



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



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TESE DE DOUTORADO

**DESENVOLVIMENTO DE FORMA FARMACÊUTICA GRANULADO
EFERVESCENTE À BASE DE EXTRATOS DE *Bauhinia forficata* Link PARA
OBTENÇÃO DE UMA ASSOCIAÇÃO-DOSE-FIXA COMO ALTERNATIVA NO
TRATAMENTO DO DIABETES *MELITTUS***

MAGALY ANDREZA MARQUES DE LYRA

RECIFE

2013

MAGALY ANDREZA MARQUES DE LYRA

**DESENVOLVIMENTO DE FORMA FARMACÊUTICA GRANULADO
EFERVESCENTE À BASE DE EXTRATOS DE *Bauhinia forficata* Link PARA
OBTENÇÃO DE UMA ASSOCIAÇÃO-DOSE-FIXA COMO ALTERNATIVA NO
TRATAMENTO DO DIABETES *MELITTUS***

Tese de doutorado submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências Farmacêuticas na área de concentração: Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

RECIFE

2013

L992d Lyra, Magaly Andreza Marques de.
Desenvolvimento de forma farmacêutica granulado efervescente à base de extratos de Bauhinia Forficata Link para obtenção de uma associação dose-fixa com alternativa no tratamento do diabetes mellitus / Magaly Andreza Marques de Lyra. – Recife: O autor, 2013.
187 f. il. ; 30 cm.

Orientador: Pedro José Rolim Neto.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.
Inclui Referências.

1. Flavonoides. 2. Diabetes Mellitus. I. Rolim Neto, Pedro José. (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-005)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Recife, 29 de maio de 2013.

Tese de Doutorado de Magaly Andreza Marques de Lyra defendida e APROVADA, por decisão unânime, em 29 de maio de 2013, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE, ORIENTADOR E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto
(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: 

SEGUNDA EXAMINADORA INTERNA: Prof.ª Dr.ª Miracy Muniz de Albuquerque
(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: 

TERCEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho
(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: 

PRIMEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Prof.ª Dr.ª Rosali Maria Ferreira da Silva
(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: 

SEGUNDA EXAMINADORA EXTERNA: Prof.ª Dr.ª Keyla Emanuelle Ramos da Silva
(Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas - UFAM).

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. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondani

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

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

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

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite

Dedico este trabalho às pessoas mais especiais da minha vida: à
minha mãe e ao meu esposo Jonathan Machado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, o criador de todas as coisas, por toda sabedoria e providência fornecida durante todos os momentos desta jornada.

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

À minha equipe de projeto **Monize Peixoto, Rebeka Monteiro, Matheus Angelos e Graziella Marques**, pelo empenho e por todos os momentos disponibilizados na execução desse projeto.

Aos meus queridos amigos do **LTM**, pelas experiências compartilhadas e apoio.

Aos professores e laboratórios parceiros: Prof^a. **Miracy Muniz** do Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, ao Prof. **Luiz Alberto de Lira** e Prof. **Haroldo Xavier** do Laboratório de Farmacognosia, e ao Prof. **Lívio César** da Universidade Federal de Piauí. Agradecemos pela colaboração e toda a ciência compartilhada com o nosso grupo de pesquisa.

Ao meu esposo, **Jonathan Machado**, e minha mãe **Ladijane Lyra**, que sempre me apoiaram e esteve ao meu lado em todas as situações na conclusão desta etapa da minha vida. Obrigada por tudo.

Aos meus familiares, em especial a meu irmão **Luismar Lyra** e à minha cunhada **Alessandra Lyra**, pela presença e incentivo constante na minha vida.

À **Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)** pela bolsa concedida para execução deste trabalho.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“É preciso amar as pessoas como se não houvesse
amanhã, porque se você parar para pensar, na
verdade não há”.

Renato Russo

RESUMO

A diabetes *mellitus*, por tratar-se de uma doença crônica e por apresentar um crescimento acentuado na sociedade mundial, tornou-se alvo da comunidade científica na busca de novas alternativas terapêuticas. Diversos estudos evidenciam as propriedades farmacológicas (hipoglicemiante e antidiabética) de espécies vegetais empregadas no tratamento desta enfermidade. Nesse contexto, *Bauhinia forficata* Link, comumente conhecida como pata-de-vaca, figura entre as espécies mais utilizadas para esse fim. Os esforços atuais focalizam na simplificação dos esquemas terapêuticos, para isso, vem sendo desenvolvidas formulações multifármacos, denominadas Associação-dose- fixa (ADF), que através da associação de ativos combinados em uma mesma forma farmacêutica. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma forma farmacêutica granulado efervescente à base de extratos de *Bauhinia forficata* Link para uma futura obtenção de uma ADF como nova alternativa no tratamento do diabetes *mellitus*. A obtenção da solução extrativa foi realizada através de métodos com parâmetros otimizados para aumento da eficiência extrativa de metabólitos. Os métodos extrativos avaliados foram percolação, maceração, aquecimento a 50°C, agitação a 200 rpm e agitação com aquecimento. As metodologias por Espectrofotometria no Ultravioleta (UV) e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a quantificação dos marcadores foram desenvolvidas e validadas segundo a legislação vigente. As soluções extrativas sofreram processo de secagem por aspersão e por liofilização, os quais foram caracterizados por diferentes técnicas como Termogravimetria (TG), Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC), Espectroscopia no Infravermelho (IV), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e outras, como também foi avaliado toxicologicamente através do estudo agudo e subcrônico em animais. O produto farmacêutico foi desenvolvido através da elaboração da formulação de granulados efervescentes por um estudo qualiquantitativo, em que se utilizaram diferentes proporções de extratos e excipientes. Nos resultados, observou-se para as amostras um perfil fitoquímico, apresentando: flavonóides, proantocianidinas, leucoantocianidinas, triterpenos e esteróides. As metodologias desenvolvidas mostraram-se específicas, sensíveis, precisas, exatas e robustas, sendo adequadas para as análises realizadas. Na 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. A formulação de granulados efervescentes desenvolvidas atendeu a todos os requisitos da avaliação de controle de qualidade, o que proporcionará a população diabética uma nova alternativa terapêutica fitomedicamentosa com qualidade.

Palavras-chave: granulado, flavonoides, caracterização, diabetes mellitus.

ABSTRACT

Diabetes mellitus, because it is a chronic disease and present a sharp growth in Brazilian society, became the target of the scientific community in the search for new therapies. Several studies show the pharmacological properties (anti-diabetic and hypoglycemic) of plant species used in the treatment of this disease. In this context, the *Bauhinia forficata* Link, commonly known as paw-of-cow, among the species most commonly used for this purpose. Current efforts focus on the simplification of treatment regimens for this, multidrug formulation has been developed, called Association-fixed-dose (ADF), which through the combination of assets combined in a single dosage form. The aim of this study was to develop pharmaceutical form effervescent granules based on extracts of *Bauhinia forficata* Link to obtaining a Fixed-Dose-Association as a new alternative in the treatment of diabetes mellitus. Obtaining the extraction solution was through methods with parameters optimized to increase the extraction efficiency of metabolites. The methods were evaluated extractive percolation, maceration, heating to 50 ° C, shaking at 200 rpm and stirring with heating. The methodologies by spectrophotometry Ultraviolet (UV) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for the quantification of active compounds have been developed and validated according to current legislation. The extractive solutions underwent a process of spray drying and freeze drying, which were characterized by different techniques such as thermogravimetry (TG), Differential Scanning Calorimetry (DSC), infrared spectroscopy (IR), scanning electron microscopy (SEM) and other, was also evaluated toxicologically by acute and subchronic studies in animals. The pharmaceutical product was developed through the preparation of effervescent granular formulation qualiquantitativo by a study, which used different proportions of extracts and excipients. In the results, it was observed for samples one phytochemical profile, featuring: flavonoids, proanthocyanidins, leucoanthocyanidins, triterpenes and steroids. The methodologies developed proved to be specific, sensitive, precise, accurate, robust, and suitable for the analyzes. In the evaluation of extractive methods, extraction with shaking at 200 rpm, heating to 50 ° C showed higher extraction efficiency of canferitrina and total flavonoid. The best method was optimized by evaluating the parameters plant mass / mass solvent, temperature, alcohol content of the organic solvent, stirring speed. Drying of the extracts was not observed influence on the characteristics of the constituents of the powder after spray drying in relation to extract fluid through the techniques used. There was no change in mass gain, feed and water consumption, haematological parameters and biochemical and morphological analysis in male mice during treatment for 30 consecutive days. The effervescent granular formulation developed met all the requirements of the assessment of quality control, which will provide the diabetic population a new therapeutic alternative fitomedicamentosa quality.

Keywords: granular, flavonoids, characterization, diabetes mellitus.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. REVISÃO DA LITERATURA	14
Artigo I – Revisão Sistemática: Usos, Aplicações e Tendências Terapêuticas da <i>Bauhinia forficata</i> Link.....	14
Artigo II – Aplicação de metodologias analíticas na caracterização de drogas vegetais e extratos secos para o desenvolvimento de fitoterápicos.....	14
4. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E FÍSICO-QUÍMICA.....	51
Artigo III– Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link coletada em duas regiões brasileiras.....	51
5. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS POR ESPECTROFOTOMETRIA	65
Artigo IV – Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link	65
6. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	85
Artigo V – Development and validation of analytical method to quantify kaempferitrin in leaves of <i>bauhinia forficata</i> Link (fabaceae) by RP HPLC-DAD.....	85
7. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS EXTRATIVOS NOS TEORES DE CANFERITRINA E FLAVONÓIDES TOTAIS EM FOLHAS DE <i>Bauhinia forficata</i> Link.....	99
Artigo VI – Avaliação da influência dos métodos extrativos nos teores de canferitrina e flavonóides totais em folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link	99
8. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO SECO.....	118
Artigo VII – Obtenção e caracterização físico-química do extrato seco por liofilização e produto seco por aspersão de <i>Bauhinia forficata</i> Link.....	118
9. TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA	142
Artigo VIII – Toxicidade aguda e subaguda de produto seco por aspersão de folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link	142
10. DESENVOLVIMENTO DA FORMA FARMACÊUTICA	160
Artigo IX – Desenvolvimento tecnológico de granulados efervescentes a base de extratos de <i>Bauhinia forficata</i> link como alternativa no tratamento do diabetes melittus.....	160
11.Conclusão e perspectivas	178
Referências	181

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 e 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 identificadas no vegetal *Bahuinia*, 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, *Bauhinia forficata* Link é a mais utilizada, sendo comumente conhecida, como “pata-de-vaca verdadeira” ou “insulina natural” (Silva; Filho, 2002; Arigony, 2005; Volpato et al., 2008).

A *B. 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 que vai do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (Lorenzi; Matos, 2002; Vaz; Tozzi, 2005).

A abordagem etnofarmacêutica confirma o uso de *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 para a comunidade farmacêutica, sua espécie vegetal foi solicitada para gerar fitoterápicos que poderão ser disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e sua descrição morfoanatômica vem sendo requisitada pela Farmacopéia Brasileira, pois é freqüentemente confundida com outras espécies do gênero. Logo, informações com relação a sua descrição morfoanatômica e das diferenças com as outras espécies do mesmo gênero se faz de extrema importância na análise e no controle de qualidade, uma vez que existe uma diversidade de preparações a base da folhas de *B. forficata* (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 utilização de métodos analíticos visando à quantificação e controle da manutenção dos constituintes químicos ativos ou de referência, presentes na matéria-prima vegetal, produtos intermediários e produto final. Esses métodos permitem a avaliação da qualidade do fitoterápico, promovem a garantia da constância da ação terapêutica e a segurança de sua utilização, sendo requisitos indispensáveis, portanto, ao seu registro no Brasil (Toledo et al., 2003; Brasil, 2010).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver forma farmacêutica granulado efervescente à base de extratos de *Bauhinia forficata* Link para uma futura obtenção de uma Associação-Dose-Fixa como alternativa no tratamento do diabetes *mellitus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar caracterização fitoquímica e físico-química das folhas *B. forficata* Link;
- Desenvolver e validar dois métodos espectrofotométricos para quantificação de flavonóides totais do extrato fluido em folhas de *B. forficata*, um por diluição direta e outro por hidrólise ácida;
- Desenvolver e validar um método por CLAE para quantificação de canferitrina em folhas de *B. forficata*;
- Avaliar comparativamente a influência dos métodos extrativos nos teores de canferitrina e flavonóides totais em folhas de *B. forficata* Link e otimizar o melhor método extrativo.
- Obter e caracterizar os extratos secos liofilizados e produto seco por aspersão;
- Realizar estudo de toxicidade aguda e subcrônica dos extratos secos;
- Desenvolver formulações sólidas (granulados efervescentes) à base de extratos secos de *B. forficata*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Artigo I – Revisão Sistemática: Usos, Aplicações e Tendências Terapêuticas de *Bauhinia forficata* Link

Artigo publicado à Revista Brasileira de Farmacognosia

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

Artigo submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

REVISÃO SISTEMÁTICA: USOS, APLICAÇÕES E TENDÊNCIAS TERAPÊUTICAS DA *Bauhinia forficata* LINK

RESUMO

Este estudo teve como objetivo realizar uma revisão sistemática sobre os usos e aplicações terapêuticas da *Bauhinia forficata* Link visando o conhecimento de informações baseadas em evidências sobre suas propriedades biológicas. Dentre os artigos incluídos neste estudo, 55% buscou a pesquisa e comprovação das diversas ações farmacológicas promovidas pela *B. forficata* L., principalmente a partir dos extratos desta planta. Alguns artigos trataram apenas do isolamento e purificação dos constituintes fitoquímicos (30%), outros isolaram os constituintes e ainda testaram sua ação farmacológica (6%). Também foram encontrados estudos etnofarmacológicos que buscaram o conhecimento popular sobre o uso desta espécie vegetal. A redução da glicemia em modelos experimentais de diabetes, a ação antioxidante e a presença de flavonoides como principais constituintes fitoquímicos foi comprovada cientificamente por vários estudos demonstrando o alto potencial farmacológico desta espécie vegetal.

Palavras-chave: *Bauhinia forficata* Link; Revisão sistemática; aplicações terapêuticas.

ABSTRACT

This study aimed to perform a systematic review on the uses and therapeutic applications of *Bauhinia Link forficata* seeking knowledge of evidence-based information about their biological properties. Among the articles included in this study, 55% sought research and verification of various pharmacological actions promoted by *B. forficata* L., mainly from the extracts of this plant. Some articles addressed only the isolation and purification of phytochemicals constituents (30%), other constituents isolated and further tested their pharmacological action (6%). Also found ethnopharmacological studies that sought to popular knowledge about the use of this plant species. The reduction of blood glucose in experimental models of diabetes, and the presence of antioxidant flavonoids as major constituents phytochemicals was scientifically proven by several studies demonstrating the high pharmacological potential of this plant species.

Keywords: *Bauhinia forficata* Link; systematic review; therapeutic applications.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para fins terapêuticos é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade e acompanha a evolução da história da farmácia e dos medicamentos. A demanda pela utilização de plantas medicinais na cura ou prevenção de doenças tem impulsionado a indústria farmacêutica na busca por espécies vegetais com potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos. Além disso, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependem

das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (Muller 2007; Veiga-Junior 2008; Simões 2010).

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta e possui uma rica diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais. Este cenário propiciou a aprovação em 22 de julho de 2006 da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos pelo governo federal, com a finalidade de assegurar o acesso e a correta utilização das plantas medicinais e fitoterápicos, a utilização sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (PNPMF, 2006). Mais tarde, com o intuito de direcionar as pesquisas científicas na área, publicou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para o Sistema Único de Saúde (RENISUS) que conta com 71 espécies vegetais com promissor potencial farmacológico para o desenvolvimento de produtos terapêuticos (RENISUS, 2009). Dentre as espécies divulgadas na RENISUS, figuram alguns representantes do gênero *Bauhinia*, sendo a *Bauhinia forficata* Link, umas das espécies mais estudadas no Brasil e que apresenta maior número de pesquisas quanto à atividade hipoglicemiante (Silva e Cechinel Filho 2002).

Bauhinia forficata caracteriza-se como uma árvore de porte pequeno, pertencente à família Fabaceae, que abrange mais de 300 espécies do gênero *Bauhinia* e está distribuída, principalmente em regiões tropicais e em países como Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Brasil. É conhecida popularmente como pata de vaca, devido ao formato de suas folhas, e sua importância está voltada para o seu largo uso popular para diversas finalidades terapêuticas. A infusão de suas folhas é utilizada como agente diurético, tônico e depurativo, mas se destaca por seu uso como hipoglicemiante, sendo inclusive conhecida como insulina vegetal (Pepato et al. 2004; Moraes et al. 2010).

Diante do elevado uso popular da *B. forficata* para fins terapêuticos associado ao grande interesse pela pesquisa com esta espécie vegetal objetivou-se neste estudo realizar uma revisão sistemática sobre a *B. forficata* visando o conhecimento de informações baseadas em evidências sobre suas propriedades biológicas, utilizando para isso um levantamento secundário de estudos experimentais realizados e publicados com esta espécie vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

A estratégia de busca utilizada procurou alcançar todos os artigos de caráter experimental existentes na literatura, que abordaram a pesquisa de componentes e ações

farmacológicas presentes na *B. forficata* L., assim como estudos sobre o seu uso e aplicações farmacêuticas. Os artigos foram pesquisados nas bases de dados Science Direct, Scielo (Scientific Electronic Library Online) e na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) que é coordenada pelo Centro Latino Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde (BIREME), utilizando como descritor a palavra *Bauhinia forficata*. Todo este levantamento ocorreu entre os dias 2 e 6 de setembro de 2012.

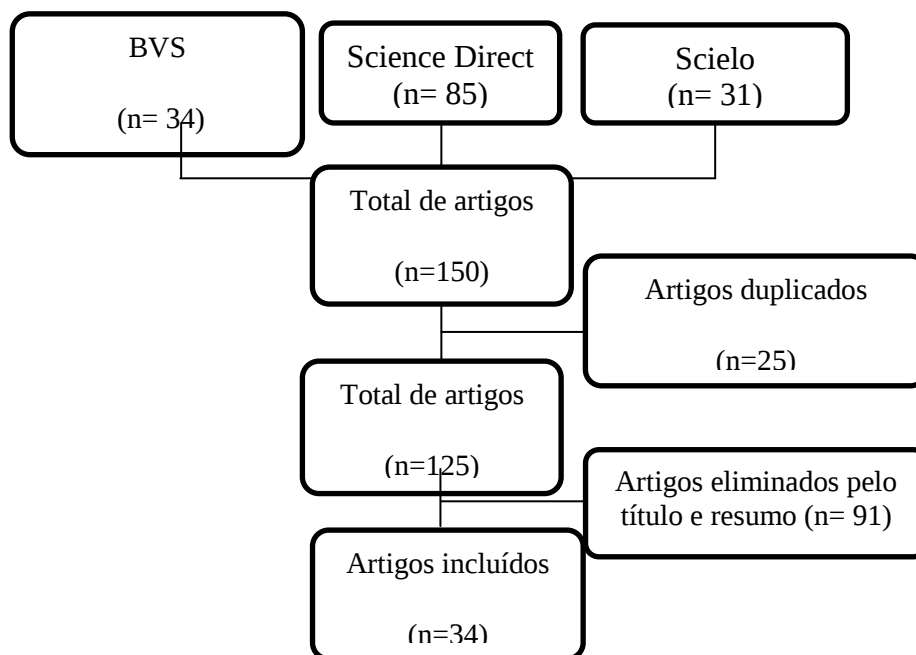
Inicialmente realizou-se a análise dos títulos e resumos dos artigos encontrados como triagem para a escolha de estudos de relevância significativa para a pesquisa. Os estudos repetidos e não relevantes foram excluídos neste momento. Após esta etapa, os artigos incluídos foram analisados na íntegra e foram selecionados aqueles que se adequassem aos seguintes critérios de inclusão estabelecidos: artigos oriundos de pesquisas experimentais referentes a pesquisa de componentes e ações farmacológicas presentes na *Bauhinia forficata* L., assim como estudos sobre o seu uso e aplicações farmacêuticas. Não houve restrição com relação ao ano de publicação e ao idioma da publicação e os estudos de revisão foram excluídos.

