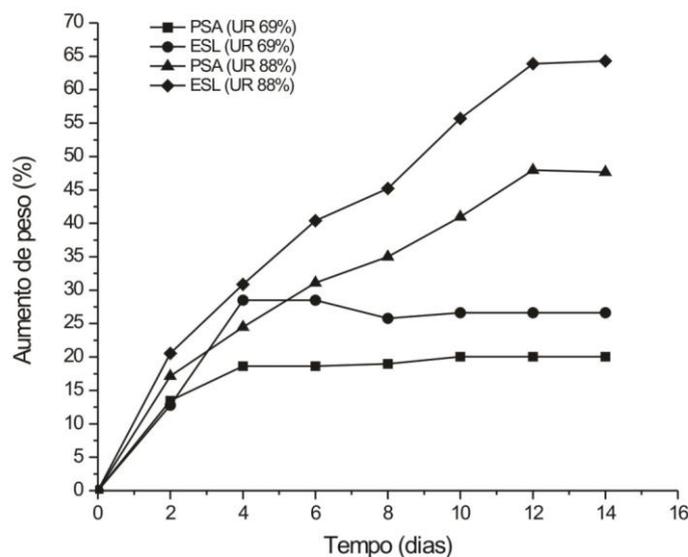
Higroscopicidade e Umidade

A umidade é um fator que influencia a estabilidade físico-química e microbiológica dos materiais sólidos pulverulentos, além de poder afetar as características reológicas do produto que são essências no desenvolvimento de uma formulação farmacêutica sólida (CHAVES; COSTA; FREITAS, 2009).

O PSA apresentou umidade residual de 6,41% e o ESL 4,95%. Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), o extrato seco deve apresentar, no mínimo, 95% de resíduo seco, portanto deve-se avaliar com cautela as propriedades de higroscopicidade do PSA, visto que este possui 93,59% de resíduo seco.

Além da determinação do teor de umidade das amostras, suas propriedades higroscópicas também foram determinadas pela sorção de água em diferentes condições de umidade. As curvas de sorção de umidade em função do tempo obtidas para UR de 69 e 88% estão representadas na Figura 3.

Figura 3 – Representação gráfica das curvas de sorção de umidade para o PSA e o ESL de *B. forficata* submetido à exposição em condições de UR de 69 e 88%.



Considerando a influência da umidade dos materiais sólidos em seu comportamento tecnológico e na sua estabilidade, a higroscopicidade deve ser bem avaliada, principalmente na seleção do processo de secagem e na manipulação e seleção das condições de armazenamento, em nível de ambiente e do material de acondicionamento e embalagem (MENDÉZ, 2011).

O ESL apresentou coloração marrom, formação de aglomerados, elevada adesividade e higroscopicidade. Já o PSA apresentou coloração esverdeada, pó fino com higroscopicidade inferior ao ESL. Apesar de reduzir a higroscopicidade, o adjuvante dióxido de silício coloidal no PSA não impediu a sorção de água em UR superior a 69%.

O PSA apresentou menor sorção de umidade que o ESL. Quando submetido à UR de 69%, o PSA absorveu 13,76% de umidade e o ESL sorveu 12,46% nas primeiras 48 h. Após 4 dias, houve estabilização da sorção de umidade dos produtos. Já quando submetido à UR 88%, o ESL sorveu 64,3% de umidade e o PSA 47,66%, ao final de 14 dias de exposição, ilustrando uma diferença de comportamento dos produtos quando submetidos em diferentes condições de umidade.

Os valores de higroscopicidade obtidos não devem ser considerados absolutos, visto que as amostras foram expostas a condições abusivas (sem embalagem primária e lavada UR).

A higroscopicidade das amostras não está diretamente relacionada ao teor de umidade, visto que o ESL apresentou menor teor de umidade e maior higroscopicidade e o PSA o inverso. Este fato pode ser atribuído à eficiência do dióxido de silício coloidal que apresenta elevada superfície específica e alto poder sorvente (GALLO et al., 2011; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010), visto que este adjuvante foi utilizado somente no processo de secagem por aspersão, agindo no encapsulamento da SE diminuindo sua higroscopicidade.

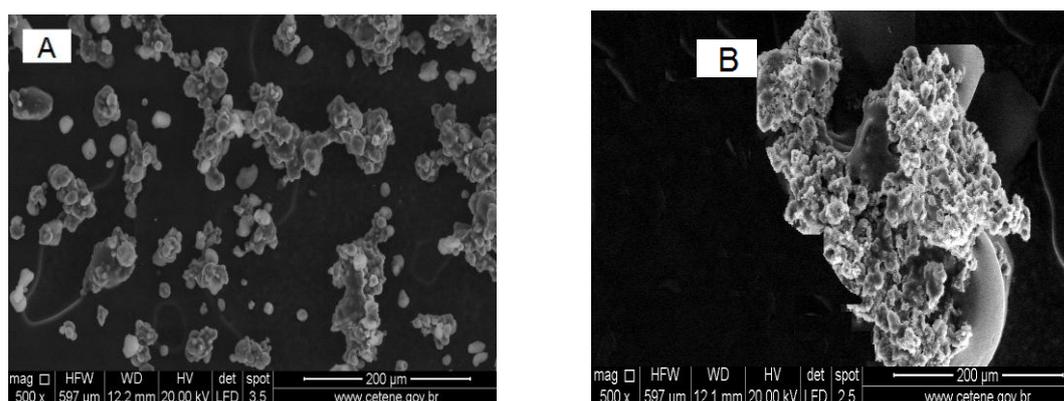
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias das partículas dos extratos vegetais secos (PSA e ESL) estão apresentadas na Figura 4. Ambas as amostras apresentaram superfícies enrugadas e formatos irregulares, sendo estas duas propriedades morfológicas responsáveis pela baixa fluidez dos pós (SILVA, 2010; GALLO et al., 2011).

Na amostra PSA (fig. 4A) observou-se que as partículas apresentaram superfícies esféricas com tendências aglomerações, formato característico do processo de secagem por *spray dried*.

Em contraste, a amostra do ESL apresentou uma grande quantidade de aglomerados (fig. 4B) e de partículas bastante irregulares e maiores, o que possivelmente está relacionado com a elevação da hidratação na amostra, a qual favorece a aglomeração das partículas, corroborando com os resultados da higroscopicidade do mesmo.

Figura 4 - Micrografias das partículas do PSA (A) e ESL (B).



Alguns autores têm sugerido que a aglomeração ocorre devido a efeitos elétricos estáticos e as forças de van der Waals das partículas com as moléculas de água. Outros estudos indicam que os PSA podem ter menos sítios de ligação de hidrogênio disponível para as moléculas de água na sorção que os ESL, o que justifica a diferença de morfologia dos extratos secos pelos diferentes

métodos de secagem (HAQUE e ROOSE, 2006; LEÓN-MARTÍNEZ; MÉNDEZ-LAGUNAS; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, 2011).

Análise de área superficial e tamanho de poros

A forma das isotermas de adsorção e dessorção indicam as características da porosidade de um sólido, visto que a ocorrência de histerese é em função do formato do poro (TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001).

A isoterma do ESL pode ser classificada como sendo do tipo IV, indicando que o pó possui poros razoavelmente grandes. Devido à forma estreita e inclinada da histerese na dessorção, a isoterma em estudo é classificada como do tipo H3, indicando presença de poros com formato de cunha, cones ou placas paralelas (PENA et al., 2008).

A isoterma do PSA é classificada como tipo V, essa isoterma indica que as moléculas do adsorvato (gás nitrogênio) apresentaram maior interação entre si do que com o sólido. O PSA apresentou histerese tipo H1 indicativo da presença de poros regulares de formato cilíndrico ou poliédrico com extremidades abertas (PENA et al., 2008).

Outro parâmetro bastante importante no estudo da estrutura porosa de um sólido é a superfície específica e a distribuição de tamanho de poros, que está intimamente ligada à solubilidade do sólido. Os resultados dos parâmetros avaliados pelo ensaio de adsorção de nitrogênio são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros avaliados pelo ensaio de adsorção de nitrogênio

Amostra	Superfície específica BET (m²/g)	Volume de poros (cm³/Kg)	Volume de microporos (cm³/Kg)	Diâmetro médio de poros (Å)
PSA	44,3017	123,5460	19,2880	111,5497
ESL	0,5652	0,4780	0,0290	33,8201

Vários métodos foram desenvolvidos para determinar a distribuição de poros de acordo com seu tamanho, dentre eles, os métodos que utilizam a adsorção física de gases são os mais usados. A classificação de tamanho de poros é especificada de acordo com seu diâmetro, e segue recomendações da IUPAC, podendo ser classificada como microporo

(largura interna menor que 20 Å); mesoporo (largura interna entre 20 Å e 500 Å) ou macroporo (largura interna maior que 500 Å) (NERY et al., 2008). O PSA apresentou diâmetro médio do poro de 111,5497 Å e o ESL 33,8201 Å, sugerindo-se que ambos extratos possuem poros do tipo mesoporos. No entanto, o PSA por apresentar maior tamanho de poro, apresenta maior facilidade de penetração dos líquidos favorecendo a solubilização dos mesmos.