Todas as análises foram realizadas independentemente por dois autores e as discordâncias que por ventura ocorreram foram resolvidas por consenso entre os pesquisadores ou pela avaliação de um terceiro autor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 150 artigos foi encontrado na pesquisa e após a exclusão dos artigos duplicados e aplicação dos critérios de inclusão, apenas 34 foram avaliados detalhadamente. A figura 1 mostra um esquema das escolhas dos artigos estudados.

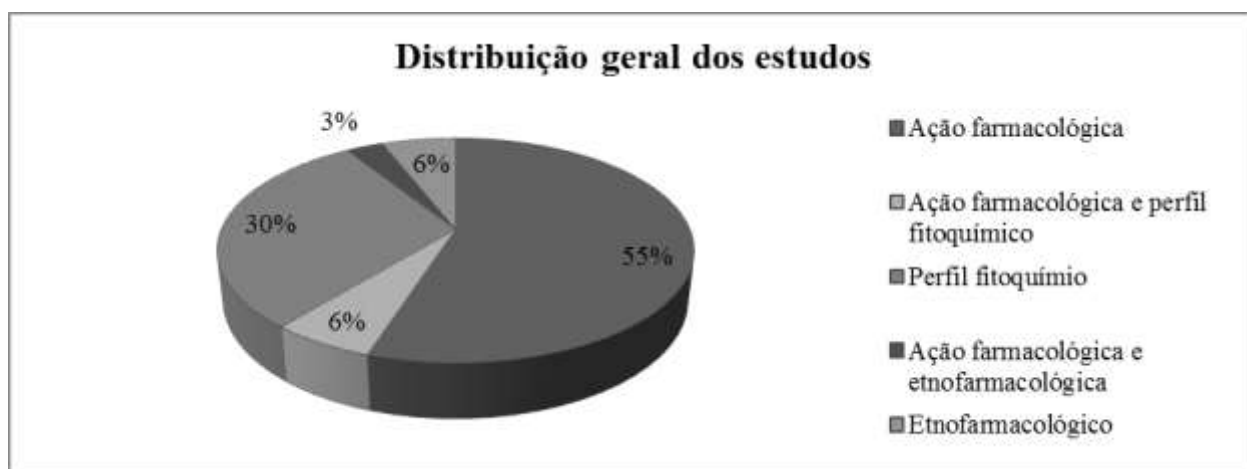
Figura 1 - Delineamento da escolha dos estudos



Legenda: BVS - Biblioteca Virtual em Saúde; Scielo - Scientific Electronic Library Online; n – número de artigos.

A maioria dos estudos encontrados buscou a pesquisa e comprovação das diversas ações farmacológicas promovidas pela *B. forficata*, principalmente a partir dos extratos desta planta. Alguns artigos trataram apenas do isolamento e purificação dos constituintes fitoquímicos (30%), outros isolaram os constituintes e ainda testaram sua ação farmacológica (6%). Também foram encontrados estudos etnofarmacológicos que buscaram o conhecimento popular sobre o uso desta espécie vegetal. A distribuição geral dos estudos incluídos encontra-se representado na figura 2.

Figura 2: Distribuição geral dos estudos



Aspectos Farmacológicos

Dentre os artigos incluídos, 55% estudaram a presença de atividades farmacológicas presentes na *B. forficata* L. A ação hipoglicemiante foi a mais pesquisada estando presente em 12 dos 20 estudos encontrados sobre ação farmacológica.

O fato de a maioria dos estudos buscarem uma comprovação da atividade hipoglicemiante desta planta está relacionado ao seu largo uso pela população para esta finalidade. A comprovação de que o uso da planta não provoca toxicidade ou efeitos adversos quando utilizados em grupos como gestantes é outro fator que leva a sua pesquisa. A maioria dos estudos presentes nesta revisão sistemática apresentaram resultados positivos para presença de ação hipoglicemiante nesta espécie. Foram encontradas pesquisas em diferentes modelos animais normoglicêmicos e hiperglicêmicos utilizando diferentes soluções extrativas e compostos isolados como tratamento. Estes dados podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1 – Pesquisas sobre as evidências da atividade farmacológica da *Bauhinia forficata* Link.

HIPOGLICEMIANTE		
Autor e Ano	Método utilizado	Conclusão
Silva et al. (2002)	SE: Fração n-butanol do extrato hidroalcolico das folhas; Ensaio in vivo: Ratos albinos machos Swiss diabéticos (induzidos por aloxano mono-hidratado-70mg/Kg) e ratos normais tiveram sua glicemia avaliada após a administração da fração extrativa. As doses utilizadas foram: 400, 500, 600 e 800 mg / kg	Efeito hipoglicemiante em ratos normais (500 e 600mg/Kg) e induzidos em todas as dosagens, sendo 800mg/Kg a mais potente.
Pepato et al. (2002)	SE: extrato aquoso (decoção das folhas-150g/l); Ensaio in vivo: ratos wistar diabéticos induzidos por streptozotocina e não diabéticos receberam em média $35,2 \pm 7,8$ ml/100 g de peso corporal por aproximadamente 30 dias.	Efeito hipoglicemiante observado nos ratos diabéticos.
Pepato et al. (2004)	SE: extrato aquoso (decocto) das folhas (150g/l). Ensaio in vivo: G1- ratos normais e estreptozotocina-diabéticos receberam a SE; G2- ratos normais e diabéticos induzidos receberam água. Ambos por via oral durante 33 dias. A atividade sérica da toxicidade foi avaliada através dos marcadores lactato desidrogenase, creatina quinase, amilase, enzima conversora de angiotensina e bilirrubina	Potencial tratamento para diabetes e não produz efeitos tóxicos mensuráveis.
Jorge et al. (2004)	SE: Fracção de n-butanol do extrato hidroetanólico das folhas; Ensaio in vivo dos efeitos da kaempferitrina isolada da SE. Ratos wistar diabéticos induzidos por aloxano receberam G1-100mg/kg de kaempferitrina e G2- 0,5 ml de solução hidroetanólica 1% por gavagem e foram avaliados por 24h.	Efeito hipoglicemiante comprovado.
Lino et al. (2004)	SE: Extrato aquoso, etanólico e hexânico; In vivo: ratos diabéticos induzidos por aloxano receberam durante 7 dias, doses de 200 e 400 mg / kg de extrato oralmente.	Ação hipoglicemiante confirmada.
Souza et al. (2004)	SE: Fracção de n-butanol das folhas; Ensaio in vivo dos efeitos da kaempferitrina isolado da SE. Ratos diabéticos induzidos por aloxano e ratos não diabéticos: Dose: 50, 100 e 200 mg/kg de Kaempferitrina. Ensaio in vitro: DPPH e Mieloperoxidase	Ação hipoglicemiante e antioxidante observada.
Vasconcelos et al. (2004)	SE: extrato aquoso <i>Bauhinia forficata</i> L. (EABF) contra condição de hiperglicemia promovida por o veneno do escorpião Tityus serrulatus (TSV). Ensaio in vivo: TSV (500 ug / kg, ip) para indução; EABF (1 g / kg, po), 24, 12 e 1 h antes e imediatamente após TSV ou solução salina e insulina em uma dose única (1,5 UI / kg , sc) após TSV.	Reduz a hiperglicemia induzida por TSV. Porém, não neutraliza outros fatores provocados pelo envenamento, o que o torna não indicado nesta

Damasceno et al. (2004)	SE: Extrato aquoso das folhas; Ensaio in vivo : ratos Wistar Fêmeas diabéticas (induzidas por estreptozotocina) virgens foram acasaladas com ratos Wistar machos não diabéticos e esperado o período gestacional. Uma vez nesta condição, foram divididos em 4 grupos: G1 = não diabéticos; G2 = não diabéticos tratados com extrato de <i>B. forficata</i> ; G3 = diabético e G4 = diabéticos tratados com extrato de <i>B. Forficata</i> L. O tratamento foi administrado oralmente, por gavagem e as doses foram de 500, 600 e 1000 mg / kg consecutivamente.	situação. Não houve controle da hiperglicemia materna.
Menezes et al. (2007)	SE: Extrato aquoso das folhas. Ensaio in vivo : Camundongos normoglicêmicos (n=8) receberam 0,1 ml de extrato/10g de peso e sua glicemia foi avaliada 2, 4, 6 e 8 horas após a administração do extrato. O grupo controle recebeu apenas água destilada.	Ação hipoglicemiante confirmada.
Volpato et al. (2008)	SE: Extrato aquoso das folhas. Ensaio in vivo : ratas Wistar grávidas diabéticas (induzido por streptozotocina) e não diabéticas. Em dosagens crescentes foram administradas 500, 600 e 1000 mg / kg do extrato aos seguintes grupos: G1 = não diabéticos (n = 13); G2 = não diabéticos tratados com <i>B. Forficata</i> (n = 13); G3 = diabéticos (n = 18); G4 = diabéticos tratados com <i>Bauhinia forficata</i> (n = 16).	Não houve ação hipoglicemiante.
Moraes et al. (2010)	SE: Extrato aquoso das folhas (infusão). Ensaio in vivo : portadores de Diabetes Melitus tipo 2 (n=20). G1 = Faz uso de infusão de folhas de <i>B. forficata</i> ; G2 = não faz uso. Foi realizada quinzenalmente, durante 75 dias, a avaliação da glicemia em jejum através do Human Gene Therapy (HGT).	Ação hipoglicemiante confirmada.
Cunha et al. (2010)	SE: Extrato hidroalcoólico das folhas, posteriormente secos em estufa (ESE) e em Spray dryer (ESP) e na forma de granulado (EUG). Ensaio in vivo : ratos diabéticos induzidos por streptozotocina. Os ratos (n = 6/grupo) foram divididos: G1 - normais tratados com veículo (salina, 3 ml / kg), G2 - diabéticos tratados com veículo (salina, 3 ml / kg), G3 - diabéticos tratados com glibenclamida (5 mg / kg); G4 - diabéticos tratados com ESE (200 mg / kg). ; G5 - diabéticos tratados com ESP (200 mg / kg) e G6 - diabéticos tratados com EUG (200 mg / kg).	A secagem do extrato não alterou sua atividade hipoglicemiante e nem o seu teor de flavonoides.

ANTIOXIDANTE

Autor e Ano	Método utilizado	Conclusão
Souza et al. (2004)	SE: Fracção de n-butanol das folhas <i>Bauhinia forficata</i> ; Ensaio in vivo dos efeitos de Kaempferol-3, 7-O-(alfa)-dirhamnoside (kaempferitrina) isolado da SE. Em ratos diabéticos induzidos por aloxano e ratos não diabéticos: Dose: 50, 100 e 200 mg/kg de Kaempferitrina. Ensaio in vitro : DPPH e Mieloperoxidase	Ação hipoglicemiante e antioxidante observada.
Silva et al. (2007)	SE: composta por metanol, etanol, água destilada e ácido clorídrico (69:20:10:1, v: v: v: v) em contato com as folhas, casca e caule. Teste in vitro : Fenois totais - método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. A actividade antioxidante foi determinada pelo ensaio TEAC utilizando-se os catiões radicais ABTS e ORAC ^{Fluorescein} .	Relação existente entre a presença de flavonoides e o potencial antioxidante.
Khalil et al. (2008)	SE: Extrato aquoso (decocção) das folhas e posterior secagem por liofilização. Ensaios in vitro : ABTS; NADH/PMS//NBT; MPO	Ação antioxidante detectada.
Souza et al. (2009)	SE: Extrato hidroalcoólico das folhas e posterior secagem por spray dryer e leito do jorro. Ensaios in vitro : 2,2-difenil-1-picrilhidrazil radical (DPPH) e inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe +2 (LPO)	Ação antioxidante detectada em ambas as técnicas.

ANTIMALÁRICA, ANTICOAGULANTE, ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA, ANTIPROLIFERATIVA

Autor e Ano	Método utilizado	Conclusão
Deharo et al. (2001)	SE: extrato etanólico da casca; Ensaio in vivo : camundongos swiss infectados com células parasitadas receberam tratamento durante 3 dias nas doses crescentes de 100 a 500mg/kg. A supressão da malária foi analisada através de esfregaço sanguíneo.	Não apresentou ação antimalárica.
Souza et al. (2004)	SE: extrato metanólico das partes aéreas; Ensaio in vitro : Teste de difusão de disco contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Não apresentou atividade, os microorganismos testados foram resistentes ao extato.
Oliveira et al.	SE: Extrato aquoso das partes aéreas; Ensaio in vitro : enzima serina	Elevado potencial

(2005)	protease foi isolada do veneno e misturada ao extrato. Todas as misturas foram incubadas durante 30-60 min a 37 ° C e as alíquotas foram testadas em sistemas de teste diferentes. A atividade de coagulação foi testada com 200µL de plasma humano.	anticoagulante, mas não indicado para a neutralização do veneno.
LIM et al. (2006)	O composto HY52 (FM= C ₁₇ H ₃₀ O ₂ N ₂) foi isolado a partir de extrato etanólico das folhas e testado, quanto a atividade antiproliferativa frente às células de HeLa (adenocarcinoma cervical humano)- Ensaio in vitro	Inibiu a proliferação celular, mantendo-as na fase G1.
Svetaz et al. (2010)	SE: extrato etanólico; Ensaio in vitro: Técnica de Microdiluição para <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Microsporum gypseum</i> e <i>Epidermophyton floccosum</i>	Ação antifúngica contra <i>Trichophyton rubrum</i> ; <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ; <i>Epidermophyton floccosum</i> .
Silva et al. (2012)	Elucidação de uma nova lecitina, denominada BFL, extraída e purificada a partir de sementes de <i>B. Forficata</i> e teste in vitro de sua ação anticoagulante.	<i>BFL</i> apresentou ação anticoagulante.

Legenda: ABTS - 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); PMS - Phenazine methosulfate; NBT - Nitroblue tetrazolium; NADH- Nicotinamide Adenine Dinucleotide. TEAC - trolox equivalent antioxidant capacity; ORAC_{Fluorescein} - oxygen radical antioxidant capacity using fluorescein as fluorescent probe; FM – Fórmula Molecular

O Diabetes é uma condição patológica de etiologia multifatorial que se caracteriza pela manutenção de níveis elevados de glicemia, o que provoca distúrbios no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. A ausência total ou parcial da insulina e/ou a deficiência funcional dos receptores durante a absorção da glicose são fatores que podem promover esta condição (DSBD, 2009). Muitas plantas são utilizadas como tratamento desta condição patológica e estudos etnofarmacológicos evidenciam o uso da *B. forficata* L. pela população (Silva et al. 2002; Souza et al. 2004).

Os primeiros ensaios sobre a atividade hipoglicemiante desta espécie vegetal foram realizados por Juliani em 1929 e 1931 e demonstraram efeitos positivos em pacientes diabéticos (Juliani 1941 & Lima 2009). A partir de então vários estudos foram realizados utilizando-se diferentes modelos animais e também diferentes preparações a partir da *B. forficata*.

Em estudo realizado por Silva et al. (2002) utilizando a fração n-butanol do extrato hidroalcoólico da *B. forficata* foi evidenciado a presença de ação hipoglicemiante em ratos normais e diabéticos induzidos por aloxano. O fato de apresentar esta ação em ratos normais levou a suposição do possível mecanismo de ação ocorrer através de atraso do catabolismo da insulina ou através de inibição da reabsorção da glicose pelos rins. Resultado semelhante foi encontrado por Sousa et al. (2004) que também evidenciou ação hipoglicemiante em ratos normais e diabéticos induzidos, só que utilizando como teste um composto flavonóide, canferitrina, isolado a partir da fração n-butanólica de extrato hidroalcoólico das folhas de *B. forficata*.

Associado a ação hipoglicemiante, Lino et al. (2004) demonstrou a redução de parâmetros lipídicos em ratos tratados com extrato etanólico, aquoso e hexânico das folhas de *B. forficata*.

A glicemia de jejum de pacientes diabéticos que fizeram uso de infusão das folhas de *B. forficata* durante 75 dias foi comparada a um grupo de portadores da doença que não fizeram uso do chá. Foi constatada redução significativa da glicemia no grupo usuário da infusão (Moraes et al. 2010). Este resultado corrobora com vários outros estudos, que também testaram a ação do extrato aquoso e hidroalcoólico das folhas de *B. forficata* em modelos animais (ratos) normoglicêmicos e diabéticos induzidos obtendo-se resultados satisfatórios com relação à redução da glicemia (Pepato et al. 2002; Lino et al. 2004; Vasconcelos et al. 2004; Menezes et al. 2007). No entanto, quando estudada esta ação frente ratas grávidas, Damasceno (2004) e Volpato (2008) mostraram que o extrato aquoso não apresentou ação hipoglicemiante nas doses testadas. Porém, o extrato foi considerado seguro e atuou aumentando os níveis da glutathione reduzida (GSH) nos ratos diabéticos, o que pressupõe um melhora nos efeitos oxidativos provocados pela condição de hiperglicemia.

Os flavonoides são os principais constituintes fitoquímicos desta espécie vegetal e a eles são atribuídas as principais razões pela ação hipoglicemiante presente na *B. forficata*. Porém, ainda existem muitas controvérsias com relação ao mecanismo de ação pelo qual estes compostos agem (Lino et al. 2004; Cunha et al. 2010). Embora maioria dos estudos comprove ação redutora da glicemia do extrato de *B. forficata*, alguns trabalhos apresentam resultados discordantes, o que pode ser explicado por diversos fatores como: o protocolo experimental utilizado, a metodologia de obtenção dos extratos, condições ambientais, sazonais e de coleta da planta, além do cultivo e armazenamento da mesma. Todos estes fatores podem influenciar qualitativamente e quantitativamente na presença dos metabólitos característicos da planta importantes para o desenvolvimento da ação farmacológica (Silva et al. 2002; Pepato et al. 2010; Marques et al. 2012).

A pesquisa por compostos com potencial para inibir ou reduzir danos oxidativos provocados por radicais livres no corpo humano é cada vez mais real, uma vez que um grande número de doenças pode estar relacionado a esta condição. Os radicais livres podem causar danos oxidativos por oxidação de biomoléculas, que resultam em morte celular e consequentemente dano tecidual (Brighente et al. 2007; Moein et al. 2007).

A determinação da capacidade antioxidante in vitro de extratos e da Kaempferitrina, isolada a partir das folhas de *B. forficata* foi evidenciada em vários estudos (Sousa et al. 2004; Silva et al. 2007; Khalil et al. 2008; Sousa et al. 2009). Os flavonoides são responsáveis pela

atividade antioxidante presente em várias plantas e esta relação foi estudada e comprovada para extratos de *B. forficata* por possuir muitos flavonóides em sua constituição (Silva et al. 2007).

Uma característica muito promissora com relação aos estudos farmacológicos com esta planta foi a comprovação da manutenção de flavonoides e de ação antioxidante e hipoglicemiante em extratos que sofreram processos de secagem. A secagem de extratos vegetais é de extrema importância para o desenvolvimento de formas farmacêuticas intermediárias e finais, pois aumenta a estabilidade físico-química e reduz o índice de contaminação microbiana que é facilmente encontrado nos extratos fluidos. Em secagem realizada pelos métodos de *spray dryer* e leito do jorro houve comprovação da ação antioxidante no extrato seco obtido. A secagem por *spray dryer* promoveu uma maior degradação de flavonoides totais do que a secagem pelo leito do jorro, no entanto ambos os extratos secos apresentaram atividades antioxidantes semelhantes. Apesar de uma maior perda de flavonoides pelo método de *spray dryer*, possivelmente pelas altas temperaturas, a capacidade antioxidante similar dos extratos secos pode estar relacionada a suposta formação de produtos de reação de Maillard que podem ter contribuído de maneira individual ou em sinergismo com antioxidantes naturais para melhorar as características antioxidantes globais do produto (Souza et al. 2009).

Extratos fluidos hidroetanólicos também foram submetidos à secagem em estufa e em *spray dryer* e foi observado que além do teor de flavonoides preservado foi demonstrado ação hipoglicemiante em modelo animal diabético-induzido (Cunha et al. 2010).

Outras atividades farmacológicas foram buscadas em experiências com esta espécie vegetal comprovando a presença de ação anticoagulante e antifúngica para o extrato aquoso e etanólico, respectivamente, das folhas de *B. forficata* (Oliveira et al. 2005; Svetaz et al. 2010). E ainda, a inibição da progressão do ciclo celular de células HeLa, linhagem de células humana, por um composto isolado da planta, denominado pelos autores HY52 ($C_{17}H_{30}O_2N_2$) (Lim et al. 2006).

Estudos incluídos nesta pesquisa que buscaram a presença de atividade antimalárica e antibacteriana não apresentaram resultados positivos para estas ações. No entanto, apenas um estudo foi encontrado para cada situação, o que leva a necessidade de mais estudos em condições experimentais diferentes, para a confirmação da inexistência ou presença desta ação farmacológica.

Perfil Fitoquímico

Estudos relacionados à pesquisa e elucidação dos constituintes fitoquímicos da *B. forficata* totalizaram 30% dos estudos encontrados. O primeiro a descrever qualitativamente através de reações colorimétricas e de precipitação os constituintes presentes no extrato das folhas de *B. forficata* foi Miyake et al. (1986). Neste estudo foram encontrados alcaloides, flavonoides, óleo essencial, mucilagens e taninos.

Posteriormente, vários estudos foram realizados com a finalidade de isolamento e quantificação destes diversos compostos. A tabela 2 mostra os estudos que trouxeram a pesquisa e isolamento dos principais compostos fitoquímicos da *B. forficata*.

O gênero *Bauhinia* é caracterizado pelo acúmulo de flavonoides livres e glicosilados, sendo que para a *Bauhinia forficata* os principais compostos relatados compreendem glicosídeos canferólicos e quercetínicos isolados principalmente das folhas (Pizzolatti et al. 2003; Ferreres et al. 2012).

O flavonoide canferitrina foi encontrado em vários estudos e é considerado marcador químico para controle de qualidade em preparações com folhas de *B. forficata* (Pinheiro et al. 2006; Menezes et al. 2007; Engel et al. 2008; Ferreres et al. 2012).

A presença de óleos voláteis em folhas de várias espécies do gênero *Bauhinia* foi estudada por Duarte- Almeida (2004). Neste estudo foi evidenciado a presença de monoterpenos e sesquiterpenos na espécie *B. forficata*. Ainda neste estudo o autor sugere que a ocorrência de sesquiterpenos como constituintes predominantes é uma característica química do gênero *Bauhinia*.

Tabela 2: Constituintes fitoquímicos presentes na *B. Forficata* Link.

Autor e Ano	Parte da planta e método utilizado	Constituintes presentes
Miyake et al. (1986)	Folhas/qualitativo – rações colorimétricas e de precipitação	Alcaloides, flavonoides, óleo essencial, mucilagens e taninos.
Silva et al. (2000)	Folhas/Isolamento por cromatografia de coluna e identificação por espectroscopia	β -sitosterol e Kaempferitrina
Pizzolatti et al. (2003)	Folhas e Flores/Isolamento por Cromatografia de coluna e Hidrólise ácida e identificação por técnicas uni e bidimensionais de RMN de ^1H e de ^{13}C ;	Folhas: kanferol, 3,7-di-O-a-L-ramnopiranosilkanferol, 3,7-di-O-a-L-ramnopiranosilquercetina, 3-O-[b-D-glucopiranosil-(1 6)-a-L-ramnopiranosil]-7-O-a-L-ramnopiranosilkanferol e 3-O-[b-D-glucopiranosil-(1 6)-a-L-ramnopiranosil]-7-O-a-L-ramnopiranosilquercetina Flores: 7-O-a-L-rhamnopyranosylkaempferol.
Duarte-Almeida et al. (2004)	Folhas/ Extração de óleos voláteis por destilação a vapor e análise por CG/MS	Monoterpenos (α -Pineno, Sabineno, β -Pineno, β -Ocimeno); Sesquiterpenos (α -Copaeno, β -Elemeno, β -Cariofileno, γ -Elemeno, germacrenobicclico, α -humuleno e isômeros do copeno.

Faria et al. (2004)	Sementes/ Isolamento por extrações sucessivas para obtenção de lipídios e proteínas.	Fração lipídica: Ácido linoleico, Ácido palmítico, Ácido esteárico, Ácido oléico e Ácido gordo; Fração proteica: Globulinas; Glutelinas Básicas, Prolaminas, Glutelinas Ácidas e Albuminas.
Pinheiro et al. (2006)	Folhas/ Cromatografia Líquida	Kaempferitrina
Menezes et al. (2007)	Folhas/ HPLC e RMN	Quercetina-3,7-O-dirhamnosido e kaempferol-3,7-O-dirhamnosido
Engel et al. (2008)	Folhas/CCD e CLAE	Kaempferitrina
Andrade et al. (2011)	Folhas/ Isolamento e purificação a partir de precipitado acetônico, por cromatografia em sephadex G-25, canacistatina-sepharose, e em Con A-Sepharose.	Uma nova cisteína proteianase denominada Baupain.
Marques et al. (2012)	Folhas/ HPLC	Kaempferitrina
Ferreres et al. (2012)	Folhas/HPLC	Flavonóides: Quercetin-3-O-(2-rhamnosyl)rutinoside-7-O-rhamnoside; Kaempferol-3-O-(2-rhamnosyl)glucoside-7-O-rhamnoside; Kaempferol-3-O-(2-rhamnosyl)rutinoside-7-O-rhamnoside; Quercetin-3-O-rutinoside-7-O-rhamnoside; Kaempferol-3-(2/3/4-dirhamnosyl) glucoside; Kaempferol-3-O-(2-rhamnosyl) rutinoside; Kaempferol-3-O-rutinoside-7-O-rhamnoside; Quercetin-3,7-di-O-rhamnoside; Quercetin-3-O-rutinoside; Kaempferol-3-O-rutinoside; Kaempferol-3,7-di-O-rhamnoside; Kaempferol-3-O-rutinoside; Kaempferol-3-O-rhamnoside
Silva et al. (2012)	Sementes/ Fracionamento com sulfato de amônio; DEAE-Sepharose; Sepharose-4B e Superdex 75. Purificação através de HPLC.	Isolamento e purificação de uma nova lecitina denominada BFL

Legenda - CG/MS – Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massa; CCD – Cromatografia de Camada Delgada; CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; HPLC- Hight liquid chromatography; RMN- Ressonância Magnética Nuclear

Abordagem Etnofarmacológica

A etnofarmacologia é o ramo da etnobiologia/etnobotânica que trata das práticas médicas, especialmente remédios, usados em sistemas tradicionais da medicina. A definição mais aceita da etnofarmacologia é “a exploração científica multidisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem” (Elizabetsky 1999; Oliveira 2008). Este conhecimento direciona a comunidade científica a pesquisar os constituintes responsáveis pelas ações farmacológicas obtidas até então pela utilização empírica e tradicional das plantas medicinais. A partir de então são realizados os diversos estudos experimentais em diferentes modelos para o estabelecimento da comprovação científica que pode ser positiva ou não.

A *Bauhinia forficata* Link é amplamente utilizada pela população para as mais diversas finalidades terapêuticas, sendo consagrada pelo seu uso como hipoglicemiante. Os estudos etnofarmacológicos encontrados nesta pesquisa apontaram seu uso popular para outras finalidades

terapêuticas como redutor do colesterol e da pressão arterial, diurético e antimicrobiano (Di Stasi et al. 2002; Souza et al. 2004; Ferreira et al. 2009). Estes dados podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3: Estudos etnofarmacológicos envolvendo a *Bauhinia forficata* Link.

Autor e Ano	Parte utilizada / Finalidade Terapêutica
Di Stasi et al. (2002)	Folhas/Hipoglicemiante, Diurético, Pressão alta
Souza et al. (2004)	Folhas / Antimicrobiano
Ferreira et al.(2009)	Folhas/Hipoglicemiante, Colesterol alto, Pressão alta

Esta revisão sistemática mostrou que já existem evidências científicas experimentais que comprovaram a ação hipoglicemiante e antioxidante da *Bauhinia forficata* L., além de outras ações terapêuticas já mencionadas. A comprovação da ação antibacteriana, apesar de citada pela medicina popular, não foi comprovada por Souza et al. (2004) em seus estudos com o extrato metanólico das partes aéreas desta espécie vegetal, não promovendo inibição do crescimento de algumas espécies de fungos e bactérias. Assim, outros estudos devem ser realizados em outras condições para a pesquisa desta ação.

CONCLUSÃO

Através desta revisão sistemática foi evidenciado o grande potencial farmacológico da *Bauhinia forficata* Link, principalmente no que se refere a sua ação auxiliar no tratamento do diabetes, uma vez que muitos estudos mostraram resultados positivos para esta ação.

Evidências sobre sua ação antioxidante também foram encontradas, além de isolamento e elucidação de muitos compostos importantes para o desenvolvimento destas ações farmacológicas, sendo os glicosídeos canferólicos e quercetínicos os principais constituintes responsáveis por estas ações.

Como perspectivas para o uso da *B. forficata* Link, estes resultados apontam o promissor potencial para o desenvolvimento de formas farmacêuticas a partir desta espécie vegetal.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. S. et al. Biochemical characterization of a cysteine proteinase from *Bauhinia forficata* leaves and its kininogenase activity. **Process Biochemistry**. v. 46, n.2, p. 572-578. 2011.

BRASIL. Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Diário Oficial da União, nº 119, 23 de junho de 2006. p. 2. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Decreto_N_5813.pdf. Acesso em: 18 jul. 2012.

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 jul. 2012.

BRIGHENTE, I.M.C. et al. Activity and total phenolic content of some Brazilian species. **Pharmaceutical Biology**, v.45, n.2, p.156-161. 2007.

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

DAMASCENO, D. C. et al. Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. **Phytomedicine**. v. 11, n.2-3, p. 196-201. 2004.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2009/SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. 3.ed. São Paulo: Araújo Silva Farmacêutica, 2009.

DI STASI, L. C. et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**. v. 73, n.1, p. 69-91. 2002.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 32, n.8, p. 747-753. 2004.

ELISABETSKY. **Pesquisa em plantas medicinais. Ciências e Cultura** v. 39, p.607-702, 1999.

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.

FARIA, R. et al. Caracterização química parcial e bioquímica de sementes de *Bauhinia forficata* link. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. v.54, n.3, 2004.

FERREIRA, C. M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 126, n.1, p. 159-175. 2009.

FERRERES, F. et al. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. **Food Chemistry**. v. 134, n.2, p. 894-904. 2012.

KHALIL, N. M.; PEPATO, M. T.; BRUNETTI, I. L. Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. **Biological Research**. v. 41, n.2, p. 165-71. 2008.

LIM, H. et al. Inhibition of cell-cycle progression in HeLa cells by HY52, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor isolated from *Bauhinia forficata*. **Cancer Letters**. v. 233, n.1, p. 89-97. 2006.

LIMA, J.F. **Estabelecimento da cultura de células de *Bauhinia forficata* Link como fonte de metabólitos bioativos**. 2009. 74p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Produtos Naturais e Sintéticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

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.

MARQUES, G. S. *et al.* Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**. v. 35, p. 517-522. 2012.

MENEZES, F. D. 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. 8-13. 2007.

MOEIN, S.*et al.* Antioxidant properties and protective effect on cell cytotoxicity of *Salvia mirzayani*. **Pharmaceutical Biology**. v.45, n.2, p.458-463, 2007.

MORAES, E. A. D. *et al.* Avaliação do perfil glicêmico de portadores de Diabetes Mellitus tipo II em UBSs que utilizam infusão de folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Conscientiae saúde**. v. 9, n.4, p. 2010.

MÜLLER, J. C. **Toxicidade reprodutiva da *Morinda citrifolia* Linn**. 103f. Dissertação (Pós-Graduação em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2007.

MIYAKE, E. T.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Caracterização farmacognóstica da pata-de-vaca *Bauhinia forficata* Link. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 1, p. 58-68. 1986.

OLIVEIRA, C. Z. *et al.* Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 98, n.1-2, p. 213-6. 2005.

PEPATO, M. T. *et al.* Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 81, n.2, p. 191-7. 2002.

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

PINHEIRO, T. S. *et al.* Comparative assessment of kaempferitrin from medicinal extracts of *Bauhinia forficata* link. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 41, n.2, p. 431-6. 2006.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**. v. 26, p. 466-469. 2003.

SILVA, K. L. et al. Phytochemical and pharmacognosic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). **Z Naturforsch C**. v. 55, n.5-6, p. 478-80. 2000.

SILVA, E. M. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**. v. 101, n.3, p. 1012-1018. 2007.

SILVA, F. R. et al. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 83, n.1-2, p. 33-7. 2002.

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

SILVA, M. C. C. et al. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. **Process Biochemistry**. v. 47, n.7, p. 1049-1059. 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 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.

SOUZA, C. G. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 90, n.1, p. 135-143. 2004.

SOUZA, C. R. F. et al. Antioxidant activity and physical-chemical properties of spray and spouted bed dried extracts of *bauhinia forficata*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 45, n.2, p. 209-218. 2009.

SVETAZ, L. et al. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 127, n.1, p. 137-158. 2010.

VASCONCELOS, F. et al. Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous extract upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 95, n.2-3, p. 385-92. 2004.

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p. 308-313, 2008.

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, n.1, p. 131-7. 2008.

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

RESUMO

Nos últimos anos, o aumento do uso de fitoterápicos pela população exige o desenvolvimento de diversos estudos, 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 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, determinações de área superficial específica e tamanho de partícula a laser.

Palavras – chave: Controle de qualidade, Drogas vegetais, extratos secos, 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, 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 apontaram um movimento entre US\$ 350 a 550 milhões (Mioto, 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 (Toledo et al., 2003; Borella et al., 2010). Consequentemente, 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 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, 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.

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.

Zhu e colaboradores (2009) quantificaram flavonoides por meio de espectrofotometria UV/VIS com o sistema cromogênico de $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ em *Portulacaoleracea* L., uma tradicional planta medicinal da China. Por sua vez, Yue 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).

Carvalho e colaboradores (2008) desenvolveram um estudo espectrofotométrico na região do UV/VIS aliado a uma prospecção fitoquímica para diferentes estágios fenológicos da *Brassicasp.* 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 *Maytenussalicifolia*, 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 *Leiothrixflavescens* (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 *Angelicaegigantis* Radix, distinguindo-a da espécie chinesa (Woo et al., 2005). Além disso, as espécies chinesas e coreanas de *Astragalusmembranaceus* e *Ganodermalucidum* 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, (2000) e Wang et al., (2005) desenvolveram um método por espectroscopia por infravermelho próximo para quantificação de ácido glicirrízico em raízes secas de *Glycyrrhizauralensis*. 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 tratam das aplicações desta técnica, o número de estudos quantitativos ainda é limitado. Os trabalhos existentes 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).

A técnica foi utilizada com sucesso em análise dos frutos de *Luffaoperculata* (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 à base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae), as quais analisadas por CCD levaram à 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 (BRASIL, 2010).

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 (Chabariberiet 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 glicosídeos 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 (caféina, 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 brasiliensis* (Degani; Cass; Vieira, 1998; De Assis et al., 2009; Vieira et al., 2009; Bueno & Bastos, 2009; Maia; Torres; Pessoa, 2010).

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 esteroidais 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-excipientes 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 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 leite 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 compressora 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 de umidade pelo método gravimétrico, determinação de água pelo método azeotrópico e pelo método volumétrico (Karl Fisher), todos descritos na Farmacopeia Brasileira (2010) com exceção do último citado.

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), *Cynarascolum 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 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 leucoxylone* *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 terapeuticamente de modo seguro e eficaz.

REFERÊNCIAS

Aaltonen J, Gordon KC, Strachan CJ, Rades T. Perspectives in the use of spectroscopy to characterize pharmaceutical solids. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008; 34: 159-69.

Alves MSM, Mendes PC, Vieira JGP, Ozela EF, Barbosa WLR, Júnior JOCS. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010; 20(2): 215-21.

Ammon DG, Barton AFM, Clarke DA, Tjandra J. Rapid and Accurate Chemical Determination of the Water Content of Plants Containing Volatile Oils. *Analyst*. 1985; 110: 917-20.

Anselmo GCS, Mata MERMC, Rodrigues E. Comportamento higroscópico do extrato seco de urucum (*Bixa Orellana* L.). *Ciênc. Agrotec*. 2008; 32(6): 1888-92.

Araújo AAS, Mercuri LP, Seixas SRS, Storpirtis S, Matos JR. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2006; 42(2): 269-77.

Blanco M, Coello J, Iturriaga H, Maspoch S, De laPezuela C. Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. Critical review. *Analyst*. 1998; 123 (8): 135–50.

Borella JC, Ribeiro NS, Teixeira JCL, Carvalho DMA. 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*. 2010; 31(2): 193-7.

Borges DB, Farias MR, Simões CMO, Schenkel EP. 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*. 2005; 15(3): 229-36.

Brasil. Farmacopeia Brasileira. 5ª. Ed. Brasília: ANVISA; 2010. Parte 1. Pág 123-125 e 197-198.