Análise granulométrica a laser

As partículas do PSA e do ESL apresentaram diâmetro médio de 16,83 µm na faixa granulométrica, variando de 4,51 a 39,13 µm (Figura 4) e de 25,78 µm na faixa granulométrica variando de 5,16 a 62,97 µm (Figura 5), respectivamente.

Figura 4 - Distribuição do tamanho de partículas do PSA.

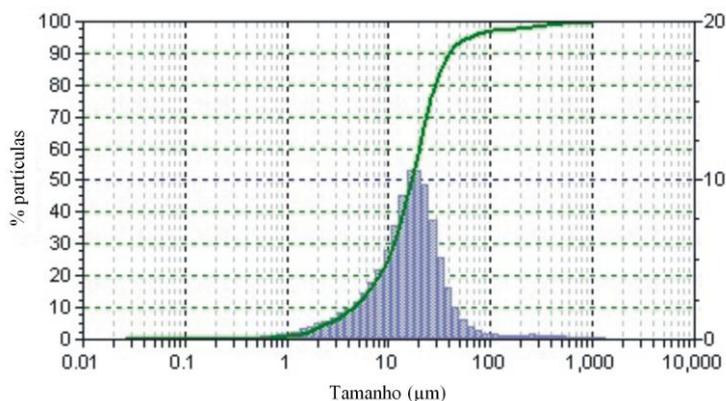
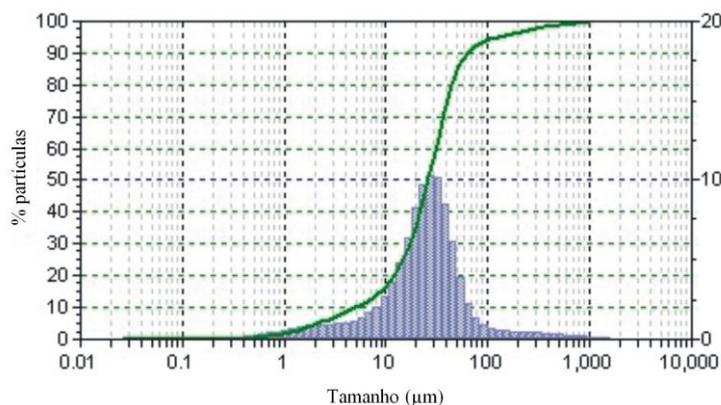


Figura 5 - Distribuição do tamanho de partículas do ESL.

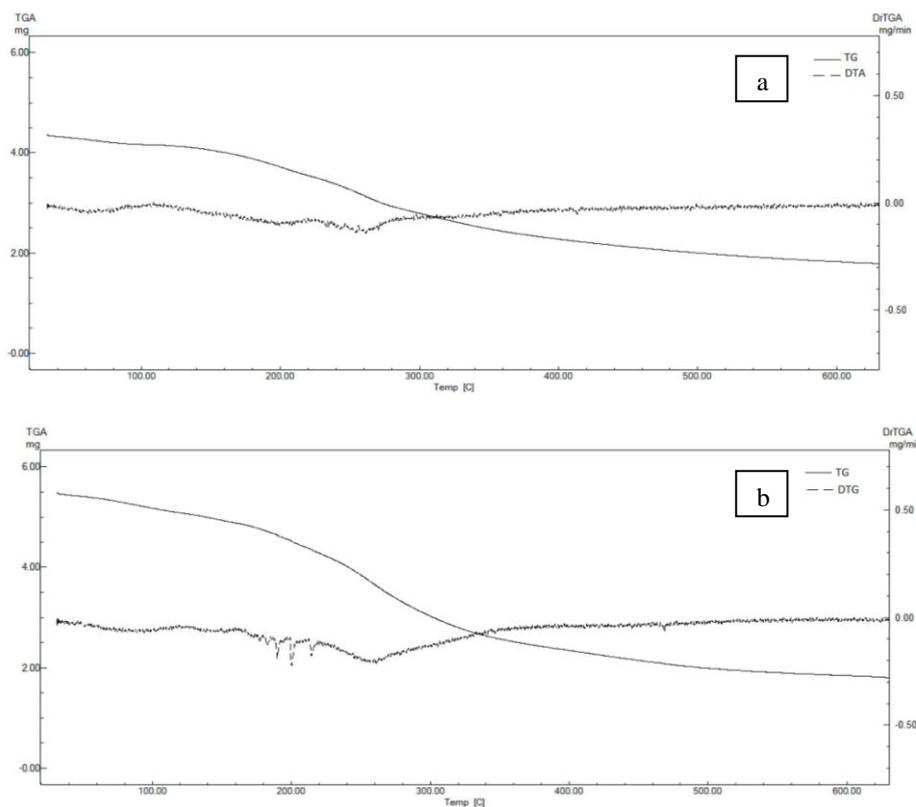


Pode-se observar que o PSA apresentou menor dispersão granulométrica do que o ESL e menor tamanho médio de partícula, propriedade esta vantajosa, visto que partículas pequenas possuem maior solubilidade devido ao aumento da superfície específica, ratificando os resultados anteriores.

Análise Térmica

Na Figura 7, são mostradas as curvas de TG e DTG para as amostras do PSA e ESL. Pode-se observar a presença de três estágios de perda de massa. O primeiro ocorre em temperatura inferior a 100°C e está relacionado à perda de umidade. O segundo estágio pode ser relacionado com a decomposição da matéria-prima com geração de material carbonizado que finalmente é queimado no terceiro estágio.

Figura 7 - Curvas TG e DTG do PSA (a) e do ESL (b).



A curva do DTG do ESL mostra que o segundo estágio ocorre entre 134 e 142°C e o terceiro estágio entre 187 e 275°C. Os três estágios representam uma perda de massa de 51,5% em relação à amostra inicial.

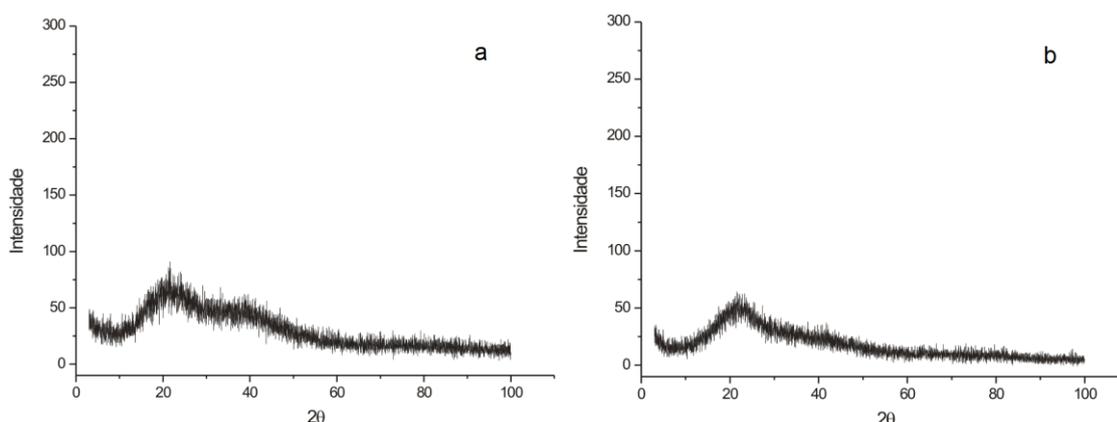
A curva do DTG do PSA mostra que o segundo estágio ocorre entre 160 e 210°C e o terceiro estágio entre 241 e 273°C. Os três estágios representam uma perda de massa de 38,5% em relação à amostra inicial.

Diante dos resultados anteriores obtidos no ensaio gravimétrico de perda por dessecação para o PSA ($\Delta m=6,41\%$) e ESL ($\Delta m=4,52\%$), foi observado que estes valores não estão em concordância com os valores de umidade observados nas curvas de TG que foram de 3,83% para o PSA e 3,05% para o ESL, demonstrando que diferentes técnicas (termogravimetria e a perda por dessecação) podem fornecer estimativas diferentes do conteúdo de água residual presente nas amostras analisadas.

Difração de raios-X

Os difratogramas do PSA e ESL estão representados na Figura 8. Os perfis difratométricos dos extratos secos revelam um estado completamente amorfo, uma vez que pode ser confirmado pela presença de picos não definidos com ruídos abundantes, sugerindo que as amostras analisadas não possuem características de cristalinidade.