Budal RM. *Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas*. [Dissertação] Florianópolis: Faculdade de química, UFSC; 2003.

Bueno PCP, Bastos JK. A validated capillary gas chromatography method for guaco (*Mikania glomerata* S.) quality control and rastreability: from plant biomass to phytomedicines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009; 19: 218-23.

Carvalho CA, Silva MB, Oliveira TG, Lima JM, Rosa MB. Estudo espectrométrico de diferentes estágios fenológicos da *Brassica oleracea var. capitata*. *Revista brasileira de farmacognosia*. 2008; 18(2): 249-57.

César IC, Braga FC, Soares CDV, Nunan EA, Barbosa TAF, Campos LMM. 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*. 2007; 17: 616-25.

Chabariberi RAO, Pozzi ACS, Zeraik ML, Yariwake JH. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008; 19: 860-4.

Chaves JS, Da Costa FB, Freitas LAPD. Development of enteric coated tablets from spray dried extract of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009; 45(3): 573-84.

Chen S, Peng HM, Webster RD. Infrared and UV-vis spectra of phenoxonium cations produced during the oxidation of phenols with structures similar to vitamin E. *Electrochimica Acta*. 2010; 55(28): 8863-9.

Chen XJ, Guo BL, Li SP, Zhang QW, Tu PF, Wang YT. Simultaneous determination of 15 flavonoids in Epimedium using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. 2007; 1163(1-2): 96-104.

Chen Y, Sørensen LK. Determination of marker constituents in radix Glycyrrhizae and radix Notoginseng by near infrared spectroscopy. *Fresenius' journal of analytical chemistry*. 2000; 367(5): 491-6.

Ciolo R. *Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC*. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blucher; 1998.

Corrêa PC, Júnior PCA, Stringheta PC. Estudo do fenômeno de adsorção de água e seleção de modelos matemáticos para representar a higroscopicidade do café solúvel. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 2000; 2(1): 19-25.

Cruz RJ, Borba ERC, Moreno AJD, Freire PTC. *Luffa operculata* (L.) cogn.: Influência de fatores ambientais. *Universidade Regional do Cariri-URCA caderno de cultura e ciência*. 2006; 1(1): 41-5.

Cunha-Filho MSS, Sá-Barreto LCL. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2007; 28(1): 1-9.

Da Costa RS, Ozela EF, Barbosa WLR, Pereira NL, Júnior JOCS. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (*spray-drying*) de *Cynarascolum* L. (Asteraceae). *Revista Brasileira Farmácia*. 2009; 90(3): 169-74.

Da Silva AS, Souza AG, Da Conceição MM, Alencar ALS, Prasad S, Cavalheiro JMO. Estudo termogravimétrico e calorimétrico da algaroba. *Química Nova*. 2001; 24(4): 460-4.

De Almeida AA. *Uso de métodos quimiométricos e otimização das condições experimentais para análise de chás comerciais de camelliasinensis* [Dissertação]: Londrina: Universidade Estadual de Londrina; 2006.

De Assis CM, Moreno PRH, Young MCM, Campos IPA, Suffredini IB. Morfoanatomia, Isolamento e avaliação da atividade biológica dos alcalóides majoritários de *Tabernaemontana angulata* Mart. ex Müll. Arg., Apocynaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009; 19(2b): 626-31.

De Simon BF, Estrella I, Herndndez T. Flavonoid separation by capillary electrophoresis. Effect of temperature and pH. *Chromatographia*. 1995; 41(7/8): 389-92.

De Souza TP, Martínez-Pacheco R, Gómez-Amoza JL, Petrovick PR. Eudragit E as Excipient for Production of Granules and Tablets From *Phyllanthus niruri* L Spray-Dried Extract. *AAPS PharmSciTech*. 2007; 8(2).

Dedavid BA, Gomes CI, Machado G. *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. 1ª ed. Porto Alegre: EDIPUCRS; 2007.

Degani ALG, Cass QB, Vieira PC. Cromatografia um breve ensaio. *Química Nova na Escola*. 1998;7: 21-5.

Deisingh AK. Pharmaceutical counterfeiting. *The Analyst*. 2005; 130(3): 271-9.

Dias MO, Hamerski L, Pinto AC. Separação semipreparativa de a e b-amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quim. Nova*. 2011; 34(4): 704-6.

Endale A, Gebre-Mariam T, Schmidt PC. Granulation by roller compaction and enteric coated tablet formulation of the extract of the seeds of *Glinuslotoides* loaded on Aeroperl 300 Pharma. *AAPS PharmSciTech*. 2008; 9(1): 31-8.

Fiuzza TS, Rezende MH, Sabóia-Morais SMT, Bara MTF, Tresvenzol LMF, De Paula JR. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L (Myrtaceae). *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2008; 5(2): 01 – 11.

Garcia-Amoedo LH, Almeida-Muradian LB. Comparação de metodologias para a determinação de umidade em geléia real. *Química Nova*. 2002; 25(4): 676-9.

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

Hoffmann-ribani R, Rodriguez-amaya DB. 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*. 2008; 31(6): 1378-84.

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

Joubert E, Manley M, Botha M. Evaluation of Spectrophotometric Methods for Screening of Green Rooibos (*Aspalathus linearis*) and Green Honeybush (*Cyclopiagenistoides*) Extracts for High Levels of Bio-active Compounds. *Phytochemical Analyses*. 2008; 19(2): 169–78.

Klein T, Longhini R, Bruschi ML, Mello JCP. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl*. 2009; 30(3): 241-8.

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

Linden R, Sartori S, Kellermann E, Souto AA. Identificação de substâncias em análise toxicológica sistemática utilizando um sistema informatizado para cálculo de parâmetros cromatográficos e busca em bases de dados. *Química Nova*. 2007; 30(2): 468-75.

Lopes GC, Sanches ACC, De Toledo CEM, Isler AC, De Mello JCP. Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009; 45(1): 135-43.

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*. 2009; 7: 1-8.

Maia AIV, Torres MCM, Pessoa ODL. Óleos essenciais das folhas de *Vernoniaremotiflora* E *Vernonia brasiliana*: Composição química e atividade biológica. *Química Nova*. 2010; 33(3): 584-6.

Maluf DF, Pontarolo R, Cordeiro GA, 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*. 2010; 33(3): 649-52.

Mendez ASL, Simionato NO, Valduga AT, Reginatto FH. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2011; 32(1): 105-11.

Migliato KF, Moreira RRD, Mello JCP, Sacramento LVS, Corrêa MA, Salgado HRN. Controle da qualidade do fruto de *Syzygiumcumini* (L.) Skeels. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007; 17(1): 94-101.

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: 15 de Agosto de 2011.

Müller SD, Vasconcelos SB, Coelho M, Biavatti MW. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005; 37(2): 399-403.

Nery CGC, Pires MAS, Pianetti GA, Vianna-Soares CD. Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2008; 44(1): 61-73.

Nunes KM, Barbosa WLR, Ozela EF, Júnior JOCS. Padronização da Tintura de *Calendula officinalis* L. para seu Emprego em Formulações Semi-sólidas Fitoterápicas. *Latin American Journal of Pharmaceutics*. 2009; 28(3): 344-50.

Oliveira OW. *Parâmetros de produção e caracterização de produto seco de Maytenus ilicifolia Martius ex Reissek – celastraceae – em torre de secagem por aspersão* [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS; 2009.

Oliveira OW, Petrovick PR. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010; 20(4): 641-50.

Öztürk M, Duru ME, Ince B, Harmandar M, Topçu G. A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. *Food Chemistry*. 2010; 123(4): 1352-6.

Pena EQ, Vieira CB, Da Silva CA, Seshadri V, Araújo FGS. Caracterização dos parâmetros de porosidade de concentrados de minérios de ferro pelo método de adsorção de nitrogênio. *Tecnologia em Metalurgia e Materiais*. 2008; 4(4): 53-7.

Petrovick GF, Petrovick PR, Bassani VL. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae: development of granules from spray dried powder. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010; 20(5): 796-803.

Quintão NLM, Meyre-Silva C, Silva GF, Antonialli CS, Rocha LW, Lucinda-Silva RM, Malheiros A, Souza MM, Filho VC, Bresolin TMB. *Aleurites moluccana* (L.) Willd. Leaves: Mechanical Antinociceptive Properties of a Standardized Dried Extract and Its Chemical Markers. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2011; 2011: 179890.

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

Rocha FRP, Teixeira LSG. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Química Nova*. 2004; 27(5): 807-12.

Silva MA, Sumitami JSA, Vilegas W, Santos LC. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2007; 28(3): 319-24.

Sousa SA, Alves SF, Paula JAM, Fiuza TS, Paula JR, Bara MTF. Determinação de taninos e metilxantinas no guaraná em pó (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010; 20(6): 866-70.

Silva RMF. *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.): Obtenção Tecnológica de Formas Farmacêuticas. [Tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, UFPE; 2010.

Souza-Moreira TM, Salgado HRN, Pietro RCLR. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010; 20(3): 435-40.

Spaniol B, Bica VC, Ruppenthal LR, Volpato MR, Petrovick PR. 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*. 2009; 10(3): 1013-23.

Toledo ACO, Hirata LL, Buffon MCM, Miguel MD, Miguel OG. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta*. 2003; 21(1/2): 7-13.

Valladão FN, Miranda RSM, Vale FH, Valladão SA, Silva GDF, Duarte LP, Carvalho-okano RM, Messias MCTB, Viera filho SA. Four Brazilian *Maytenus salicifolia* Reissek (Celastraceae) groups studied by TLC and UV/Vis spectrophotometry. *Rev. bras. farmacogn.* 2009; 19(3): 733-9.

Vieira MGS, De Freitas JVB, Neto MNL, Gramosa NV. Constituintes químicos voláteis das folhas e galhos de *Zanthoxylum syncarpum* Tull. *Química Nova*. 2009; 32(2): 391-3.

Volpato AMM. *Avaliação do potencial antibacteriano de Calendula officinalis (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico* [Tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, UFPR; 2005.

Wang L, He Y, Qiu ZC, Wang XR, Lee FSC. Determination of glycyrrhizic acid in *Glycyrrhiza uralensis* fish by fiber optic near infrared spectroscopy. *Spectrosc. Spectral Anal.* 2005; 25(9): 1397-9.

Wang L, Lee FSC, Wang X. Near-infrared spectroscopy for classification of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) and prediction of the glycyrrhizic acid (GA) content. *LWT - Food Science and Technology*. 2007; 40(1): 83-8.

Woo Y, Kim H, Cho J. Identification of Herbal Medicines Using Pattern Recognition Techniques with Near-Infrared Reflectance Spectra. *Microchemical Journal*. 1999; 63(1): 61-70.

Woo Y, Kim H, Ze K, 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*. 2005; 36(5): 955-9.

Yan M, Liu W, Fu Y, Zu Y, Chen C, Luo M. Optimisation of the microwave-assisted extraction process for four main astragalosides in Radix Astragali. *Food Chemistry*. 2010; 119(4): 1663-70.

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*. 2009; 3(2): 90-7.

4. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E FÍSICO-QUÍMICA

Artigo III– Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras

Artigo publicado na Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.33, p.57-62, 2012.

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E FÍSICO-QUÍMICA DAS FOLHAS DE *BAUHINIA FORFICATA* LINK COLETADA EM DUAS REGIÕES BRASILEIRAS

RESUMO

Folhas da espécie vegetal *Bauhinia forficata* Link, popularmente conhecida como pata de vaca, apresentam amplo potencial terapêutico no tratamento do diabetes mellitus. Amostras desta espécie vegetal, obtidas em duas regiões do Brasil (Minas Gerais e Paraná), foram submetidas à caracterização fitoquímica e físico-química (granulometria, perda por dessecação, teor de cinzas e teor de extrativos) para realização de um estudo comparativo entre plantas cultivadas em regiões distintas. Para a caracterização fitoquímica, extratos metanólicos das amostras foram avaliados através de cromatografia de camada delgada para pesquisa das principais classes de metabolitos secundários. Enquanto que, para as análises físico-químicas foram adotadas metodologias farmacopéicas. A análise estatística dos dados foi realizada através dos testes F de *Fischer* e t de *Student*. De acordo com a avaliação fitoquímica foi possível observar um perfil similar para ambas as amostras com a presença dos seguintes grupos: flavonóides, proantocianidinas, leucoantocianidinas, triterpenos, esteróides, açúcares redutores, além de substâncias antioxidantes com bandas coincidentes às dos compostos flavonoídicos. Por outro lado, as amostras apresentaram algumas propriedades físico-químicas diferentes tais como granulometria e umidade residual em virtude da origem e do processamento adotados pelos fornecedores. Já os valores do teor de cinzas mostraram-se dentro das especificações e não foi observada diferença significativa para o teor de extrativos. Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram no processo de identificação e padronização de parâmetros de qualidade para as folhas de *B. forficata*.

Palavras-chave: *Bauhinia forficata* Link, prospecção fitoquímica, caracterização físico-química.

ABSTRACT

Leaves of the plant species *Bauhinia forficata* Link, popularly known as pata de vaca, have broad therapeutic potential in treating diabetes mellitus. Samples of plant material obtained from two regions of Brazil (Minas Gerais and Paraná), were subjected to phytochemical and physicochemical characterization (grain size, loss on drying, ash content and extractives). For phytochemical characterization, methanolic extracts of samples were evaluated by thin layer chromatography to search the main classes of secondary metabolites. While for the physicochemical analyses were followed Pharmacopoeic procedures. The statistical analysis was performed using the Fisher F test and *Student* t test. According to phytochemical evaluation was observed one similar profile for both samples with the presence of following groups: flavonoids, proanthocyanidins, leucoanthocyanidins, triterpenes, steroids, sugars, and antioxidants with similar bands of flavonoid compounds. On the other hand, the samples showed some different physicochemical properties such as particle size and content residual moisture because of the origin and processing adopted by suppliers. In turn the values of ash showed to be within specifications and there was no significant difference in the extractive

content. The results of this work contributed to the process of identification and standardization of quality parameters for the leaves of *B. forficata*.

Keywords: *Bauhinia forficata* Link, phytochemical prospecting, physicochemical characterization.

INTRODUÇÃO

O emprego terapêutico de plantas medicinais e produtos fitoterápicos no Brasil vem se consolidando nos últimos tempos, representando, assim, um nicho bastante promissor para o mercado farmacêutico (Araújo et al., 2006; Couto et al., 2009). Em decorrência do interesse popular e institucional pelo segmento, o Ministério da Saúde do Brasil instituiu em 2008 o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos dentro do Sistema Único de Saúde (SUS) (Nunes et al., 2009), e mais recentemente divulgou uma Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), contendo 71 espécies vegetais com potencial farmacológico. O objetivo consiste em direcionar as pesquisas científicas e ampliar o rol de fitoterápicos que hoje são financiados pelo Governo Federal (Ministério da Saúde, 2009). Dentre as espécies divulgadas na RENISUS, figuram alguns representantes do gênero *Bauhinia*, sendo a *Bauhinia forficata* Link, umas das espécies mais estudadas no Brasil e que apresenta maior número de pesquisas quanto à atividade hipoglicemiante (Silva & Cechinel Filho, 2002).

B. forficata L. é considerada uma espécie nativa da América do Sul, distribuindo-se pela Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Brasil; sendo que no Brasil, encontra-se principalmente nas regiões do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (Pizzolatti et al., 2003; Lusa & Bona, 2009). Na medicina popular a infusão das folhas desta espécie é utilizada predominantemente para tratamento do diabetes mellitus, sendo ainda empregada como agente diurético, tônico, depurativo (Pizzolatti et al., 2003).

Diversos estudos pré-clínicos evidenciam a atividade antidiabética das folhas de *B. forficata* L., atribuindo-a aos glicosídeos flavonoídicos canferólicos e quercetínicos, e, em particular, ao 3,7-di-O- α -L-rhamnopiranosilcanferol (canferitrina), marcador químico, presente somente nas folhas (Pepato et al., 2002; Jorge et al., 2004; Souza et al., 2004; Vasconcelos et al., 2004; Cazarolli et al., 2006; Menezes et al., 2007; Engel et al., 2008; Da Cunha et al., 2010).

A definição de critérios de qualidade para as folhas de *B. forficata* L. é de suma importância para garantir sua eficácia terapêutica e segurança como matéria prima farmacêutica, em virtude da complexidade de composição dos insumos vegetais e das variações ligadas às suas condições de cultivo e coleta, bem como, dos tratamentos empregados para promover sua estabilidade (Barni et al., 2009).

Os parâmetros de qualidade para fins farmacêuticos são, a priori, estabelecidos nas Farmacopeias e Códigos Oficiais. No entanto, ainda há uma escassez de monografias para matérias primas de diversas espécies vegetais nativas, como é o caso da *B. forficata* L. (Michelin et al., 2010).

Dessa forma, o propósito deste trabalho foi realizar um estudo comparativo das características fitoquímica e físico-químicas (granulometria, perda por dessecação, teor de cinzas e teor de extrativos) de amostras de *B. forficata* L. cultivadas em regiões distintas do Brasil (Minas Gerais e Paraná), bem como estabelecer especificações iniciais de qualidade que sirvam de parâmetro para seu controle de qualidade e que sejam empregados como referência para assegurar a reprodutibilidade de estudos posteriores com esta droga vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e preparação do material vegetal

As folhas de *B. forficata* L. foram obtidas em duas regiões do Brasil: Viçosa – MG e Telêmaco Borba – PR. O material vegetal de Viçosa foi coletado em dezembro/2009 na Vila Gianetti, cuja identificação foi realizada pelo professor José Martins Fernandes e a exsicata depositada no Herbário VIC, do Departamento de Biologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa, sob o nº 32513. Já o material vegetal oriundo de Telêmaco Borba, foi coletado em abril/2010 na Fazenda Monte Alegre e gentilmente cedido pelo fornecedor Klabin do Paraná Produtos Florestais Ltda, cuja identificação e depósito de exsicata foram realizados no Herbário da Universidade Estadual do Maringá, sob registro nº 150. A identidade de ambas as amostras foram confirmadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro – RJ, Brasil, pela especialista em identificação de espécies do gênero *Bauhinia*, Ângela Vaz.

Na preparação da matéria prima vegetal, as folhas da região de Viçosa foram submetidas à secagem em estufa, a uma temperatura de 45 °C, durante 72 h, e em seguida, pulverizadas em moinho de facas (Bermar® BM30). Por sua vez, as folhas da região de

Telêmaco Borba foram submetidas à secagem em estufa, a uma temperatura de 40 °C, durante 52 h, e posteriormente, pulverizadas em moinho industrial.

Prospecção fitoquímica

Cerca de 5 g das folhas pulverizadas de *B. forficata* L. foram submetidas à infusão metanólica à 10% (v/v), sob agitação durante 30 min, para prospecção fitoquímica por cromatografia de camada delgada (CCD). Aplicaram-se alíquotas (10 µL) dos extratos metanólicos em placas cromatográficas de gel de sílica (Macherey-Nagel®, Ref. 818 133), empregando-se diversos sistemas eluentes e reveladores adequados, sumarizados na Tabela 1. Para pesquisa de saponinas, realizou-se um teste de afrogenicidade, com forte agitação das soluções, por cerca de 30 s, seguida de repouso. Espuma abundante e persistente por mais de 15 min foi o critério usado para avaliar a presença de saponósidos (Costa, 2001).