Figura 8 - Resultados da análise de difração de raios-x do PSA (A) e ESL (B).



CONCLUSÃO

A caracterização físico-química dos extratos secos de *B. forficata* forneceu dados importantes para determinação de parâmetros de qualidade, haja vista que tais parâmetros ainda não foram estabelecidos por compêndios oficiais e o conhecimento prévio das características físico-químicas dos extratos secos é importante para o desenvolvimento e controle de qualidade de fitoterápicos.

Não foi observada influência nas características dos constituintes da solução extrativa após secagem por aspersão ou liofilização através das técnicas utilizadas. Os extratos secos obtidos apresentam propriedades tecnológicas deficientes, o extrato liofilizado apresentou elevada higroscopicidade, o que dificulta a incorporação destes extratos nas formulações farmacêuticas, já o produto seco por aspersão pode ter suas características farmacotécnicas melhoradas através da alteração dos parâmetros de secagem e do tipo de adjuvante utilizado.

O extrato seco liofilizado apresentou maior faixa de distribuição granulométrica, menor área superficial e maior taxa de decomposição que o produto seco por aspersão. Os resultados obtidos corroboram para a escolha do produto seco por aspersão de *B. forficata* como produto com propriedades tecnológicas mais adequadas para a formulação de formas farmacêuticas sólidas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da FACEPE, do CNPq e à Klabin do Paraná Produtos Florestais Ltda pelo fornecimento da folhas de *Bauhinia forficata*.

REFERÊNCIAS

AALTONEN, J.; GORDON, K.C.; STRACHAN, C.J.; RADES, T. Perspectives in the use of spectroscopy to characterize pharmaceutical solids. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 34, p. 159-169, 2008.

ANDRADE, S. S.; SILVA-LUCCAC, R. A.; SANTANAA, L.A.; GOUVEAB, I.E.; JULIANOB, M. A.; CARMONAB, A. K.; ARAUJO A., M. S.; SAMPAIOA, M. U.; OLIVAA M. L. V. Biochemical characterization of a cysteine proteinase from *Bauhinia forficata* leaves and its kininogenase activity. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 572-578, 2011.

BRUNAUER, S.; EMMET, P.H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, v.60, p.309-319, 1938.

BARRET, E.P.; GOYNER, J.P.; HALENDA P. P. J. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *American Chemical Society*, v. 73, p. 373-80, 1951.

CHAVES, J.S.; DA COSTA, F.B.; FREITAS, L.A.P. Development of enteric coated tablets from spray dried extract of feverfew (*Tanacetum parthenium L.*). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45, n.3., 2009.

CHU, K.W.; CHOW, A. H. L. Impact of Carbohydrate Constituents on Moisture Sorption of Herbal Extracts. *Pharmaceutical Research*, v. 17, n. 9, p. 1133-1137, 2000.

DA CUNHA, A. M.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A. G.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M. W. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Phytomedicine**, v. 17, n. 1, 37-41, 2009.

Farmacopeia Brasileira, 5ª. ed., São Paulo: Atheneu; 2010

GALLO, L.; LLABOT, J. M.; ALLEMANDI, D.; BUCALÁ, V.; PIÑA, J. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract physical properties. **Powder Technology**, v. 208, p. 205-214, 2011.

GUYOT, J. C.; ARNAUD, P.; BECOURT, P.; CASSIERE, J. P.; CHULIA, D.; DUCHÊNE, D.; FARRAND, D.; GOUAIHARDOU, J.; LANGLOIS, C.; LEQUIEN, C.; MALFROID, F.; POURCELOT, Y.; RENOUX, R.; SERGOT, S.; TORE, P. Commentaires relatifs aux méthodes générales d'analyse des formes orales solides récemment introduites dans les pharmacopées française et européenne. **Pharma Pratiques**, v. 5, n.6, p. 482-495, 1995.

HAQUE, K.; ROOSE, Y. H. Differences in the physical state and thermal behavior of spray-dried and freeze-dried lactose and lactose/protein mixtures. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 7, p. 62–63, 2006.

JORGE, A. P.; HORST, H.; SOUSA, E.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. I. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v. 149, p. 89–96, 2004.

LEÓN-MARTÍNEZ, F. M.; MÉNDEZ-LAGUNAS, L. L.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, J. Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on powder properties and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 864–870, 2010.

LIU, X.; QIU, Z.; WANG, L.; CHEN, Y. Quality evaluation of *Panax notoginseng* extract dried by different drying methods. **Food and Bioprocess Processing**, v. 89, p. 10–14, 2011.

Marques, G. S.; Desenvolvimento e avaliação de metodologias analíticas para quantificação de flavonóides totais e canferitrina em folhas de *Bauhinia forficata* Link. 73f .Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2011.

MARQUES, G. S. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**, no prelo.

MENDEZ, A. S. L.; SIMIONATO, N. O.; VALDUGA, A. T.; REGINATTO, F. H. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n.1, p. 105-111, 2011.

MENEZES, F. S.; MINTO, A. B. M.; RUELA, H. S.; KUSTE, R. R. M.; SHERIDAN, H.; FRANKISH, N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p. 8-13, 2007.

MOREIRA, G. E. G.; COSTA, M. G. M. ; SOUZA , A. C. R.; BRITO, E. S.; MEDEIROS, M. F. D.; AZEREDO, H. M. C. Physical properties of spray dried acerola pomace extract as

affected by temperature and drying aids. **Food Science and Technology**, v. 42 641–645, 2009.

NERY, C. G. C.; PIRES, M. A. S.; PIANETTI, G. A.; VIANNA-SOARES, C. D. Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p. 61, 2008.

OLIVEIRA O. W.; PETROVICK P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n. 4, p. 641-650, 2010.

PENA, E. Q.; VIEIRA, C.B.; DA SILVA, C. A.; SESHADRI, V. ARAÚJO, F. G. S. Caracterização dos parâmetros de porosidade de concentrados de minérios de ferro pelo método de adsorção de nitrogênio. **Tecnologia em Metalurgia e Materiais**, 2008, v.4, n.4, p. 53-57.

RUNHA, F.P.; CORDEIRO, D.S.; PEREIRA, C.A.M.; VILEGAS, J.; OLIVEIRA, W.P. Production of dry extracts of medicinal brazilian plants by spouted bed process: development of the process and evaluation of thermal degradation during the drying operation. **Transactions of the Institution of Chemical Engineers**, v. 79, n. 3, p. 160-168, 2001.

SCHUSSELE, A.; BAUER-BRANDL. Note on the measurement of flowability according to the European Pharmacopoeia. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 257, p. 301-304, 2003.

SILVA, J. O.; VIEIRA, J. L.; BARBOSA, W. L.; PEREIRA, N. L.; Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Sympytm officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.2, n.16, p. 671-677, 2006.

Silva, R.M.F. *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.): Obtenção Tecnológica de Formas Farmacêuticas. **Tese de doutorado**. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010, 186 p.

SOARES-SOBRINHO, J. L.; LYRA, M. A. M; ALVES, L. D. S.; ROLIM-NETO, P. J. Caracterização Físico-Química do Tripanomicida Benznidazol para o Desenvolvimento de Medicamentos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 5, p. 803-807, 2010.

SOUZA, A.P.T.B.; BARNI, S. T.; FERREIRA, R. A.; COUTO, A. G.. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, p. 13-21, 2010.

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 808-818, 2001.

THOMAS, C.; POURCELOT, Y. Perfomulation of Five commercial celluloses in drug development: reological and mechanic behaviour. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 19, n. 15, p. 1947, 1991.

TROJAN-RODRIGUES, A. M.; ALVESA, T. L. S.; SOARES, G. L. G.; RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 155–163, 2012.

TUYEN, C. K.; NGUYEN, M. H.; ROACH, P. D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 385–392, 2010.

TZENG, Y-M; CHEN, K.; RAO, Y. K.; LEE, M-J. Kaempferitrin activates the insulin signaling pathway and stimulates secretion of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *European Journal of Pharmacology*, v.607, p. 27-34, 2009.

VASCONCELOS, E. A. F.; MEDEIROS, M. G. F.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 3, p. 243-249, 2005.

VANAMALA, J.; COBB, G.; TURNER, N. D.; LUPTON, J. R.; YOO, K. S.; PIKE, L. M.; PATIL, B. S.; Bioactive Compounds of Grapefruit (*Citrus paradisi* Cv. Rio Red) Respond Differently to Postharvest Irradiation, Storage, and Freeze Drying. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.53, p. 3980-3985, 2005.

VIANA, O. S.; JÚNIOR, J. B.; SILVA, R. M. F.; MEDEIROS, P. M.; JÚNIOR, S. G.; ALBUQUERQUE, M. M.; ROLIM-NETO, P. J. Desenvolvimento de formulações e tecnologia de obtenção de comprimidos revestidos de efavirenz – terapia anti-HIV. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.4, 2006.

VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D. C.; RUDGE, M. V.; PADOVANI, C. R.; CALDERON, I.M. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 131–137, 2008.

ZIÉMONS, E.; GOFFINB, E.; LEJEUNE, R.; ANGENOT, L.; THUNUS, L. FT–IR measurement of tagitinin C after solvent extraction from *Tithonia diversifolia*. **Talanta**, v. 62, p. 383–387, 2004.

6. Capítulo IV

6.1 TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA DE PRODUTO SECO POR ASPERSÃO DE FOLHAS DE *Bauhinia forficata* Link

6.1.1 Artigo IV – Toxicidade aguda e subaguda de produto seco por aspersão de folhas de *Bauhinia forficata* Link

Artigo a ser submetido na Journal of Ethnofarmacology

TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA DE PRODUTO SECO POR ASPERSÃO DE FOLHAS DE *Bauhinia forficata* LINK

Monize Santos Peixoto¹, Magaly Andreza Marques de Lyra¹, Matheus Alves Angelos¹, Rebeqa Priscila Maranhão Monteiro¹, Cristiano Ribeiro de Lima², Almir Goncalves Wanderley², Miracy Muniz de Albuquerque¹, Pedro José Rolim-Neto^{1*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

²Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

RESUMO

Bauhinia forficata Link (pata de vaca) é uma espécie nativa da América do Sul bastante utilizada no tratamento da diabetes mellitus, devido à atividade antidiabética atribuída aos compostos flavonoídicos, principalmente o marcador canferitrina, presente nas folhas deste material vegetal. A toxicidade aguda e subaguda (28 dias) do produto seco por aspersão de *Bauhinia forficata* Link (BF) foi avaliada por via oral em camuandongos *Mus musculus*. O tratamento subagudo de BF (0,2 e 2,0 g/kg, n=10/grupo) não alterou o ganho de peso, consumo de água ou ração. Análise hematológica não mostrou diferença significativa nos parâmetros analisados. No entanto, nos parâmetros bioquímicos analisados, houve um aumento do nível sérico de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina nos grupos tratados com *Bauhinia forficata* Link. Os pesos absolutos e relativos do fígado e coração foram maiores no grupo controle. Em suma, a administração do produto seco por aspersão de *Bauhinia forficata* Link não produziu efeitos tóxicos em camuandongos machos. No entanto, o aumento dos níveis séricos de ALT e fosfatase alcalina podem indicar possível toxicidade hepática.

Unitermos: *Bauhinia forficata*, planta medicinal, produto seco por aspersão, toxicidade.

ABSTRACT

Bauhinia forficata Link (cow's foot) is a native of South America widely used in the treatment of diabetes mellitus due to antidiabetic activity attributed to flavonoid compounds, especially kaempferitrin marker, present in the leaves of this plant material. The acute and subacute (28 days) of spray dried extract of *Bauhinia forficata* Link (BF) was evaluated orally in camuandongos *Mus musculus*. The BF subacute treatment (0.2 to 2.0 g / kg, n = 10) did not affect weight gain, or feed water consumption. Blood analysis showed no significant difference in the parameters analyzed. However, the biochemical parameters analyzed, there was an increase of serum alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase in the groups treated with *Bauhinia forficata* Link. The absolute and relative weights of liver and heart were higher in the control group. In short, the administration of the spray dried extract of *Bauhinia forficata* Link did not produce toxic effects in male mice. However, the increase of serum ALT and Alkaline phosphatase may indicate potential liver toxicity.

Keywords: *Bauhinia forficata*, medicinal plant, spray dried product, toxicidade.

INTRODUÇÃO

B. forficata Link pertence à família Fabaceae, cujas espécies são de amplo interesse medicinal, sendo empregadas em forma de chás e preparações fitoterápicas para o tratamento de diversas enfermidades. Dentre os relatos descritos na literatura científica, os representantes de *Bauhinia* são frequentemente estudados quanto à ação hipoglicemiante, uma vez que na medicina popular são bastante empregados para o tratamento de *Diabetes mellitus* (SILVA; FILHO, 2002; SOUZA, 2003). Dentre estes representantes, *B. forficata* Link é a mais utilizada, sendo comumente conhecida, pela comunidade rural, como “pata-de-vaca verdadeira” ou “insulina natural”. (SILVA; FILHO, 2002; ARIGONY, 2005; VOLPATO et al., 2008).

B. forficata Link apresenta como principais constituintes os glicosídeos flavonoídicos canferólicos e quercetínicos, ácidos orgânicos, glicosídeos (MARTINS et al., 1994), heterosídeos cianogênicos e saponínicos, gomas, mucilagens e taninos condensados e hidrolisáveis (FRANCO, 1996).

De acordo com os dados relacionados à composição química de *B. forficata* Link e considerando que a sua atividade antidiabética é atribuída principalmente aos flavonóides (PAULA et al., 2002), experimentos farmacológicos tem sido realizados com frações enriquecidas destes metabólitos e com a canferitrina, no intuito de comprovar sua eficácia.

A abordagem etnofarmacêutica confirma o uso de *B. forficata* Link como planta medicinal potencialmente eficaz no tratamento do diabetes por apresentar propriedades antidiabéticas, hipoglicemiantes e diuréticas comprovadas através de diversos estudos realizados *in vitro* e *in vivo* (BARBOSA-FILHO et al., 2005; CAZAROLLI, 2006; Da CUNHA, 2010; JORGE et al., 2004; LINO et al., 2004, MENEZES et al., 2007; PEPATO et al., 2002; SILVA et al., 2002; SOUSA et al., 2004; VOLPATO et al., 2008).

Embora, grande parte dos estudos farmacológicos apresente resultados relevantes, a avaliação da toxicidade tem sido pouco investigada. Pepato et al (2004) mostrou ausência toxicidade, após tratamento oral por 30 dias com decocto aquoso das folhas de *B. forficata* em ratos normais e diabéticos.

Quanto à toxicidade aguda, de acordo com Luz (1995 apud SILVA; FILHO, 2002) observou-se que o extrato bruto por via intraperitoneal possui DL₅₀ 2,85 g/kg em ratos.

Contudo, quando administrado por via oral, o extrato (0,5 a 5,0 g/kg) não apresentou efeito tóxico.

Considerando a importância etnofarmacológica da espécie, o interesse do SUS e a carência de estudos toxicológicos esse trabalho visa investigar a toxicidade aguda e de doses repetidas do extrato seco de folhas de *Bauhinia forficata* Link.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material vegetal

As folhas de *B. forficata* foram coletadas em abril/2010 na Fazenda Monte Alegre em Telêmaco Borba - PR e gentilmente cedido pelo fornecedor Klabin do Paraná Produtos Florestais Ltda. O depósito da exsicata foi realizado no Herbário da Universidade Estadual do Maringá, sob registro nº 150 e a identificação confirmada no Jardim Botânico do Rio de Janeiro – RJ, Brasil, pela especialista em identificação de espécies do gênero *Bauhinia*, Ângela Vaz.

2.2. Obtenção e caracterização do extrato seco

A extração do material foi realizada em recipiente com aquecimento a 40°C em banho maria digital Nova ética® e agitação a 200 rpm por 1 hora utilizando agitador mecânico Marconi® modelo MA259 . As amostras foram preparadas a partir de 167,0 g do material vegetal e 1000 mL de solução hidroalcoólica 50%. O extrato foi resfriado à temperatura ambiente (25°C) e filtrado em algodão.

Na secagem por aspersão da solução extrativa foi utilizado um *spray-dryer* de bancada Lab-Plant, modelo SD-05. O adjuvante de secagem dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200) foi adicionado na concentração de 20% à solução extrativa a fim de melhorar o desempenho da secagem e as características farmacotécnicas do produto seco obtido. As condições operacionais empregadas nesse trabalho foram: temperatura de entrada 170°C, pressão do ar 0,9 bar e vazão de alimentação do extrato 8 mL/ min.

O extrato seco por aspersão (PSA) obtido foi monitorado pelo teor de canferitrina (CNF) e o teor de flavonoides totais (TFT) pelo método espectrofotométrico UV e por

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) validado por Marques et al (2011) e (2010).