Tabela 1 - Sistemas cromatográficos empregados na prospecção fitoquímica de *B. forficata* L.

Classe de metabólito	Sistema de eluição	Revelador	Referência
Alcalóides	AcOEt - HCOOH - AcOH - H ₂ O ¹	Dragendorff	Wagner & Bladt (1996)
Cumarinas	Éter - Tolueno - AcOH 10% ²	UV (365 nm)	Wagner & Bladt (1996)
Derivados Cinâmicos	AcOEt - HCOOH - AcOH - H ₂ O ¹	NEU	Wagner & Bladt (1996) Neu (1956)
Flavonóides	AcOEt - HCOOH - AcOH - H ₂ O ¹	NEU	Wagner & Bladt (1996) Neu, (1956)
Taninos hidrolisáveis	n-BuOH - H ₂ O - AcOH ³	NEU	Xavier (1988)
Triterpenos / esteróides	Tolueno - AcOEt ⁴	LB	Harborne (1998)
Açúcares redutores	n-BuOH - Me ₂ CO - TF (pH = 5,0) ³	Trifeniltetrazólio	Metz (1961)
Proantocianidinas e Leucoantocianidinas	AcOEt - HCOOH - AcOH - H ₂ O ¹	VC	Roberts <i>et al.</i> (1957)

¹100: 11: 11: 27 v/v; ²50: 50: 50 v/v; ³ 40: 50: 10 v/v; ⁴90: 10 v/v; AcOEt = Acetato de etila; HCOOH = Ácido fórmico; AcOH = ácido acético; H₂O = água; UV = ultravioleta; NEU = ácido etilborilaminoéster a

1% em etanol; n-BuOH = n-butanol; LB = Lieberman e Burchard; Me₂CO = acetona; TP = tampão fosfato; VC = Vanilina Clorídrica.

Demais disto, avaliou-se a capacidade antioxidante dos extratos de *B. forficata* L. através de CCD, utilizando como sistema eluente: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100: 11: 11: 27 v/v), e como revelador, uma solução de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) a 0,2% em metanol. As placas foram observadas até o aparecimento de manchas amarelas ao fundo de coloração púrpura, critério indicativo da propriedade. Isto porque, na presença de substâncias antioxidantes, o radical DPPH é reduzido a 2,2-difenil-picril-hidrazina, perdendo sua coloração púrpura (Souza et al., 2007).

Caracterização físico-química

O material vegetal foi submetido aos ensaios de determinação da granulometria dos pós, determinação da perda por dessecação (método gravimétrico) e determinação de cinzas totais, de acordo com procedimentos descritos na Farmacopeia Brasileira (2010), além da determinação do teor de extrativos segundo metodologia do Deutscher Arzneimittel Codex (1986).

Para determinação da granulometria, amostras contendo 100 g do material vegetal pulverizado foram submetidas à passagem através de tamises, previamente tarados, com abertura de malha de 850, 600, 425, 250, 150 e 90 µm em tamisador Bertel®. Os dados foram analisados por método gráfico, construindo-se histograma de distribuição e curvas de retenção e passagem para determinação do diâmetro médio das partículas. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

Análise Estatística

Análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa computacional Excel (Microsoft Office 2007), através dos testes F de *Fischer* e t de *Student* em nível de 95% de confiança.

RESULTADOS

A prospecção fitoquímica, através de CCD e teste de afrogenicidade, demonstrou a presença das mesmas classes metabólicas, quais sejam: proantocianidinas, leucoantocianidinas, triterpenos, esteróides, flavonoides, além de açúcares redutores, nas folhas de *B. forficata* L. coletadas em Viçosa e Telêmaco Borba.

Da mesma forma, também se evidenciou a existência de substâncias antioxidantes, através de análise qualitativa, em virtude da presença de manchas amarelas sobre o fundo púrpuro nas placas cromatográficas, resultantes da redução do radical DPPH.

Os resultados obtidos pelo histograma de distribuição granulométrica das folhas de *B. forficata* L. (Figura 1) demonstram que as partículas do material vegetal de Viçosa e Telêmaco Borba encontraram-se predominantemente distribuídas entre os tamises 250 e 450 μm , representando respectivamente 26,20 % e 25,19 % de todo o material. O tamanho das partículas determinado pelo ponto interseção das curvas de retenção e passagem está representado nas Figuras 2 (amostra de Viçosa), e 3 (amostra de Telêmaco Borba). Enquanto, o tamanho médio das partículas e resultados do teste F, em nível de 95% de confiança, para avaliação da variância granulométrica das amostras estão sumarizados na Tabela 2.

Figura 1 - Histograma de distribuição granulométrica das folhas de *B. forficata* L. de Viçosa e Telêmaco Borba.

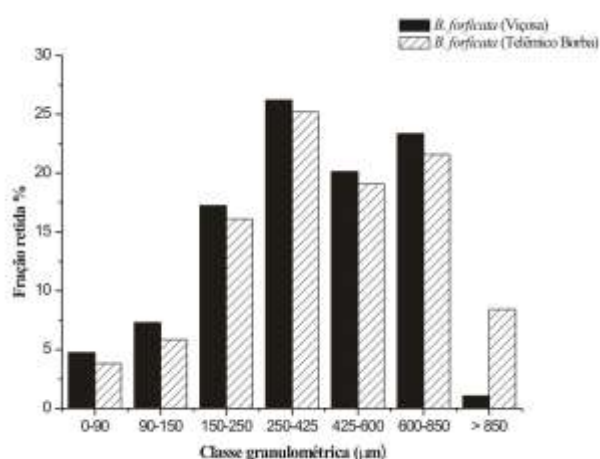
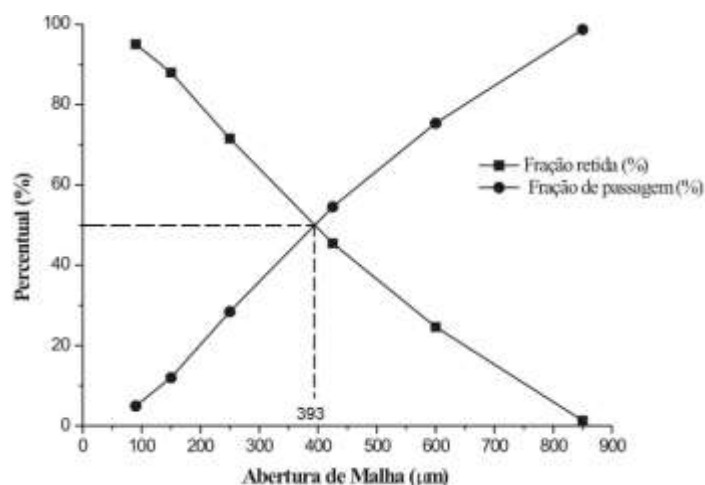
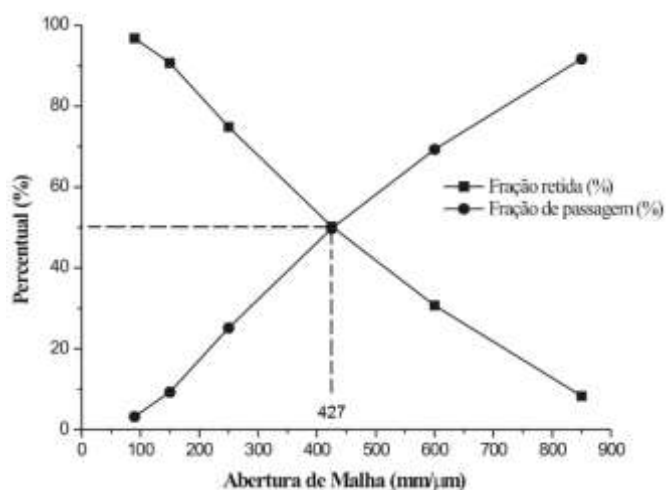


Figura 2 - Curvas de retenção e passagem das folhas de *B. forficata* L. de Viçosa.**Figura 3** - Curvas de retenção e passagem das folhas de *B. forficata* L. de Telêmaco Borba.**Tabela 2** - Resultados da análise granulométrica e teste F das amostras *B. forficata* L..

Amostra	Tamanho médio $\pm$ dp	F _{calculado}	F _{tabelado}
Viçosa	320 μ m $\pm$ 13	0,25	0,006194
Telêmaco Borba	420 μ m $\pm$ 10	-	-

dp = desvio padrão.

Os resultados obtidos para os ensaios de perda por dessecação, teor de extrativos e teor de cinzas totais estão apresentados na Tabela 3, enquanto as análises pelos teste F e t, em nível de 95% de confiança, para avaliação da variância desses parâmetros entre as amostras de Viçosa e Telêmaco Borba estão sumarizadas na Tabela 4.

Tabela 3 - Resultados dos ensaios de PD, TE e CT das amostras de *B. forficata* L.

Amostra	PD $\pm$ dp	TE $\pm$ dp	CT $\pm$ dp
Viçosa	6,53 % $\pm$ 0,04	31,13 % $\pm$ 0,33	8,43 % $\pm$ 0,09
Telêmaco Borba	7,94 % $\pm$ 0,10	29,71 % $\pm$ 1,30	8,61 % $\pm$ 0,10

PD – Perda por dessecação; TE – Teor de extrativos; CT – Cinzas totais; dp – desvio padrão.

Tabela 4 - Resultados do teste F e t dos ensaios de PD, TE e CT das amostras de *B. forficata* L.

	Perda por dessecação		Teor de extrativos		Cinzas totais	
	Viçosa	Telêmaco	Viçosa	Telêmaco	Viçosa	Telêmaco
		Borba		Borba		Borba
Média	6, 56	7, 99	31, 29	29, 09	8, 40	8, 60
F _{calculado}	0, 21	-	11, 83	-	1, 71	-
F _{tabelado}	161, 45	-	161, 45	-	161, 45	-
t _{calculado}	91,08	-	2,99	-	1,68	-
t _{tabelado}	4,30	-	4,30	-	4,30	-

DISCUSSÃO

Os perfis fitoquímicos das amostras de Viçosa e Telêmaco Borba apresentaram-se análogos, como também revelaram a marcante presença de flavonoides, constituintes característicos do gênero *Bauhinia*, e em particular da espécie *B. forficata* L. (Silva & Cechinel Filho, 2002). A presença desses metabólitos e ausência de saponinas também estão em sintonia com dados da literatura científica (Miyake et al., 1986; Silva et al., 2000; Paula et al., 2002; Pizzolatti et al., 2003). No entanto, observou-se divergência em relação à presença de alcalóides e taninos demonstrada na caracterização farmacognóstica realizada por Miyake et al. (1986). Em outros estudos, demonstrou a similaridade dos resultados encontrados neste

trabalho, evidenciando também ausência de taninos na espécie em questão (PAULA et al., 2002).

As divergências em análises fitoquímicas podem ser atribuídas a fatores como método de extração, período de coleta e equívocos em relação à autenticidade do material vegetal, sendo este último de extrema importância para análises com *B. forficata* L., em virtude da semelhança entre as folhas das diferentes espécies do gênero *Bauhinia*. (Miyake et al., 1986; Lusa & Bona, 2009).

Demais disso, verificaram-se substâncias com capacidade antioxidante com bandas coincidentes as dos compostos flavonoídicos, corroborando então com diversos estudos que evidenciam essa propriedade para o grupo (Pietta, 2000).

A distribuição granulométrica das partículas de matérias primas vegetais pulverizadas constitui um fator determinante na homogeneidade e reprodutibilidade dos processos extrativos (Voigt & Bornschein, 1982). Na análise de variância granulométrica das amostras de Viçosa e Telêmaco Borba constatou-se que o valor de F calculado foi maior que o F tabelado (Tabela 2), rejeitando-se então a hipótese de homogeneidade das variâncias. Este resultado é decorrente dos diferentes processos de pulverização (liquidificador industrial e moinho industrial) aplicados aos materiais vegetais. No entanto, ambas as amostras apresentaram um perfil semelhante de distribuição granulométrica e foram classificadas como pós moderadamente grossos de acordo com as especificações da Farmacopeia Brasileira V (2010). Pós de tamanho maior, como os desta classificação, favorecem as extrações, pois partículas muito finas podem aderir às partículas maiores, aumentando a viscosidade do meio e criando uma barreira que impeça a penetração de solventes (Voigt & Bornschein, 1982).

A perda por dessecação expressa o percentual de umidade residual da droga vegetal. Os valores obtidos na análise das folhas secas de *B. forficata* L. coletadas em Viçosa e Telêmaco Borba se encontram abaixo dos limites estabelecidos (8-14%) pela Farmacopeia Brasileira V (2010) (Tabela 3). Entretanto, como não ultrapassaram o valor máximo de 14%, é possível inferir sua estabilidade microbiológica e química, uma vez que, teores de umidade acima do especificado possibilitam o desenvolvimento de fungos e bactérias, hidrólise e atividade enzimática com conseqüente deterioração de constituintes químicos (Couto et al., 2009). Ademais, as amostras de Telêmaco Borba apresentaram um teor de umidade residual bastante próximo a 8%.

O teor de cinzas totais estabelece a quantidade de substâncias residuais não voláteis obtidas por incineração representando a soma de material inorgânico integrante da espécie (cinzas intrínsecas) com as substâncias aderentes de origem terrosa (cinzas extrínsecas)

(Braga et al., 2007; Simões et al., 2007). Os resultados da determinação de cinzas totais nas amostras das duas regiões apresentaram-se abaixo de 14%, conforme os limites estabelecidos nas monografias de diversas drogas vegetais descritas na Farmacopeia Brasileira (Tabela 3), indicando que as mesmas não possuem excesso de terra e/ou areia.

O teor de extrativos indica a presença de compostos hidrossolúveis presentes no material vegetal, como aminoácidos, açúcares, heterosídeos flavonoídicos e mucilagens (Barni et al., 2009). Embora não existam especificações oficiais desse parâmetro, os teores apresentados pelo material de Viçosa e Telêmaco Borba (Tabela 3) foram comparados estatisticamente entre si (Tabela 4).

Na tabela 4 observam-se os resultados da análise de variância, pelo teste F, da perda por dessecação, cinzas totais e teor de extrativos das amostras (Tabela 4). Como o valor de F calculado foi menor que o F tabelado, não se rejeitou a hipótese de homogeneidade das variâncias. Logo, presumindo variâncias equivalentes, fez-se o Teste t de *Student*, em nível de confiança de 95 %, para comparação estatística entre os resultados (Tabela 4). Como o valor de t calculado foi menor que o t tabelado para as análises do teor de extrativos e cinzas totais, não se rejeitou a hipótese de igualdade entre as médias, não havendo, portanto, diferença estatisticamente significativa. Os valores discrepantes da perda por dessecação são, possivelmente, provenientes dos diferentes processos de secagem das amostras.

Os resultados obtidos neste trabalho tornaram-se importantes no processo de identificação e padronização de parâmetros de qualidade para as folhas de *B. forficata* L., sobretudo pela ausência de limites estabelecidos para os ensaios de perda por dessecação, teor de extrativos e teor de cinzas totais na literatura para esta droga vegetal.

REFERÊNCIAS

Araújo AAS, Mercuri ALP, Seixas SRS, Storpirtis S, Matos JR. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2006; 42(2): 269-277.

Barni ST, Cechinel Filho V, Couto AG. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria prima farmacêutica. *Rev Bras Farmacogn.* 2009; 19(4): 865-870.

Braga TV, Oliveira TT, Pinto JT, Dorés RGR, Nagem TJ. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson &

C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2007; 28(3): 287-290.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.960, de 09 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, nº 240, 10 de dezembro de 2008. p. 56.

Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände (Hrsg.) Deutscher Arzneimittel - Codex. Govi, Frankfurt, Deutscher Apotheker, Stuttgart, Bd. 2: 4-5, 88, 1986.

Cazarolli LH, Zanatta L, Jorge AP, Souza E, Horst H, Woehl VM, Pizzolatti MG, Szpoganicz B, Silva FRMB. Follow-up studies on glycosylated flavonoids and their complexes with vanadium: Their anti-hyperglycemic potential role in diabetes. *Chem. Biol. Interact.* 2006; 163: 177-191.

Couto RO, Valgas AB, Bara MTF, Paula JR. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* dc. (Myrtaceae). *Rev. Eletr. Farm.* 2009; 6(3): 59-69.

Da Cunha AM, Menon S, Menon R, Couto AG, Bürger C, Biavatti MW. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. *Phytomedicine*. 2010; 17(1): 37-41. DOI: 10.1016/j.phymed.2009.06.007.

Engel IC, Ferreira RA, Cechinel-Filho V, Meyre-Silva C. Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). *Rev Bras Farmacogn.* 2008; 18(2): 258-264.

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

Harborne J B. *Phytochemical Methods*. 3rd. ed. London: Chapman & Hall, 1998.

Jorge AP, Horst H, Sousa E, Pizzolatti MG, Silva FRMB. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. *Chem. Biol. Interact.* 2004; 149: 89-96.

Lusa MG, Bona C. Análise morfoanatômica comparativa da folha de *Bauhinia forficata* Link e *B. variegata* Linn. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Acta Bot Bras.* 2009; 23(1): 196-211.

Menezes FS, Minto ABM, Ruela HS, Kuste RRM, Sheridan H, Frankish N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. *Rev Bras Farmacogn.* 2007; 17(1): 08-13.

Metz H. Thin-layer chromatography for rapid assays of enzymic steroid transformations. *Naturwissenschaften*. 1961; 48: 569-570.

Michelin DC, Finati SCG, Sacramento LVS, Vilegas W, Salgado HRN. Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., Convolvulaceae. *Rev Bras Farmacogn.* 2010; 20(1): 18-22.

Miyake ET, Akisue G, Akisue M K. Caracterização Farmacognóstica da Pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link). *Rev Bras Farmacogn.* 1986; 1(1): 58-68.

Ministério do Brasil. Plantas de Interesse ao SUS, 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1>.

Neu R. A New reagent for differentiating and determining flavones of paper chromatograms. *Naturwissenschaften*. 1956; 43: 82.

Nunes KM, Barbosa WLR, OZELA EF, SILVA JÚNIOR JOC. Padronização da Tintura de *Calendula officinalis* L. para seu Emprego em Formulações Semi-sólidas Fitoterápicas. *Lat Am J Pharm*. 2009; 28(3): 344-50.

Paula ACCFF, Alvarenga AA, Blatt CTT, Young MCM, Ladeira AM. Phenolics constituents of young plants of *Bauhinia forficata* Link. *Rev Bras Plant Med*. 2002; 5(1): 11-13.

Pepato MT, Baviera AM, Vendramini RC, Brunetti IL. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2002; 81: 191-197.

Pietta PG. Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod*. 2000; 63(7) : 1035-1042.

Pizzolatti MG, Cunha-Junior A, Szpoganicz B, Sousa E, Braz-Filho R, Schripsema J. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). *Quim nova*. 2003; 26(4): 466-469.