O perfil cromatográfico dos extratos foi obtido em cromatógrafo a líquido Shimadzu® (UFLC, Japão) controlado pelo Software LC Solution 1.0 e constituído por bomba LC-20 AT, desgaseificador DGU – 20A₅, injetor automático Sil- 20A e detector de arranjo de diodos (DAD) SPD – M20A. Empregou-se coluna C₁₈ Restek® (250 mm x 4,6 mm, 5µm), mantida a 40 °C e protegida por uma pré coluna C₁₈ Restek® (10 mm x 4mm, 5 µm). O padrão de CNF e as amostras foram eluídos através de um gradiente de fase móvel composta por ácido fosfórico: água 0,02% (pH = 2,5) e acetonitrila. O fluxo foi de 1 ml/min e o volume de injeção de 20 µL. Os solventes utilizados possuíam grau analítico: ácido fosfórico, acetonitrila grau cromatográfico água ultrapurificada (Milli-Q System, Massachusetts, USA).

2.3. Animais

Camundongos machos e fêmeas (*Mus musculus*), com idade entre 3 e 2 meses respectivamente foram obtidos do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para estudo da toxicidade aguda e subaguda. Os animais foram mantidos em condições padrões ambientais (22±2 °C; 12:12 h ciclo claro/escuro), água e ração (Labina®, Purina, Brasil) foram disponíveis *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da UFPE (No. processo 23076.051972/2011-45).

2.4. Toxicidade aguda

Camundongos sadios de ambos sexos foram mantidos em jejum durante 12h, com água *ad libitum* foram divididos ao acaso em dois grupos (n=5/sexo). O primeiro grupo (grupo controle) recebeu água e o segundo grupo foi tratado por via oral (gavagem) com produto seco de *B. forficata* Link na dose de 5,0g/kg. Os animais foram observados quanto ao comportamento geral, mudança no peso corpóreo, sintomas esdrúxulos e mortalidade por um período de 14 dias após o tratamento.

2.5. Toxicidade subaguda

O teste foi realizado de acordo com o guia OECD 407 com pequenas modificações (OECD, 1995). Camundongos machos foram divididos ao acaso em três grupos (n=10/grupo), no grupo controle receberam água destilada e os outros dois grupos foram tratados com extrato seco de folhas de *B. forficata* Link por via oral (gavagem) em doses de 200 e 2000mg/kg/dia durante 28 dias. A variação de peso foi registrada semanalmente e o consumo de ração e água diariamente. Os animais foram observados quanto a anormalidades durante este período.

2.6. Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Análise hematológica foi realizada utilizando um analisador hematológico automático (Coulter STKS, Beckman). Os seguintes parâmetros foram analisados: hemácias, coeficiente de variação de distribuição das hemácias (RDW), hemoglobina, hematócrito, plaquetas, volume médio de plaquetário médio (VPM), leucócitos, neutrófilos, segmentados, eosinófilos, basófilos, Linfócitos, monócitos e os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (SILVA et al., 2007). A contagem de leucócitos diferencial foi realizada com um microscópio óptico após coloração e, para cada tipo de célula, 100 foram contadas.

Para análise bioquímica, o sangue foi centrifugado a $3000 \times g$ por 10 min para a obtenção de soro, que foi armazenada a $-20^{\circ} C$ até a determinação dos seguintes parâmetros: glicemia, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubina total direta e indireta, fosfatase alcalina, ionograma (sódio, potássio e cloreto) colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, triglicérides e ácido úrico.

. As dosagens foram feitas em analisador automático Architect com sistemas comerciais da Abbot (LIMA et al., 2006).

2.7. Parâmetros morfológicos

Após a eutanásia por excesso de tiopental sódico (35 mg/kg, i.p.), a necropsia foi realizada (n = 5/grupo) para análise da avaliação macroscópica externa do coração, fígado, pulmão, adrenais, estômago, intestinos, rins, pâncreas, baço, testículos, epidídimo, vesícula

seminal e ducto deferente. Esses órgãos foram cuidadosamente removidos, dissecados e tiveram suas massas úmidas determinadas em balança analítica, Gehaka modelo BG 440, sendo expressa em termos de massa absoluta e massa relativa g/100g.

2.8. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA two-way), seguido pelo teste Kewman-Keuls para verificação de comparações múltiplas entre os grupos durante o período estudado e ao longo do tempo entre os grupos. Nível de probabilidade inferior a 5% ($p < 0,05$) não foi considerado significativo.

3. Resultados

Caracterização cromatográfica dos extratos seco e fluido

Os flavonóides são os principais compostos presentes na *B. forficata* Link que apresentam diversas atividades farmacológicas, em destaque o flavonóide canferirina. Na tabela 1 encontra-se descritos os TFT e CNF do extrato fluido (EF) e o PSA.

Diante dos resultados descritos na tabela 1, observa-se que os TFT não apresentaram diferenças significativas, mostrando-se que o método de secagem não teve influencia significativa sobre os teores flavonoides nas amostras secas, sendo relativamente estáveis durante o processo de secagem, embora evidencie um aumento do teor de CNF no PSA em relação ao EF devido as interferências no preparo da amostra no processo da reconstituição da solução extrativa.

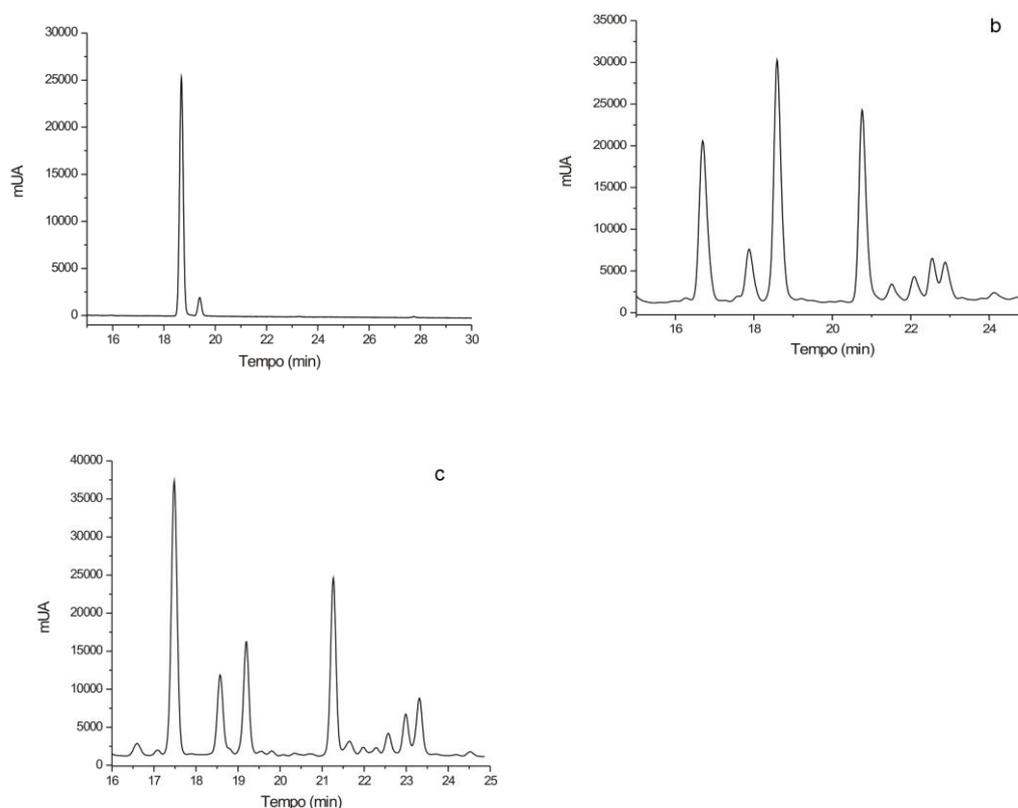
Tabela 1 - Resultados da análise de TFT e CNF no extrato fluido e PSA.

	TFT (mg /mL) \pm dp	Teor de CNF (μg/mL) \pm dp
EF	1,67 \pm 0,01	6,61
PSA	1,64 \pm 0,02	8,13

Conforme o cromatograma apresentado na figura 1 observa-se que os extratos fluidos e secos apresentaram perfis químicos semelhantes, sugerindo que o procedimento de secagem não tenha interferido na integridade de seus constituintes, entre eles a CNF.

Os tempos de retenção (t_r) na análise de CLAE dos extratos, foram próximos de $18,64 \pm 0,05$ min conforme o t_r reportado para a canferitrina.

Figura 1 - Perfil cromatográfico do padrão CNF (a), EF (b) e PSA (c).



Toxicidade aguda

Os resultados indicam que o tratamento agudo por via oral de *B. forficata* Link em doses de até 5,0 g/kg não produziram sinais de toxicidade ou morte em camundongos durante 14 dias de observação.