Roberts EAH, Cartwright RA, Oldschool M. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. *J Sci Food Agr*. 1957; 8: 72-80

Silva KL, Cechinel Filho V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Quim nova*. 2002; 25(3): 449-454.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Palazzo de Mello JC, Mentz LA, Ros Petrovick P. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6ª. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2007.

Souza E, Zanatta I, Seifriz I, Creczynski-Pasa TB, Pizzolatti MG, Szpoganicz B. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. *J Nat Prod*. 2004; 67(5): 829-832.

Sousa CMM, Rocha e Silva H, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim nova*. 2007; 30(2): 351-355.

Vasconcelos F, Sampaio SV, Garófalo MAR, Guimarães LFL, Giglio JR, Arantes EC. Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous extract upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. *J Ethnopharmacol*. 2004; 95: 385–392.

Voigt R, Bornschein M. *Tratado de tecnologia farmacêutica*. 3º. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1982.

Wagner H, Bladt S. *Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas*. 2^a. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1996.

Xavier HS. *Lavandula stoechas* L. (Lamiaceae): Etude Botanique, Chimique et Pharmacodynamique. [Tese]. Montpellier : Université de Montpellier - I; 1988.

5. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS POR ESPECTROFOTOMETRIA

Artigo IV – Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link

Artigo publicado na Revista Química Nova, v. 35, n.3, 517-522, 2012.

AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS PARA QUANTIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FLAVONÓIDES TOTAIS EM FOLHAS DE *BAUHINIA FORFICATA* LINK

RESUMO

O interesse por métodos analíticos para controle de qualidade de fitoterápicos tem crescido acentuadamente, devido à escassez de monografias nos manuais oficiais. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar procedimentos analíticos para a determinação quantitativa de flavonoides das folhas de *Bauhinia forficata* Link (pata-de-vaca). Dois procedimentos para a quantificação de flavonóides totais (com e sem hidrólise ácida) por espectrofotometria foram testados. Os métodos propostos provou ser mais específico, sensível, preciso, exato e robusto, sendo adequado para laboratoriais de rotina.

Palavras-chave: *Bauhinia forficata* Link, flavonoides, UV-Vis espectrofotometria.

ABSTRACT

Interest in analytical methods for quality control of herbal drugs has grown sharply due to the scarcity of monographs in official manuals. Thus, the present study aimed to evaluate analytical procedures for quantitative determination of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata* Link (pata-de-vaca). Two procedures for quantification of total flavonoids (with and without acid hydrolysis) by spectrophotometry were tested. The proposed methods proved to be specific, sensitive, precise, accurate and robust, being suitable for routine laboratory.

Keywords: *Bauhinia forficata* Link, flavonoids, UV-Vis spectrophotometric.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos para a recuperação e manutenção da saúde, representa um mercado farmacêutico bastante promissor. Em 2010 o mercado mundial

de fitoterápicos movimentou cerca de US\$ 44 bilhões, e apesar de não existir dados oficiais sobre o tamanho desse mercado no Brasil, as estimativas variam entre US\$ 350 milhões e US\$ 550 milhões, segundo a Associação Brasileira de Empresas do Setor Fitoterápico (ABIFISA).^{1,2}

A produção de fitoterápicos envolve um processo interdisciplinar, multidisciplinar e interinstitucional e abrange diversas etapas. Uma destas consiste no emprego de métodos analíticos para quantificação e controle dos marcadores químicos ou farmacológicos presentes tanto na matéria prima vegetal quanto no produto intermediário e final. Esses métodos compreendem requisitos indispensáveis ao registro desses produtos no Brasil, tendo em vista que permitem a avaliação de sua qualidade, eficácia terapêutica e segurança.^{3,4}

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal e que despertam o interesse para produção de fitoterápicos, encontra-se a *Bauhinia forficata* Link (pata-de-vaca), que se destaca pela sua relevância terapêutica no tratamento do diabetes mellitus e por encontrar-se na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), divulgada em 2009 pelo Ministério da Saúde.^{5,6} Essa espécie, pertencente ao gênero *Bauhinia* e família Fabaceae, é considerada uma planta nativa da América do Sul, encontrada no Brasil, predominantemente, entre as regiões do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul.^{7,8}

Os estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com *B. forficata* L. sugerem os glicosídeos flavonoídicos canferólicos e quercetínicos como seus principais constituintes e prováveis responsáveis pela sua propriedade antidiabética, sendo o canferol 3,7-di-O- α -L-rhamnopiranosídeo (canferitrina) considerado o marcador analítico das folhas.^{7,9} Apesar da potencialidade farmacológica e do grande interesse pela comunidade farmacêutica, a espécie referida não consta em monografias oficiais, fazendo-se necessário o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de seus compostos flavonoídicos e padronização de extratos.¹⁰

Diversas técnicas são empregadas para o doseamento de flavonóides em materiais vegetais, uma delas, a espectrofotometria de absorção na região ultravioleta-visível (UV-Vis), alcança grande destaque devido a sua simplicidade, rapidez, baixo custo de execução e ampla disponibilidade nos laboratórios de controle de qualidade.^{11,12} Embora extremamente utilizada, a pouca seletividade tem sido um dos maiores desafios dessa técnica para análise de matrizes complexas como os extratos vegetais, pois a espectrofotometria direta pode ocasionar sobreposição das bandas, impedindo a absorção do componente de interesse.^{13,14} Decorrente disso, para obtenção dos espectros dos flavonóides sem a interferência de outros

compostos fenólicos, comumente se emprega o método colorimétrico com cloreto de alumínio (AlCl_3) para tratamento das amostras a serem analisadas. Isto porque o cátion Al^{3+} forma complexos estáveis com as hidroxilas livres dos flavonóides, ocasionando extensão do sistema conjugado e consequentemente um desvio batocrômico, ou seja, um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda.¹⁵⁻¹⁷

Entretanto, antes de sua adoção oficial ou na rotina analítica, os métodos ou procedimentos analíticos precisam ser submetidos a uma série de experimento capazes de avaliar sua capacidade em detectar e quantificar um determinado analito.^{12,18} De acordo com a Resolução Específica (RE) nº 899/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), essa validação deve ser realizada através da análise de uma série de parâmetros, quais sejam: especificidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez, sendo o principal objetivo atestar a eficiência dos métodos na rotina laboratorial.¹⁹

Portanto, impulsionados pelas necessidades normativas no que se refere à regularização de fitoterápicos e diante do amplo interesse popular e institucional a cerca da *B. forficata* L., esse estudo descreve a avaliação dois procedimento para determinação espectrofotométrica de flavonóides totais descritos na literatura, com e sem hidrólise ácida, aplicados às folhas dessa espécie, de forma que os mesmos atendam às exigências sanitárias em vigor.¹⁹

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

As folhas de *B. forficata* L. foram coletadas em dezembro/2009 na Vila Gianetti, Viçosa – MG, sendo a identificação realizada pelo professor José Martins Fernandes e a exsicata depositada no Herbário VIC, do Departamento de Biologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa, sob o nº 32513. A identidade da amostra foi confirmada no Jardim Botânico do Rio de Janeiro – RJ, pela especialista em identificação de espécies do gênero *Bauhinia*, Ângela Vaz. Na preparação da matéria prima vegetal, as folhas foram submetidas à secagem em estufa a uma temperatura de 45°C, durante 72 h, e em seguida, pulverizadas em liquidificador industrial (Bermar® BM30).

Reagentes e vidrarias

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: cloreto de alumínio (Vetec[®]), acetona, ácido clorídrico, acetato de etila, metanol, ácido acético, ácido fosfórico, etanol (Dinâmica[®]; FMaia[®]), acetona (Cinética[®]), metenamina, quercetina e rutina (Merck[®]). 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 Nova ética[®], Espectrofotômetro UV-Vis mini- 1240 Shimadzu[®].

Teor de Flavonóides Totais por Espectrofotometria

Procedimento por Diluição direta (PDD) - sem hidrólise

Preparação da solução extrativa

A solução extrativa foi obtida através de extração sob refluxo com solução hidroalcoólica (40%, v/v), baseando-se no método desenvolvido e validado previamente por Petry e colaboradores.²⁰ A extração foi realizada em balão de fundo redondo contendo 1,0 g do material vegetal e 30 mL de solução hidroalcoólica, durante 30 min. O extrato foi resfriado à temperatura ambiente (25° C) e filtrado em algodão, sendo o resíduo (algodão e material vegetal) re-extraído por mais duas vezes, durante 10 min. As frações filtradas foram reunidas em balão volumétrico e o volume ajustado para 100,0 mL com a solução hidroalcoólica (40%, v/v).

Preparação da amostra para leitura

Alíquotas da solução extrativa foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, onde se adicionou 2,0 mL de solução etanólica de AlCl₃ (5%, m/v). Ajustou-se o volume, em seguida, com a solução hidroalcoólica (40%, v/v). Após a adição da solução de AlCl₃ (5%, m/v), a absorvância foi medida em espectrofotômetro, utilizando-se como branco uma solução

de compensação, preparada do mesmo modo que a amostra, mas sem adição da solução etanólica de AlCl_3 (5%, m/v).

Determinação da concentração da amostra e comprimento de onda para leitura

Uma série de amostras, diluídas a partir de uma solução extrativa (40%, v/v), foram submetidas à varredura em espectrofotômetro na faixa de 230 a 500 nm, após 30 min da adição de solução etanólica de AlCl_3 (5%, m/v), para identificação da diluição e do comprimento de onda que apresentassem o valor de absorvância mais adequado para o método.

Determinação do tempo para leitura

Foi realizada através da leitura de amostras da solução extrativa em comprimento de onda de 408 nm, em intervalos de 5, 15, 30, 45 e 60 min após adição da solução etanólica de AlCl_3 .

Procedimento por hidrólise ácida (PHA)

Preparação da solução extrativa

A solução extrativa foi obtida através de extração sob refluxo de 1,0 g da droga vegetal em solução ácida de acetona na presença adicionada de metenamina 0,5 % conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira para *Calendula officinalis* L. e modificado por Pinheiro e colaboradores.²¹

Preparação da amostra para leitura

Alíquotas da solução extrativa foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, onde se adicionou 1,0 mL de solução metanólica de AlCl_3 (5%, m/v). Ajustou-se o volume, em seguida, com solução metanólica de ácido acético (2,5%, v/v). Após a adição da solução de AlCl_3 (5%, m/v), a absorvância foi medida em espectrofotômetro, utilizando-se como

branco uma solução de compensação, preparada do mesmo modo que a amostra, mas sem adição da solução metanólica de AlCl_3 (5%, m/v).

Determinação da concentração da amostra e comprimento de onda para leitura

Uma série de amostras, diluídas a partir da solução extrativa foram submetidas à varredura em espectrofotômetro na faixa de 230 a 500 nm, após 30 min da adição de solução metanólica de AlCl_3 (5%, m/v), para identificação da diluição e do comprimento de onda que apresentassem o valor de absorbância mais adequado para o método.

Determinação do tempo para leitura

Foi realizada através da leitura de amostras da solução extrativa em comprimento de onda de 408 nm, em intervalos de 5, 15, 30, 45 e 60 min após adição da solução metanólica de AlCl_3 .

Cálculo para determinação do teor de flavonóides totais (TFT)

O TFT, expresso em porcentagem (p/p) de flavonoides totais calculados como quercetina, foi calculado para ambos os procedimentos de acordo com a equação abaixo:

$$TFT = \frac{A \cdot FD}{m \cdot E_{1cm}^{1\%}}$$

Onde: TFT = teor de flavonóides totais; A = absorvância determinada; FD = fator de diluição; m = massa de droga seca (g); $E_{1cm}^{1\%}$ = absorção específica do complexo quercetina – cloreto de alumínio.

Posteriormente, as concentrações foram convertidas para μg de quercetina por mL de extrato.

Avaliação dos procedimentos analíticos

Avaliação da razão droga vegetal: solvente

Para ambos os procedimentos estudados foram preparadas soluções extrativas a partir de diferentes quantidades de droga vegetal: 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 ou 1,5 g. Desta forma, foi

avaliada a influência da razão de droga vegetal: líquido extrator (p: v) sobre a resposta do procedimento.

Avaliação da influência da diluição do analito e da concentração de reagente

A avaliação destes parâmetros foi conduzida através de um planejamento fatorial 3^2 (2 variáveis em 3 níveis de variação) aumentado de 2 pontos centrais para avaliação do efeito da concentração das amostras e concentração das soluções de AlCl_3 (variáveis independentes) sobre o comportamento espectrofotométrico dos flavonóides (variável dependente). A Tabela 1 apresenta os valores utilizados em cada nível estudado.

Os níveis de concentração das amostras foram selecionados nos estudos preliminares, de acordo com o item determinação da concentração da amostra e comprimento de onda, enquanto os níveis de concentração da solução de AlCl_3 foram baseados no estudo realizado anteriormente.²² Todas as análises foram realizadas em triplicata e de modo aleatório. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software STATISTICA[®], 6.0 (StatSoft, USA), através do qual foram geradas superfícies de resposta.

Tabela 1 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial 3^2 .

Níveis	Concentração da amostra (mg/ mL) ^a	Concentração da amostra (mg/ mL) ^b	Concentração da solução de AlCl_3 (% m/v)
- 1 (Inferior)	1,6	0,32	2,5
0 (Central)	2,8	0,64	5,0
+ 1 (Superior)	4,0	0,96	7,5

^aAmostra obtida pela PDD; ^bAmostra obtida pela PHA.

Validação dos Procedimentos Analíticos

Os procedimentos descritos foram avaliados quanto à especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão e robustez, de acordo com as normas estabelecidas.¹⁹ Todas as análises foram realizadas em triplicata e a confiabilidade dos parâmetros foi verificada pelo coeficiente de

variação percentual (CV%) ou desvio padrão relativa (DPR%), não se admitindo valores superiores a 5%. Adicionalmente, os resultados foram tratados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) *One-Way* ou *Two-Way*, quando aplicável.

Especificidade

A especificidade das técnicas foi demonstrada através da sobreposição dos espectros de padrões e das amostras do extrato com e sem adição da solução de AlCl_3 (2,5%, m/v), obtidos na faixa de 230 a 500 nm. Quercetina foi empregada para avaliação do procedimento PDD, enquanto que a rutina foi adotada para avaliação do procedimento PHA. No segundo caso, a rutina foi previamente tratada de acordo com o procedimento de hidrólise aplicado à droga vegetal. A eleição das substâncias dos padrões quercetina e rutina foi fundamentada nos relatos da presença dos mesmos na espécie estudada e na similaridade estrutura com os glicosídeos canferólicos.

Linearidade

A linearidade da resposta espectrofotométrica para os procedimentos em estudo foi verificada a partir da análise de três curvas autênticas, construídas com amostras da solução extrativa, em cinco níveis de concentração, na faixa de 0,8 a 4,0; e de 0,3 a 0,9 mg/mL para PDD e PHA, respectivamente. As curvas foram construídas empregando os valores médios das absorvâncias (PDD e PHA) em função da concentração. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de determinação (R^2), adotando $R^2 > 0,99$ como valor mínimo para aceitação.

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados (em $\mu\text{g/mL}$) de acordo com as equações $\text{LD} = \text{DP}_a \times 3/\text{IC}$ e $\text{LQ} = \text{DP}_a \times 10/\text{IC}$, onde DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y obtido das três curvas de linearidade e IC é a média dos coeficientes angulares (inclinação da reta) das respectivas curvas.

Precisão

A precisão foi avaliada pela repetitividade (precisão intracorrida), na qual foram examinadas, em um único dia, 6 determinações individuais para amostras a 100% da

concentração teste, obtidas a partir de soluções extrativas diferentes, e pela precisão intermediária (precisão intercorridas), a qual foi determinada por dois analistas em dois dias consecutivos, para amostras também na concentração de 100%.

Exatidão

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação, através da adição de quantidades conhecidas de solução extrativa diluída a amostras a 100% da concentração teste. Os valores de recuperação, expressos em porcentagem, foram determinados através da razão entre as concentrações médias determinadas experimentalmente com as concentrações teóricas correspondentes. Para a PDD, amostras a 2,8 mg/mL de material vegetal foram acrescidas de quantidades crescentes (1,0; 2,0 e 3,0 mL) de uma solução contaminante a 3,6 mg/mL de material vegetal, resultando em três soluções (2,944; 3,088 e 3,232 mg/mL), com três réplicas cada. Do mesmo modo, para a PHA, amostras (0,64 mg/mL) foram acrescidas de quantidades crescentes de uma solução extrativa contaminante (1,12 mg/mL), resultando em três soluções (0,6848; 0,7296 e 0,7744 mg/mL), com três réplicas cada.

Robustez

O ensaio para determinação da robustez dos procedimentos sobre a resposta espectrofotométrica foi realizado a partir da variação dos seguintes parâmetros: influência da luminosidade (presença e ausência de luz), estabilidade da solução extrativa (0, 3 e 6 h), fabricante do solvente [álcool etílico absoluto (Dinâmica[®] e FMaia[®]) para a PDD e acetona (Dinâmica[®] e Cinética[®]) para a PHA].

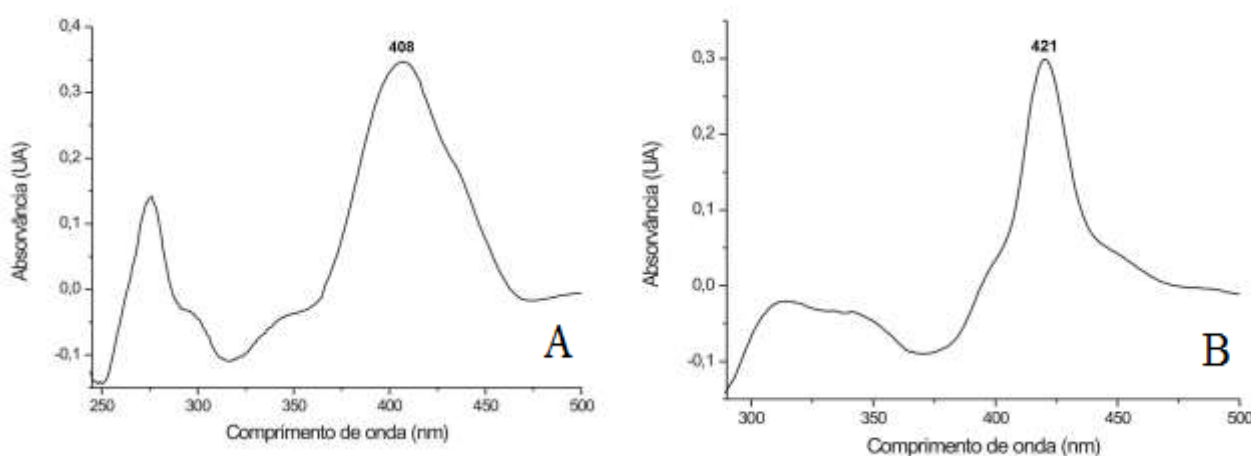
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação dos procedimentos analíticos

Determinação da concentração da amostra e comprimento de onda para leitura

Os comprimentos de onda com absorvância máxima observados nos espectros de absorção das amostras obtidas pela PDD e PHA, após a reação de complexação com AlCl_3 , foi de 408 e 421 nm, respectivamente (Figura 1). Já as diluições da solução extrativa que apresentaram o valor de absorvância mais adequado para os procedimentos foram de 7/25 e 4/25 v/v, correspondendo as concentrações de 2,8 e 0,64 mg/mL.