Toxicidade subaguda

Não foram registrados sinais de toxicidade ou mortes durante os 30 dias seguidos de tratamento por via oral com *B. forficata* Link nas doses de 0,2 e 2 g/kg. No geral não foram encontradas diferenças significativas entre o peso corporal inicial e final de camundongos tratados e camundongos controle, os camundongos tratados com 2 g/kg apresentaram maior ganho de peso que os camundongos tratados com 0,2 g/kg por apresentarem menor peso inicial (Fig. 2). A ausência de efeito tóxico também foi observado através da inalteração do consumo de ração (Fig. 3) e água (Fig. 4) nos grupos tratados em relação ao grupo controle.

Parâmetros bioquímicos e hematológicos

O perfil hematológico e bioquímico dos grupos controle e tratados estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, na qual verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas em todos os parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados. O tratamento com doses de *Bauhinia forficata* Link elevou ligeiramente atividade das enzimas ALT e fosfatase alcalina, indicando toxicidade hepática.

Parâmetros morfológicos

Os pesos absolutos e relativos dos órgãos e a morfologia macroscópica externa não foram alteradas pela administração do produto seco por aspersão de folhas de *Bauhinia forficata* Link. No entanto, os camundongos do grupo controle apresentaram um aumento significativo em ambos os pesos absoluto e relativo do coração de 20,77 e 12,60% e 25,90 e 16,53%, o fígado dos camundongos do grupo controle também apresentaram um aumento do peso absoluto e relativo de 19,10 e 10,81% e 22,45 e 13,95% em relação aos grupos tratados com doses de 0,2 e 2,0 g/kg (Tabela 3).

Figura 2 – Curvas de ganho de peso corporal de camundongos machos tratados por via oral com extrato seco por aspersão de Bauhinia forficata Link (BF 0,2 e 2,0 g/kg) por 28 dias consecutivos. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão (n= 10/grupo).

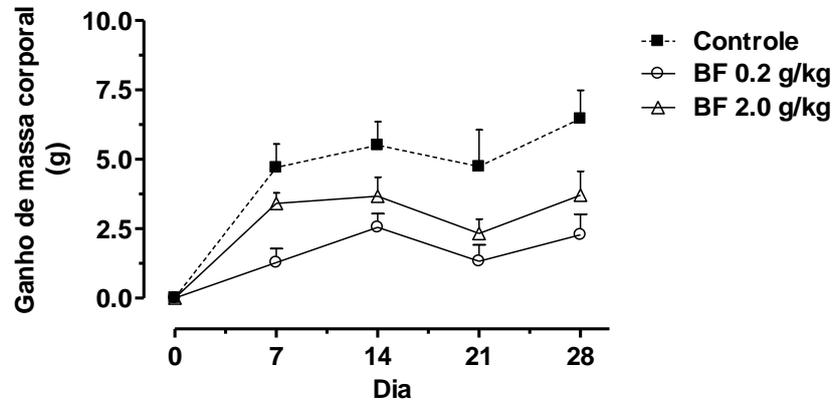


Figura 3 – Curvas de ganho de peso corporal de camundongos machos tratados por via oral com extrato seco por aspersão de Bauhinia forficata Link (BF 0,2 e 2,0 g/kg) por 28 dias consecutivos. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão (n= 10/grupo).

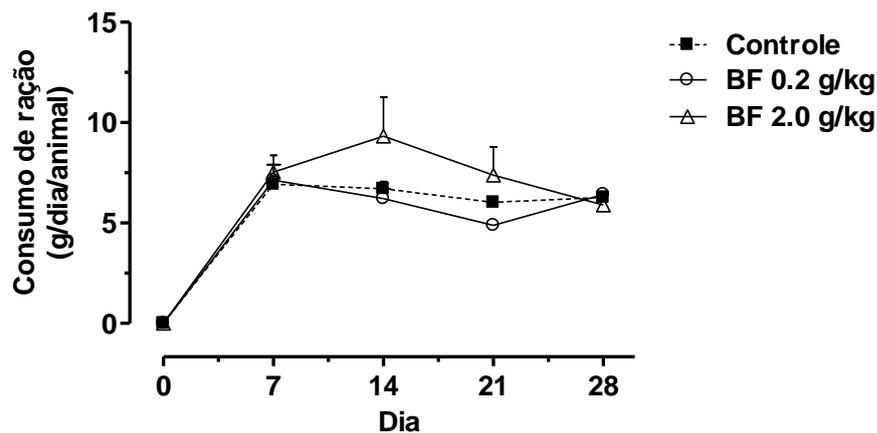


Figura 4 – Curvas de ganho de peso corporal de camundongos machos tratados por via oral com extrato seco por aspersão de Bauhinia forficata Link (BF 0,2 e 2,0 g/kg) por 28 dias consecutivos. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão (n= 10/grupo).

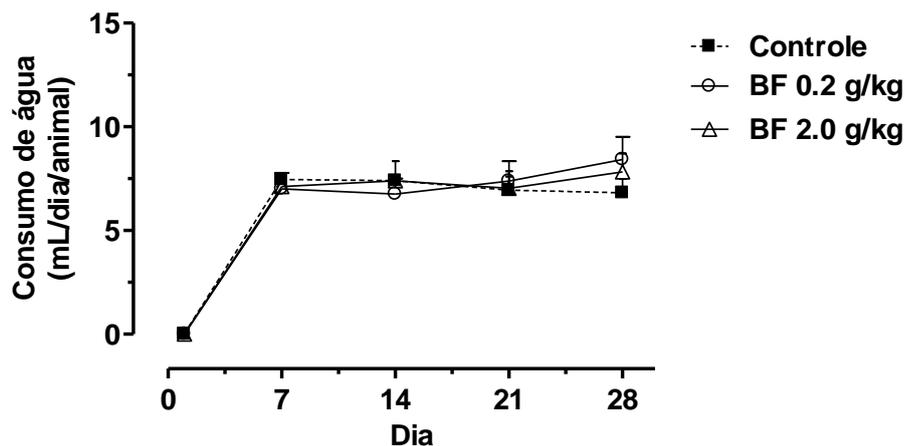


Tabela 1 – Efeito do produto seco por aspersão de folhas de *Bauhinia forficata* Link (BF 0,2 e 2,0 g/kg) por via oral nos parâmetros hematológicos de camundongos machos tratados por 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	Bf 200 mg/Kg	Bf 2000 mg/Kg
Hemácias (mil/mm³)	10,2 ± 0,34	9,04 ± 0,95	9,78 ± 0,38
Hemoglobina (g/dl)	16,81 ± 0,39	14,71 ± 1,46	16,59 ± 0,4
Hematócrito (%)	49,1 ± 1,52	43,6 ± 4,09	47,98 ± 2,39
VCM (µm³)	48 ± 0,83	48,67 ± 0,92	49 ± 0,84
HCM (pg)	16,47 ± 0,28	16,28 ± 0,22	17,02 ± 0,42
CHCM (g/dl)	34,29 ± 0,8	33,57 ± 0,3	34,78 ± 1,14
RDW (%)	16 ± 0,59	17,4 ± 0,22	16,3 ± 0,71
Plaquetas (mil/mm³)	959,2 ± 94,56	1123,67 ± 259,81	850,6 ± 84,62
VPM (fL)	5,46 ± 0,22	5,33 ± 0,10	5,5 ± 0,11
Leucócitos (mm³)	12,22 ± 3,05	9,67 ± 2,82	8,28 ± 0,24
Neutrófilos (%)	15 ± 6,75	7,68 ± 4,25	5,7 ± 0,54
Basófilos (%)	0,3 ± 0,15	0,6 ± 0,19	0,2 ± 0,055
Eosinófilos (%)	0,2 ± 0,2	0,02 ± 0,02	0,08 ± 0,02
Linfócitos TIP (%)	83,42 ± 7,05	89,52 ± 4,94	92,86 ± 0,44
Monócitos (%)	1,08 ± 0,24	2,18 ± 1,31	1,12 ± 0,15

Os valores foram expressos pela média ± erro padrão (n=10 animais/grupo). VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW: coeficiente de variação de distribuição das hemácias, VPM: volume plaquetário médio.