Figura 1 - Varredura dos extratos de *B. forficata*. (A) PDD e (B) PHA.



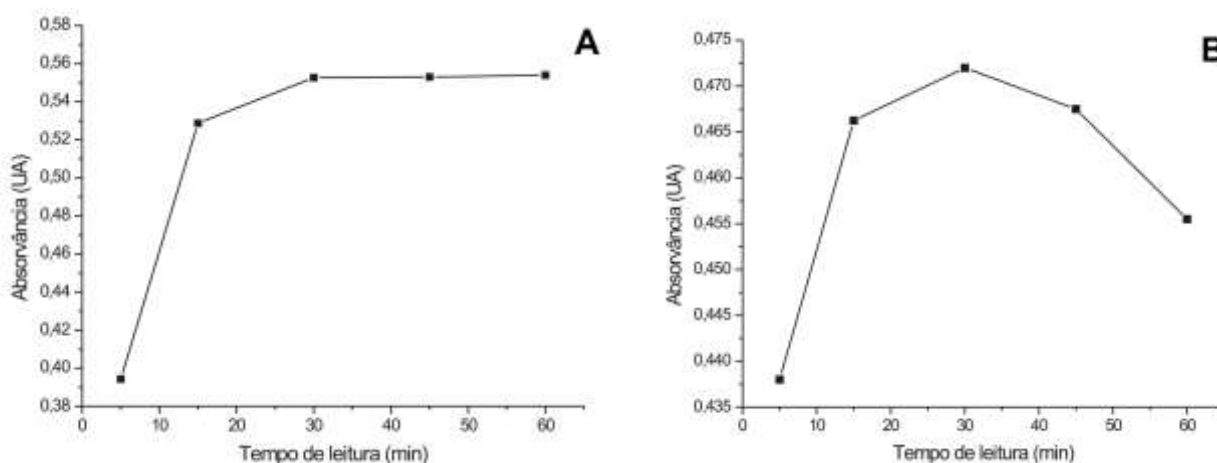
Determinação do tempo de leitura

O tempo de reação necessário para formação do complexo flavonóide: Al^{3+} exerce função importante na resposta de métodos espectrofotométricos e depende de fatores tais como padrão de substituição da aglicona e da razão aglicona- Al^{3+} .²² Também merece atenção o fato de que em misturas ou em extratos, o perfil de formação destes complexos são diferentes do observado para substâncias puras. Portanto, a avaliação e estabelecimento do tempo necessário para que haja formação máxima do complexo assim como a estabilidade depois de formado, é uma das etapas preliminares para que este erro sistemático possa ser minimizado.²⁰

Neste estudo, comportamentos distintos foram observados para as amostras estudadas. Embora ambas as amostras tenha apresentado aumento na absorvância até 30 minutos de reação após a adição de solução de AlCl_3 , o emprego do PDD propiciou comportamento estável até o final do ensaio. Por outro, a amostra obtida após PHA apresentou redução na absorvância lida após 30 minutos, com redução importante da resposta até o fim do experimento (Figura 2). Embora os mecanismos que levam a reversão dos complexos

formados na segunda amostra, os dados obtidos permitem estabelecer o tempo de leitura de 30 minutos, após adição da solução de AlCl_3 , como o mais apropriado para realização da leitura.

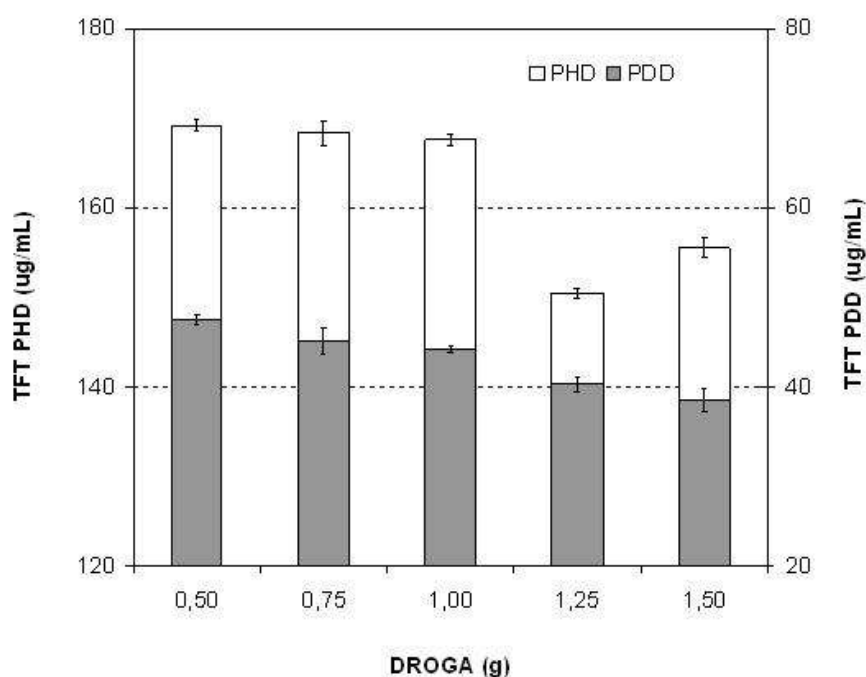
Figura 2 - Cinética de complexação dos flavonóides com AlCl_3 (A) PDD e (B) PHA.



Avaliação da proporção droga vegetal: solvente

A influência da proporção de droga vegetal sobre a resposta do método para ambos os procedimentos analíticos, foi avaliada na faixa de 0,5 a 1,5 g. Os dados revelaram comportamento linear para os TFTs calculados para amostras na região de 0,5 a 1,0 g. Para amostras de 1,25 g ou superior, a resposta do método apresentou decréscimo significativo para o TFT, o qual pode ser atribuído a saturação do meio de extração ou limitação do meio reacional (Figura 3). Por outro lado, amostras menores que 0,5 g de droga vegetal levaram a leituras inferiores a 0,2 U.A., as quais estão em desacordo com a lei de Lambert-Beer.²³ Considerando as limitações observadas, os TFTs calculados para amostras de droga vegetal na região linear foram de $45,60 \pm 1,68 \mu\text{g/mL}$ (3,69 %) e $168,36 \pm 0,81 \mu\text{g/mL}$ (0,48 %), para PDD e PHA, respectivamente.

Figura 3 - Rendimento comparativo em g % de TFT para cada procedimento em função da quantidade de amostra.



Avaliação da influência da diluição do analito e da concentração de reagente

Como discutido anteriormente, a formação do complexo flavonóide- Al^{3+} apresenta dependência importante das diferentes classes de flavonóides e que esse efeito é bastante específico e intrínseco. Ademais, o comportamento observado para o flavonóide isolado sofre modificação importante quando presente em mistura ou na solução extrativa, de maneira que para cada droga vegetal é primordial investigar o comportamento antes da adoção de procedimentos desta natureza.²⁴ Nesse sentido, as influências das concentrações de AlCl_3 e da amostra, sobre a resposta do método para cada procedimento proposto, foram investigadas através de planejamento fatorial do tipo 3^2 , e adicionados de 2 pontos centrais. A matriz completa do planejamento experimental para avaliação de ambos os procedimentos (PDD e PHA), está apresentada na Tabela 2, juntamente com os resultados experimentais encontrados.

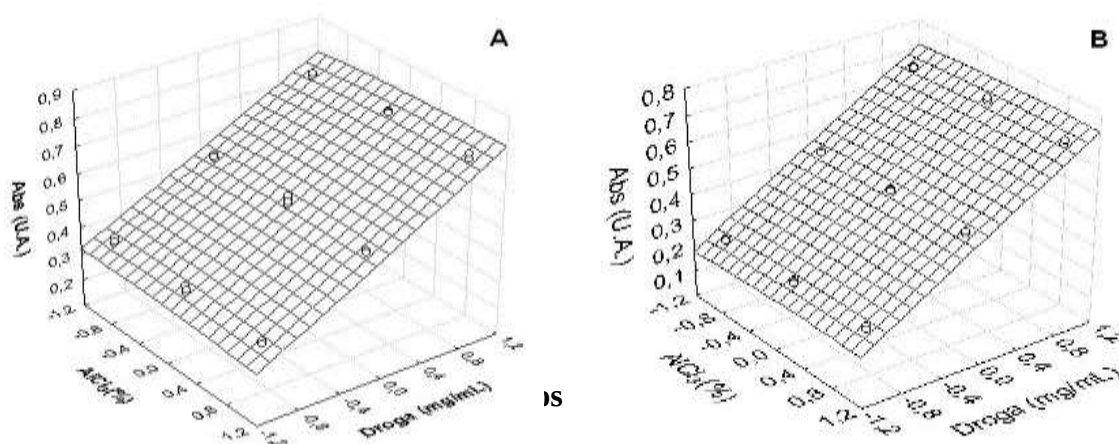
Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental

Exp.	Variáveis Codificadas		Variáveis Naturais			Abs (U.A.)	
	AlCl ₃	Amostra	AlCl ₃ (%) m/v	PDD (mg/mL)	PHA (mg/mL)	PDD (média ± dp)	PHA (média ± dp)
1	-1	-1	2,5	1,6	0,32	0,357 ± 0,01	0,231 ± 0,01
2	-1	0	2,5	2,8	0,64	0,550 ± 0,01	0,453 ± 0,01
3	-1	1	2,5	4,0	0,96	0,738 ± 0,01	0,668 ± 0,01
4	0	-1	5,0	1,6	0,32	0,351 ± 0,01	0,240 ± 0,01
5	0	0	5,0	2,8	0,64	0,565 ± 0,01	0,469 ± 0,01
6	0	1	5,0	4,0	0,96	0,755 ± 0,01	0,690 ± 0,01
7	1	-1	7,5	1,6	0,32	0,343 ± 0,01	0,243 ± 0,01
8	1	0	7,5	2,8	0,64	0,539 ± 0,01	0,473 ± 0,01
9	1	1	7,5	4,0	0,96	0,755 ± 0,01	0,685 ± 0,01
10	0	0	5,0	2,8	0,64	0,548 ± 0,01	0,467 ± 0,01
11	0	0	5,0	2,8	0,64	0,546 ± 0,01	0,464 ± 0,01

Os dados foram empregados para gerar superfícies de respostas (Figura 2), as quais permitiram observar o comportamento dos fatores (variáveis independentes) e suas interações sobre a resposta de espectrofotométrica (variável dependente) para cada procedimento analítico (PDD ou PHA).²⁴

A análise das superfícies de resposta (Figura 4) revelou que, independente do procedimento de preparação de amostra, as respostas do método (absorvância) não foi sensível a variação nas concentrações de AlCl₃. Considerando a concentração de droga vegetal, a resposta do método apresentou relação linear e não foi observada qualquer interação entre os fatores estudados. Assim, os resultados encontrados permitiram a escolha da solução de AlCl₃ (2,5%, m/v) como reagente para qualquer dos procedimentos adotados.

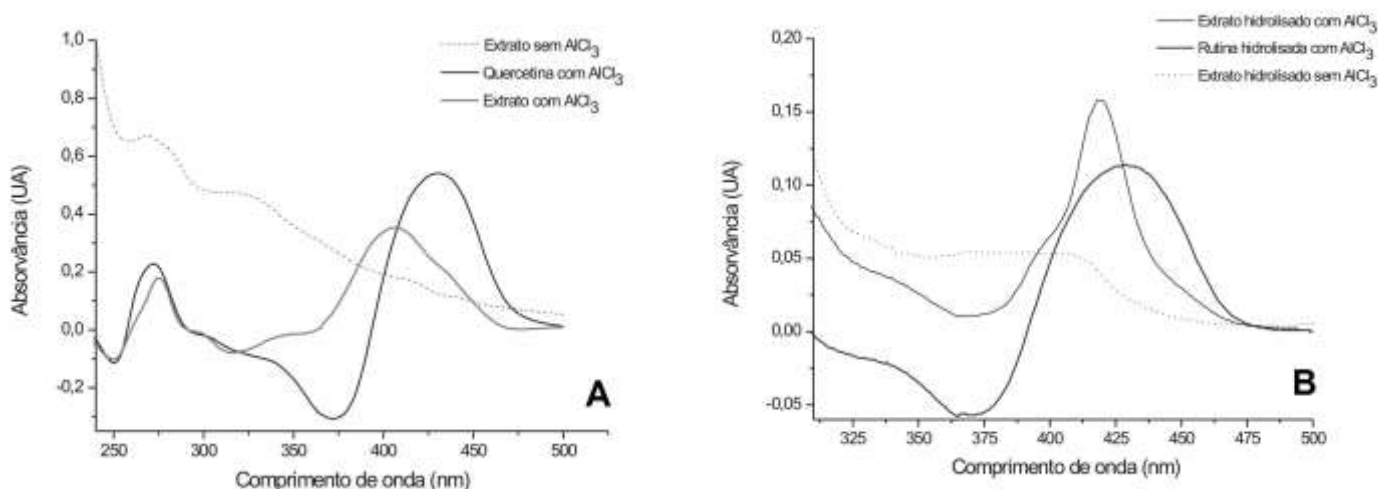
Figura 4 - Superfície resposta geradas a partir das respostas do planejamento fatorial 3² para PDD (A) e PHA (B). [Abs] = Absorvância



Especificidade

Na figura 5 estão apresentados os espectros de varredura obtidos para as soluções de referência de quercetina e hidrolisado da rutina após adição de AlCl_3 , em comparação com os espectros das soluções extrativas de *B. forficata* L. antes e após a adição de AlCl_3 e obtidas de acordo com ambos os procedimentos PDD e PHA. A avaliação dos espectros permitiu observar que há similaridade importante entre os espectros das soluções empregadas como referência e as respectivas soluções extrativas. Considerando o procedimento PDD (figura 5A), após a adição da AlCl_3 o comprimento de onda que ocorre o máximo de absorção foi de 408 nm. Por outro lado, para o procedimento PHA (figura 5 B), o máximo observado após adição de AlCl_3 ocorreu em 421 nm. Os dados apresentados confirmam que os comprimentos de onda selecionados anteriormente, representam satisfatoriamente os marcadores eleitos para a espécie.

Figura 5 - Espectros de varredura obtidos na análise da especificidade (A) PDD e (B) PHA.



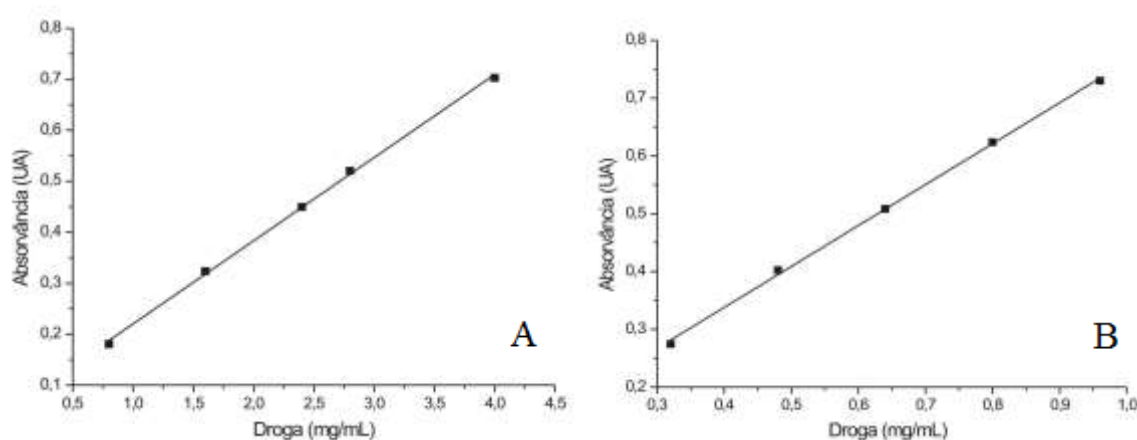
Linearidade, Limites de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Para avaliar a linearidade da resposta analítica para ambos os procedimentos, foi executada regressão linear para curvas obtidas a partir de cinco concentrações nas regiões de 0,8 a 4,0 mg/mL e 0,3 a 0,9 mg/mL, para os procedimentos PDD e PHA, respectivamente (Figura 6).

Os dados da regressão obtidos pelo método dos mínimos quadrados apresentaram

valores de coeficientes de determinação (R^2) de 0,998 e 0,999 para o PDD e PHA, respectivamente, denotando que mais que 99 % (99,8% e 99,9%, respectivamente), da variabilidade experimental é explicado satisfatoriamente pela equação proposta, comprovando a relação linear entre o aumento da concentração do analito e a resposta espectrofotométrica. Os dados permitiram afirmar que o desempenho dos procedimentos atende os requisitos preconizados para análise de parâmetro.

Figura 6 - Curvas de linearidade do extrato de *B. forficata* L. (A) PDD e (B) PHA.



Considerando os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), os resultados encontrados foram 0,130 e 0,435 mg/mL e 0,028 e 0,091 mg/mL para PDD e PHA, respectivamente. Com esses resultados, verificamos que os procedimentos proporcionam respostas espectrofotométricas com sensibilidade para detecção e quantificação dos flavonóides totais nos extratos de *B. forficata* L. com a confiabilidade desejada.

Precisão, Exatidão, Robustez

Os procedimentos propiciaram respostas espectrofotométricas precisas nos dois níveis analisados: repetitividade e precisão intermediária (Tabela 3). Quanto ao parâmetro repetitividade para PDD e PHA, os resultados apresentaram, respectivamente, respostas médias em flavonóides totais de 41,53 e 164,99 $\mu\text{g/mL}$ e CVs de 0,13 e 0,85% (valores bem abaixo do valor máximo preconizado e igual 5%). Quanto ao parâmetro precisão intermediária, foi demonstrado através do tratamento estatístico por ANOVA de duas entradas, que os procedimentos são precisos para as análises realizadas por analistas diferentes em um mesmo dia e em dias diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Resultados obtidos na análise da precisão intermediária da PDD e PHA.

		Dia 1	Dia 2	Analista	Dia
		(µg/mL)	(µg/mL)		
PDD	Analista 1	41,16 ^a	41,95 ^a	F _{calculado} = 0,69	F _{calculado} = 0,85
	Analista 2	41,92 ^a	41,85 ^a	F _{tabelado} = 18,51	F _{tabelado} = 18,51
PHA	Analista 1	164,49 ^a	158,36 ^a	F _{calculado} = 1,36	F _{calculado} = 5,13
	Analista 2	163,49 ^a	161,70 ^a	F _{tabelado} = 18,51	F _{tabelado} = 18,51

PDD – Procedimento por diluição direta; PHA– Procedimento por hidrólise ácida; ^aResultado expresso em quercetina (µg de flavonóide/mL de extrato).