Tabela 2 - Efeito do produto seco por aspersão de folhas de *Bauhinia forficata* Link (BF 0,2 e 2,0 g/kg) por via oral nos parâmetros hematológicos de camundongos machos tratados por 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	Bf 200 mg/Kg	Bf 2000 mg/Kg
Glicemia (mg/dL)	93 ± 5,4	126,83 ± 8,88	119,5± 10,44
Uréia (mg/dL)	51,82 ± 4,6	47,08 ± 5,2	53,85± 6,69
Creatinina (mf/dL)	0,175 ± 0,02	0,2± 0	0,23± 0,025
AST (U/L)	88,56 ± 3,59	90,05± 7,0	104,55± 15,19
ALT (U/L)	28,2 ± 8,02	53± 12,93	58,5± 16,69
Bilirrubina total (mg/dL)	0,14 ± 0,023	0,125± 0,016	0,205± 0,049
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,1 ± 0	0,1± 0	0,125± 0,022
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,04 ± 0, 023	0,025± 0,016	0,08± 0,04
Fosfatase alcalina (U/L)	91 ± 8,49	120± 23,56	145,75± 19,23
Sódio (mmol/L)	152,67 ± 1,44	149,5± 0,93	150,5± 0,58
Potássio (mmol/L)	5,69 ± 0,678	5,42± 0,5	5,17± 0,35
Cloreto (mmol/L)	106,6 ± 1,55	106,7± 0,88	105,1± 1,93
Colesterol total (mg/dL)	130,14 ± 17,06	118,82± 12,12	127,12± 6,26
Colesterol HDL (mg/dL)	136 ± 33,58	106,33± 11,91	93± 6,95
Colesterol LDL (mg/dL)	10,83 ± 3,22	17,58± 3,47	20,1± 4,93
Colesterol VLDL (mg/dL)	30,73 ± 5,4	30,07± 3,25	26,25± 3,89
Triglicerídeos (mg/dL)	151,4 ± 19,26	150,33± 16,28	131,25± 19,49
Ácido Úrico (mg/dL)	2,27 ± 0,026	2,53± 0,17	2,4± 0,42

Os valores foram expressos pela média ± erro padrão (n=10 animais/grupo). AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina aminotransferase.

Tabela 3 - Efeito do produto seco por aspersão de folhas de *Bauhinia forficata* Link (BF 0,2 e 2,0 g/kg) por via oral no peso absoluto e relativo de camundongos machos tratados por 28 dias consecutivos.

Parâmetro	Controle	BF 0,2g/kg	BF 2,0g/kg
Coração (g)	0,234±0,017	0,1916±0,002	0,1838±0,009
(g/100g)	0,551±0,037	0,489±0,014	0,473±0,035
Fígado (g)	2,2108±0,128	1,8562±0,083	1,8058±0,097
(g/100g)	5,245±0,134	4,734±0,202	4,603±0,132
Pulmão (g)	0,228±0,006	0,2332±0,023	0,18±0,010
(g/100g)	0,546±0,028	0,589±0,041	0,462±0,034
Estômago (g)	0,2688±0,012	0,239±0,019	0,261±0,008
(g/100g)	0,643±0,042	0,605±0,031	0,672±0,045
Intestino (g)	2,2914±0,444	2,831±0,102	2,9446±0,128
(g/100g)	6,771±0,649	7,235±0,326	7,528±0,273
Rins (g)	0,3258±0,018	0,262±0,007	0,2772±0,017
(g/100g)	0,779±0,054	0,669±0,024	0,706±0,027
Adrenais (g)	0,0078±0,000	0,0134±0,000	0,0062±0,000
(g/100g)	0,019±0,003	0,033±0,001	0,015±0,001
Baço (g)	0,262±0,061	0,2038±0,025	0,1878±0,0023
(g/100g)	0,0625±0,138	0,516±0,061	0,475±0,047
Pâncreas (g)	0,1948±0,016	0,1844±0,013	0,1726±0,008
(g/100g)	0,476±0,067	0,468±0,024	0,441±0,022
Testículo (g)	0,122±0,006	0,1258±0,008	0,1264±0,011
(g/100g)	0,293±0,025	0,319±0,017	0,324±0,033
Epidídimo (g)	0,0502±0,004	0,0474±0,002	0,0518±0,004
(g/100g)	0,119±0,008	0,120±0,004	0,132±0,011
Vesícula seminal (g)	0,2426±0,023	0,1848±0,013	0,253±0,013
(g/100g)	0,571±0,026	0,473±0,039	0,647±0,034
Ducto deferente (g)	0,0188±0,001	0,0122±0,001	0,0144±0,001
(g/100g)	0,045±0,005	0,031±0,004	0,036±0,004

DISCUSSÃO

Toxicidade aguda

Os resultados do estudo de toxicidade aguda indicam que a administração de produto seco por aspersão de *Bauhinia forficata* Link por via oral com doses até 5,0 g/kg não produziu sinal de toxicidade ou morte em ratos, sugerindo uma Dose Letal (DL₅₀) maior que 5,0 g/kg, sendo desta forma considerada não-tóxica por via oral.

O presente estudo corrobora os resultados obtidos por Silva e Filho em 2002 e Cavalcanti et al em 2011, no qual não foram observados qualquer ação tóxica, nas doses únicas de 0,5 a 5,0 g/kg por via oral. Existem relatos de que a DL₅₀ do extrato bruto de *B. forficata*, administrado em ratos por via intraperitoneal, consiste em 2,85 g/kg. (SILVA; FILHO, 2002).

Toxicidade subaguda

O tratamento subagudo com doses de 0,2 e 2,0 g/kg durante 28 dias também não produziu mortes ou sinais de toxicidade. Além disso, a ingestão de água, ração e o peso corporal não foram alterados durante o período de tratamento. As doses utilizadas no presente estudo representam a dose utilizada como efeito antidiabético (PEPATO et al., 2004)

Os camundongos cresceram em taxas similares durante todo o experimento, os tratados com doses de 2,0 g/kg apresentaram maior ganho de peso, pois possuíam menor peso corporal no início do estudo. Assim como no estudo de Pepato em 2004, os animais do grupo controle apresentaram maior ganho corporal que os animais tratados com produto seco de *Bauhinia forficata* Link.

Parâmetros bioquímicos e hematológicos

No presente estudo, os parâmetros hematológicos analisados permaneceram dentro do intervalo de referência para a espécie (HARKNESS; WAGNER, 1993). Da mesma forma não houve alteração dos parâmetros bioquímicos analisados, com exceção do aumento nos níveis séricos de ALT e fosfatase alcalina, indicando sobrecarga hepática.

O aumento das enzimas transaminases séricas (ALT e AST) é um bom indicador de danos de hepatócitos. A AST é encontrada também em um grande número de tecidos, como coração, pulmão, músculo esquelético, cérebro e rim, enquanto a ALT é principalmente

limitada ao fígado (LIMA et al, 2001), assim, a última é considerada um indicador altamente sensível de hepatotoxicidade (Al-Habori et al. , 2002).

Flutuações nos níveis de ALT são geralmente acompanhadas de uma alteração dos níveis de AST, no entanto a AST é essencialmente uma enzima mitocondrial e não é lançado tão rápido como a ALT, que é citosólica (Al-Haboriet al., 2002). Isto poderia explicar porque uma alteração foi encontrada apenas nos níveis de ALT.

Estudos anteriores relatam resultados diferentes relativos à toxicidade hepática de *Bauhinia forficata* Link. Uma avaliação da toxicidade hepática subcrônica realizada em ratos normoglicêmicos após tratamento oral, por 30 dias, com infusão aquosa das folhas de *B. forficata* Link, *ad libitum*, indicou um possível dano hepático devido a aumento nos níveis séricos da enzima aspartato aminotransferase (AST), apesar dos níveis da alanina aminotransferase (ALT) não tenham sido alterados (Picoli *et al.*, 2006).

A toxicidade hepática também foi demonstrada para os extratos secos obtidos através da secagem de solução hidroalcoólica 70% das folhas de *Bauhinia forficata* Link por leito de jorro com auxílio do adjuvante dióxido de silício coloidal, nas doses de 125 e 250 mg/mL, devido ao aumento dos níveis séricos de AST e fosfatase alcalina em ratos hiperglicêmicos, após um tratamento oral por 35 dias (Pepato *et al.*, 2010).

O monitoramento da atividade sérica de biomarcadores de toxicidade realizado em ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos durante tratamento oral, por 33 dias, com o decocto das folhas de *B. forficata*, não indicou toxicidade tecidual. Avaliaram-se os seguintes biomarcadores: amilase pancreática, creatina quinase muscular, lactato desidrogenase muscular e hepática, bilirrubina do ducto biliar e hepática e enzima conversora de angiotensina renal e de microcirculação renal (Pepato *et al.*, 2004).

Parâmetros morfológicos

Apesar da mudança no peso relativo e absoluto do coração e fígado e da alteração de marcadores de toxicidade hepática (AST e fosfatase alcalina), uma avaliação mais aprofundada é necessária para verificar essa toxicidade cardíaca e hepática.

CONCLUSÃO

Em suma, a administração aguda e subaguda de produto seco por aspersão de folhas de *Bauhinia forficata* Link não induziu alterações significativas nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e morfológicos analisados em camundongos *Mus musculus*. No entanto, a

aumento dos níveis de ALT e fosfatase alcalina indicam uma possível toxicidade hepática. Novos estudos são necessários para avaliar melhor este achado, incluindo avaliação histológica hepática, análise enzimática de indução microsomal e os efeitos do tratamento crônico

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Rejane de Souza Silva pela excelente assistência e a CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

ARIGONY, A. L. V. **Determinação química e biológica de *Bauhinia forficata* Link subespécie pruinosa (pata-de-vaca – Leguminosae)**. 2005. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 392-413, 2005.

CAVALCANTI, E.M.; BONAFÉ, C.; SILVA, M.G.; GERENUTTI, M. Properties of *Bauhinia forficata* Link in rats: Behavioral evaluations. **Pharmacologyonline**, v.2, p. 205-211, 2011.

CAZAROLLI, L. H. Follow-up studies on glycosylated flavonoids and their complexes with vanadium: Their anti-hyperglycemic potential role in diabetes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163, p. 177–191, 2006.

DA CUNHA, A.M. et al. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Phytomedicine**, v. 17, n. 1, 37-41, 2010.

FRANCO, L. L. **As sensacionais 50 Plantas Mediciniais**: Campeãs de poder curativo. Curitiba: Santa Mônica, 1996. 241 p.

GROSSEL, S.G., CROWL, D.A. Handbook of a Highly Toxic Materials. Marcel Dekkar Onc., Nova Iorque, 1994.

HARKNESS, S.E.; WAGNER, J.E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. Livraria Roca, São Paulo, 1993.

JORGE, A. P. et al. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v. 149, p. 89–96, 2004.

LIMA, A. O. et al. **Métodos de laboratório aplicados a clínica**. 8ª edição, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

LIMA, C. R.; COSTA-SILVA, JR.; LYRA, M. M. A.; ARAÚJO, A. V.; ARRUDA, V. M.; DIMECH, G. S.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; FRAGA, M. C. C. A.; LAFAYETTE, S. L.; WANDERLEY, A. G. Atividade Cicatrizante e Estudo Toxicológico Pré-Clínico do Fitoterápico Sanativo®. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 544-549, 2006.

LINO, C.S. et al. Antidiabetic Activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 1, p.125-127, 2004.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLAN, D. C.; DIAS, J. F. **Plantas Mediciniais**. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, p. 1-29, 1994. 220 p.

MENEZES, F. de S. et al. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 08-13, 2007.

OECD (Organisation for Economic Co-Operation and Development), 1995. Guidelines for Testing of Chemicals, Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents #407, Paris. Disponible in http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL407.pdf.

PAULA, A. C. C. F. F. et al. Phenolics constituents of young plants of *Bauhinia forficata* Link. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 5, n.1, p.11-13, 2002.

PEPATO, M.T. et al. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 81, p. 191-197, 2002.

PEPATO, M.T. et al. Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, p.1-7, 2004.

PEPATO, M.T. et al. Evaluation of the spouted bed dried leaf extract of *Bauhinia forficata* for the treatment of experimental diabetes in rats. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n. 42, p. 7165-7173, 2010.

PICOLI, T. *et al.* Teores de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em ratos que consumiram chás de *Bauhinia forficata*. In: XV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E VIII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2006, Pelotas. **Anais eletrônicos do XV Congresso de Iniciação Científica e do VIII Encontro de Pós-Graduação**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2006. Disponível em: <<http://www.ufpel.edu.br/cic/2006/cd/cs.htm>>. Acesso em: 16 jun. 2009.

SILVA, F. R. M. B. et al. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83 p. 33-37, 2002.

SILVA, K. L. da. ; FILHO, V. C. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

SILVA, E. J. R.; GONÇALVES, E. S.; AGUIAR, F. J. S.; EVÊNCIO, L. B.; LYRA, M. M. A.; COELHO, M. C. O. C.; FRAGA, M. C. C. A.; WANDERLEY, A. G. Toxicological studies on hydroalcohol extract of *Calendula officinalis* L.. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 332-336, 2007.

SOUSA, E. de. et al. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3, 7-O-()-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 5, p. 829-832, 2004.

SOUZA, C. R. F. de. **Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos *spray-dryer* e leito de jorro**. 2003. 180 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2003.

VOLPATO, G.T. et al. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 131–137, 2008.

7. Conclusões

CONCLUSÕES

Os métodos de extração influenciam diretamente no teor de CNF e o TFT dos extratos de folhas de *B. forficata*. Os parâmetros TFT, teor de CNF e RS foram críticos na seleção do método extrativo mais eficiente. A extração com agitação a 200 rpm e aquecimento a 40°C por 1 hora obteve maior eficiência de extração em menor tempo. Na otimização do processo de extração as variáveis tempo de agitação e temperatura não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$), enquanto que as variáveis teor alcoólico e relação mp/ms diferiram significativamente. Os resultados são considerados úteis para um desenvolvimento em larga escala para extração de flavonoides a partir de folhas de *B. forficata*, visto que o método de obtenção do extrato é rápido, conveniente e viável industrialmente.

A caracterização físico-química dos extratos secos de *B. forficata* forneceu dados importantes para determinação de parâmetros de qualidade, haja vista que tais parâmetros ainda não foram estabelecidos por compêndios oficiais e o conhecimento prévio das características físico-químicas dos extratos secos é importante para o desenvolvimento e controle de qualidade de fitoterápicos. Os resultados obtidos corroboram para a escolha do produto seco por aspersão de *B. forficata* como produto com propriedades tecnológicas mais adequadas para a formulação de formas farmacêuticas sólidas.

A administração aguda e subaguda de produto seco por aspersão de folhas de *Bauhinia forficata* Link não induziu alterações significativas nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e morfológicos analisados em camundongos machos. No entanto, o aumento dos níveis de ALT e fosfatase alcalina indicam uma possível toxicidade hepática.

8. Perspectivas

PERSPECTIVAS

- Realizar estudo de estabilidade dos produtos secos desenvolvidos;
- Realizar dissolução dos produtos secos desenvolvidos;
- Realizar compatibilidade extrato-excipiente por TG e HPLC;
- Realizar planejamento de formulações sólidas a base de *B. forficata*.

Referências

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DO SETOR FITOTERÁPICO, SUPLEMENO ALIMENTAR E DE PROMOÇÃO DA SAÚDE (ABIFISA). País deixa de gerar US\$ 5 bi por ano com fitoterápicos, 08 jun 2010. Disponível em : http://www.abifisa.org.br/noticias_ver.asp?news=3594. Acesso em: 18/08/2010.

Arigony, A. L. V. **Determinação química e biológica de *Bauhinia forficata* Link subespécie pruinosa (pata-de-vaca – Leguminosae)**. 2005. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.

Barbosa-Filho, J. M. et al. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 392-413, 2005.

Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional da Vigilância Sanitária, Resolução da Diretoria Colegiada, nº 14, 31 de março de 2010. Aprova o regulamento técnico sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2010.

Cazarolli, L. H. Follow-up studies on glycosylated flavonoids and their complexes with vanadium: Their anti-hyperglycemic potential role in diabetes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163, p. 177–191, 2006.

Cunha, A.M., *et al.*, Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Phytomedicine** (2009), doi:10.1016 /j.phymed.2009.06.007.

Engel, I. C. et al. Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 258-264, 2008.

Jorge, A. et al. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v. 149, p. 89–96, 2004.

Klein, T.; Longhini, R.; Bruschi, M. L.; Mello, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n.3, p.241-248, 2009.

Lorenzi, H.; Matos, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 544 p.

Lusa, M. G.; Bona, C. Análise morfoanatômica comparativa da folha de *Bauhinia forficata* Link e *B. variegata* Linn. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 196-211, 2009.

Menezes, F. de S. et al. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 08-13, 2007.

Pepato, M.T. *et al.* Evaluation of the spouted bed dried leaf extract of *Bauhinia forficata* for the treatment of experimental diabetes in rats. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n. 42, p. 7165-7173, 2010.

Sant' Ana, P.J.P; Assad, A.L.D. Programa de pesquisa em produtos naturais: a experiência da CEME. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 508-512, 2004.

Silva, K. L. Da. ; Filho, V. C. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

Sousa, E. de. et al. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3, 7-O-()-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 5, p. 829-832, 2004.

Toledo, A.C.O.; Hirata, L.L.; Buffon, M.C.M.; Miguel, M.D.; Miguel, O.G.; Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n.1/2, jan./dez. 2003, p. 7-13.

Ruela, H. S. et al. *Bauhinia forficata*: estudo fitoquímico e farmacológico. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007. Disponível em: < <http://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos/T1483-1.pdf> >. Acesso em: 2. jun. 2009.

Vaz, A. M. S. F.; Tozzi, A. M. G. A. Sinopse de *Bauhinia* sect. *Pauletia* (Cav.) D.C. (Leguminosae: Caesalpinoideae: Cercideae) no Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 477-491, 2005.

Volpato, G.T. et al. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 131–137, 2008.