A exatidão dos procedimentos foi estimada a partir do ensaio de recuperação. Desta forma, a interferência da matriz sobre a resposta do método foi avaliada sob dois aspectos: a capacidade de extração dos analitos e a repetibilidade das respostas. De acordo com os dados observados, não houve interferência significativa dos procedimentos sobre a recuperação de flavonóides totais os quais apresentaram taxas de recuperação de 100,55 % ± 1,71 para PDD e 100,46 % ± 1,26 para PHA (Tabela 4). Adicionalmente, os procedimentos apresentaram respostas bastante exatas em todos os níveis testados confirmados através dos coeficientes de variação de 1,70 % para PDD e 1,25 % para PHA.

Tabela 4 - Resultados obtidos no teste de recuperação da PDD e PHA

		Amostra	Valor teórico	Valor experimental (µg/mL)	Recuperação
		(mg/mL)	(µg/mL)	Média ± dp	(%)
PDD		2,944	44,37 ^a	43,78 ^a ± 1,43	98,66
		3,088	45,93 ^a	46,38 ^a ± 2,33	100,99
		3,232	48,54 ^a	49,51 ^a ± 0,75	101,99
PHA		0,6848	171,11 ^a	174,30 ^a ± 0,41	101,85
		0,7296	182,31 ^a	182,54 ^a ± 2,15	100,12
		0,7744	193,50 ^a	192,35 ^a ± 4,15	99,4

PDD = Procedimento por diluição direta; PHA = Procedimento por hidrólise ácida; dp = desvio padrão;

^aResultado expresso em quercetina (µg de flavonóide/mL de extrato).

A robustez dos procedimentos foi testada preliminarmente através da avaliação da fotoestabilidade dos complexos (exposição a luz do dia por até 6 horas) e do fabricante do

etanol. Os dados mostraram que ambos os procedimentos (PDD e PHA) se mostraram robustos quanto aos parâmetros analisados, pois todos os F calculados foram inferiores aos F tabelados, através de ANOVA de uma entrada (Tabela 5 e 6).

Tabela 5 - Resultados obtidos para análise da robustez da PDD.

Parâmetros	Variáveis	Tempo (h)	TFT (µg/mL) Média ± dp	F
Luminosidade	Ausência de Luz	---	40,26 ^a ± 0,01	F _{calculado} = 3,872
	Presença de Luz	---	41,38 ^a ± 0,22	F _{tabelado} = 18,512
Estabilidade	Ausência de Luz	0	40,27 ^a ± 0,42	F _{calculado} = 4,823 F _{tabelado} = 5,143
		3	40,24 ^a ± 0,42	
		6	41,03 ^a ± 0,13	
	Presença de Luz	0	41,22 ^a ± 0,22	F _{calculado} = 0,571 F _{tabelado} = 5,143
		3	41,54 ^a ± 0,50	
		6	41,34 ^a ± 0,31	
Marca do Solvente (Álcool etílico)	Dinâmica [®]	---	41,93 ^a ± 0,08	F _{calculado} = 5,727
	Fmaia [®]	---	41,39 ^a ± 0,37	F _{tabelado} = 7,708

dp = desvio padrão; ^aResultado expresso em quercetina (µg de flavonóide/mL de extrato).

Tabela 6 - Resultados obtidos para análise da robustez da PHA.

Parâmetros	Variáveis	Tempo (h)	TFT (µg/mL) Média ± dp	F
Luminosidade	Ausência de Luz	---	163,71 ^a ± 1,93	F _{calculado} = 17,326
	Presença de Luz	---	170,25 ^a ± 1,41	F _{tabelado} = 18,512
Estabilidade	Ausência de Luz	0	162,49 ^a ± 1,76	F _{calculado} = 4,961 F _{tabelado} = 5,143
		3	162,71 ^a ± 1,84	
		6	165,94 ^a ± 0,51	
	Presença de Luz	0	162,49 ^a ± 1,76	F _{calculado} = 2,664 F _{tabelado} = 5,143
		3	162,71 ^a ± 1,84	
		6	165,94 ^a ± 0,51	
Marca do Solvente (Acetona)	Dinâmica [®]	---	161,04 ^a ± 1,17	F _{calculado} = 0,137
	Fmaia [®]	---	161,93 ^a ± 3,98	F _{tabelado} = 7,708

dp = desvio padrão; ^aResultado expresso em quercetina (µg de flavonóide/mL de extrato).

CONCLUSÃO

Os procedimentos analíticos para determinação espectrofotométrica de flavonóides totais nas folhas de *B. forficata* L. avaliados neste trabalho apresentaram desempenho dentro das especificações sanitárias preconizadas para métodos analíticos e bioanalíticos para os parâmetros de linearidade, especificidade, sensibilidade, exatidão e recuperação. Desta forma, os procedimentos puderam ser considerados validados para o fim que se propõem. Enquanto o procedimento por diluição direta apresentou maior simplicidade em virtude do menor número de passos experimentais, o procedimento por hidrólise ácida apresentou maior sensibilidade em virtude do procedimento de preparação da amostra. Por fim, foi possível concluir que, independente das metodológicas, ambos os procedimentos avaliados neste estudo estão apropriados ao emprego como ferramenta de controle de qualidade para a droga vegetal e produtos derivados das folhas de *B. forficata* L.

REFERÊNCIAS

1. Araújo, A. A. S.; Mercuri, A. L. P.; Seixas, S. R. S.; Storpirtis, S.; Matos, J. R. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2006**, 42, 269.
2. http://www.abifisa.org.br/noticias_ver.asp?news=3594, acessada em Agosto 2011.
3. Toledo, A. C. O.; Hirata, L. L.; Buffon, M. C. M.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G. *Rev. Lecta* **2003**, 21, 7.
4. Brasil; Resolução RDC nº14 de 31/03/10; *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 05/04/10, seção 1 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.
5. Silva, K. L.; Cechinel Filho, V. *Quim. Nova* **2002**, 25, 449.
6. <http://www.saude.gov.br>, acessada em Abril 2009.
7. Pizzollatti, M. G.; Cunha Jr., A.; Szpoganicz, B.; Souza, E. *Quim. Nova* **2003**, 26, 466.
8. Vaz, A. M. S. F.; Tozzi, A. M. G. A. *Rev. Bras. Bot.* **2005**, 28, 477.
9. Sousa, E.; Zanatta L.; Seifriz, I.; Creczynski-Pasa, T. B.; Pizzolatti, M. G.; Szpoganicz, B.; Silva, F. R. M. B. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 829.
10. Lusa, M. G.; Bona, C.; *Acta Bot. Bras.* **2009**, 23, 196.
11. Komarova, N. I.; Rogachev, A. D. Chernyak, E. I.; Morozov, S. V.; Fomenko, V. V.; Salakhutdinov, N. F. *Chem. Nat. Compd.* **2009**, 45, 27.
12. Alves, L. D. S.; Rolim, L. A.; Fontes, D. A. F.; Rolim-Neto P. J.; La Roca, M. F.; Soares Sobrinho, J. L. *Quim. Nova* **2010**, 33, 1967.

13. Perkampus, H. H. *UV-VIS spectroscopy and its applications*, Springer-Verlag: Berlin, 1992.
14. Rocha, F. R. P.; Teixeira, L. S. G. *Quim. Nova* **2004**, 27, 807.
15. Marcucci, M. C.; Woisky, R. G.; Salatino, A. *Mensagem Doce* **1998**, 46, 3.
16. Souza, R. F. V.; Giovani, W. R. F. *Spectrochim Acta, Part A* **2005**, 61, 1985.
17. Buriol, L.; Finger, D.; Schmidt, E. M.; Dos Santos, J. M. T.; Da Rosa, M. R.; Quináia, S. P.; Torres, Y. N.; Santa, H. S. D.; Pessoa, C.; De Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; Ferreira, P. M. P.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N. *Quim. Nova* **2009**, 32, 296.
18. Santana, A. K. M.; Nunes, L. C. C.; Medeiros, F. P. M.; Silva, M. J.; Lavra, Z. M. M.; Rolim-Neto, P. J. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* **2007**, 28, 177.
19. Brasil; Resolução RE nº899 de 29/5/2003; *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 02/06/2003, seção 1 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.
20. Petry, R. D.; De Souza, K. C. B.; Bassani, V. L.; Petrovick, P. R.; González Ortega, G. *Rev. Bras. Farm.* **1998**, 79, 7.
21. Pinheiro, T. S. D. B.; Johansson, L. A. P.; Pizzolatti, M.G.; Biavatti, M. W. *J Pharmaceut. Biomed. Anal.* **2006**, 41, 431.
22. Petry, R. D.; Gonzáles Ortega, G.; Silva, W. B. *Die Pharmazie* **2001**, 56, 465.
23. Soares, L.A.L.; Bassani, V.L.; González Ortega, G.; Petrovick, P.R. *Acta Farm. Bonaerense* **2003**, 22, 203.
24. Mothé, C. G.; Correia, D. Z. *Rev. Analytica* **2002**, 2, 59.

6. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Artigo V – Development and validation of analytical method to quantify kaempferitrin in leaves of *bauhinia forficata* link (fabaceae) by RP HPLC-DAD

Artigo submetido ao Journal of Chromatographic Science

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
QUANTIFICAÇÃO DE CANFERITRINA EM FOLHAS DE *Bauhinia forficata* Link
(Fabaceae) POR CLAE – DAD FASE REVERSA**

RESUMO

Dentre as espécies vegetais de amplo interesse popular e institucional destaca-se a *Bauhinia forficata* Link (pata de vaca), eficaz no tratamento da diabetes por apresentar propriedades antidiabéticas e hipoglicemiantes. O interesse por metodologias analíticas para controle de qualidade de drogas vegetais tem crescido bastante, em virtude da escassez de monografias em compêndios oficiais. Nesse sentido, o presente estudo visou desenvolver e validar uma técnica para quantificação do marcador canferitrina por CLAE, em folhas de *B. forficata* L. (pata-de-vaca). As análises foram conduzidas em cromatógrafo a líquido Shimadzu®, coluna C18 Restek® (250 mm x 4,6 mm, 5µm), a 40 °C. Utilizou-se fase móvel composta por H₃PO₄: H₂O 0,02% (A) e acetonitrila (B) no seguinte gradiente: 0-5 min, 85% A; 5-30 min, 70% A; 30-32 min, 80% A; 32-35 min, 85% A. O fluxo foi 1 ml/min e o volume de injeção 20 µL. O extrato foi preparado através de extração sob refluxo com solução hidroalcoólica 40% (v/v). Diante dos resultados, o método apresentou-se específico, sensível, linear, preciso, exato e robusto, sendo apto para análise laboratorial no controle de qualidade da droga vegetal de *B. forficata* L.

Palavras-chave: *Bauhinia forficata* Link, canferitrina, quantificação, validação.

ABSTRACT

Among the species of wide popular and institutional interest stands out *Bauhinia forficata* Link (cow's foot), effective in the treatment of diabetes by having hypoglycemic and antidiabetic properties. Interest in analytical methods for quality control of herbal drugs has grown, due to the scarcity of monographs in official manuals. Accordingly, the present study aimed to develop and validate a method to quantify by HPLC the marker kaempferitrin in leaves of *B. forficata* L. (cow's foot). Analyses were performed on a Shimadzu® liquid chromatograph, Restek® C₁₈ column (250 mm x 4.6 mm, 5µm) at 40 °C. It was used a mobile phase of H₃PO₄: H₂O 0.02% (A) and acetonitrile (B) in the following gradient conditions: 0-5 min, 85% A; 5-30 min, 70% A; 30-32 min, 80% A; 32-35 min, 85% A. The flow rate was 1 ml/min and the injection volume was 20 µL. The extract was prepared under reflux with hydroalcoholic solution 40% (v/v). According to the results, the method was proven to be specific, sensitive, linear, precise, accurate and robust, being suitable for quality control of the *B. forficata* L.

Keywords: *Bauhinia forficata* Link, quantification, validation.

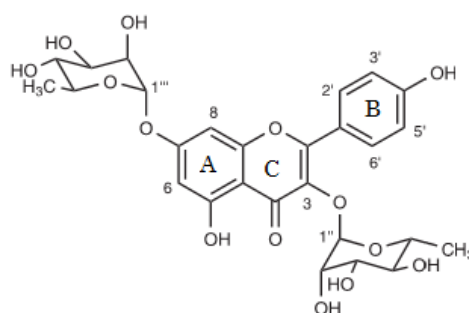
INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são importante fonte de muitos dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado com diversas propriedades terapêuticas, entre elas, cerca de 1200 espécies no mundo apresentam potencial antidiabético, em sua maioria pertencente a famílias Fabaceae, Asteraceae e Lamiaceae (Trojan-Rodrigues et al., 2012).

Bauhinia forficata Link (conhecida como pata de vaca devido à o 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; Menezes et al., 2007; Ruela et al., 2007). Estas atividades são atribuídas à principalmente a presença de compostos flavonoídicos, em destaque a canferitrina (canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo) (Figura 1) (Tzeng et al., 2009; Jorge et al., 2004).

Diversas técnicas podem ser empregadas para o doseamento de metabólitos secundários em materiais vegetais, sendo a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) as que alcançam maior destaque, pois consiste em uma técnica mais sensível, precisa e exata em relação aos outros métodos. Através desta técnica ainda é possível analisar compostos distribuídos em uma ampla faixa de polaridade, massa molecular e labilidade térmica (Volpato, 2008; Linden, 2007).

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



Na literatura têm sido relatados diversos estudos utilizando técnicas analíticas como a CLAE na 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), resaltando algumas limitações na aquisição de padrões de referência para a elucidação das moléculas (Hoffmann-Ribani et al., 2008; César et al., 2007).

Estudos também têm mostrado a utilização dessa técnica na verificação de teores de isoflavonas (daidzeína, genisteína e gliciteína) em cápsulas contendo extrato seco de soja (César et al, 2007). Sousa et al. (2010) realizaram pesquisas aplicando o CLAE para quantificação de metilxantinas (cafeína, teofilina e teobromina) em extrato de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae). Concomitante a esse estudo eles realizaram a comparação da metodologia por CLAE com o método espectofotométrico para a determinação dos mesmos componentes. A partir da avaliação das metodologias pode-se concluir que o emprego do método cromatográfico é o mais indicado no controle de qualidade do extrato seco de guaraná, por ser uma técnica precisa, sensível, específica e rápida.

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

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através da comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações reprodutíveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação, que são evidências objetivas através da análise de uma série de parâmetros de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (Hoffmann-Ribani et al., 2008).

Diante do exposto, o objetivo deste artigo foi o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação do marcador químico e farmacológico flavonóide canferitrina em folhas de *B. forficata* L. através da CLAE.

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.

Na preparação da matéria-prima vegetal, as folhas foram submetidas à secagem em estufa industrial, a uma temperatura de 40°C, durante 52 h, e posteriormente, pulverizadas em Moinho de Marca D'Andrea Martel®.

Reagentes e vidrarias

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: ácido trifluoroacético, metanol, ácido acético, ácido fosfórico, etanol (Dinâmica®; FMaia®), acetonitrila grau cromatográfico e água ultrapurificada (Milli-Q System, Massachusetts, USA). Como padrão de flavonóide, utilizou-se canferitrina, gentilmente cedida pela Profª. Drª. Maique Weber Biavatti (Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis / SC). Utilizaram-se vidrarias volumétricas calibradas com certificado de calibração por lote do fabricante Satelit®.

Obtenção da solução extrativa

A solução extrativa foi obtida através de extração sob refluxo com solução hidroalcoólica (40% v/v), baseando-se no método desenvolvido e validado por Petry et al. (1998). A extração foi realizada em balão de fundo redondo contendo 1,0 g do material vegetal e 30 mL de solução hidroalcoólica, durante 30 min. O extrato foi resfriado à temperatura ambiente (25°C) e filtrado em algodão, sendo o resíduo (algodão e material vegetal) re-extraído, duas vezes, durante 10 min. As frações filtradas foram reunidas em balão volumétrico e o volume ajustado para 100,0 mL com a solução hidroalcoólica (40% v/v).

Obtenção da solução do padrão

Preparou-se uma solução etanólica de canferitrina a 50,0 µg/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 µg/mL.

Condições cromatográficas

As análises cromatográficas para quantificação de canferitrina na solução extrativa foram conduzidas 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). Os padrões e as amostras foram eluídos através de um gradiente de fase móvel composta por ácido fosfórico: água 0,02% (pH = 2,5) (A) e acetonitrila (B) (Tabela 1).

O fluxo foi de 1 ml/min e o volume de injeção de 20 µL. A quantificação da canferitrina foi realizada por padronização externa, na qual 5 concentrações do padrão foram utilizadas para construir a curva analítica. Todas as amostras e padrões foram filtrados em membranas com porosidade de 0,22 µm (Millipore®) e injetadas em triplicata.

Tabela 1 – As condições de gradiente de fase móvel constituído de ácido fosfórico: água 0,02% (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

Validação do Método Analítico

As metodologias descritas foram validadas quanto à especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão e robustez, de acordo com as normas estabelecidas pela RE nº 899/03 da ANVISA (BRASIL, 2003). Todas as análises foram realizadas em triplicata e a confiabilidade dos parâmetros foi verificada pelo coeficiente de variação percentual (CV) ou desvio padrão (DP), não se admitindo valores superiores a 5%. Adicionalmente, os resultados foram tratados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) *One-Way* ou *Two-Way*, quando aplicável.

Especificidade e Linearidade

A especificidade foi evidenciada pela sobreposição dos cromatogramas da canferitrina e do extrato das folhas de *B. forficata* L. com extrato de espécie de outra região (Viçosa-MG) com ausência de canferitrina.

A linearidade do método foi verificada a partir da análise da média de três curvas autênticas, construídas em seis níveis de concentração, numa faixa de 2,5 a 15,0 mg/mL para solução extrativa e 3 a 15 µg/mL para canferitrina. As curvas foram construídas plotando os valores médios das áreas em função da concentração. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de correlação (R^2), sendo $R^2 > 0.99$, o mínimo aceitável.

Limites de detecção e Limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram estimados (em µg/mL) de acordo com as equações $LD = DP \times 3/IC$ e $LQ = DP \times 10/IC$, onde DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y obtido das três curvas de linearidade e IC é a média dos coeficientes angulares (inclinação da reta) das respectivas curvas.

Precisão

A precisão foi avaliada pela repetitividade (precisão intracorrída), na qual foram examinadas, em um único dia, 6 determinações individuais para amostras a 100% da concentração teste, obtidas a partir de soluções extrativas diferentes, e pela precisão

intermediária (precisão intercorrida), a qual foi determinada por dois analistas em dois dias consecutivos, para amostras também na concentração de 100%.

Exatidão

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação, através da adição de quantidades conhecidas de solução extrativa diluída a amostras a 100% da concentração teste. Os valores de recuperação, expressos em porcentagem, foram determinados através da razão entre as concentrações médias determinadas experimentalmente com as concentrações teóricas correspondentes. As soluções extrativas foram de 10,0 mg/mL acrescidas de 10 mL de uma solução extrativa contaminante (12,5 mg/mL), resultando em três réplicas com 11,25 mg/mL.

Robustez

O ensaio para determinação da robustez foi realizado a partir da variação dos seguintes parâmetros: fluxo (0,9; 1,0 e 1,1 mL/min), temperatura da coluna (39, 40 e 41°C) e estabilidade da solução extrativa (0 e 24 h).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento do método cromatográfico

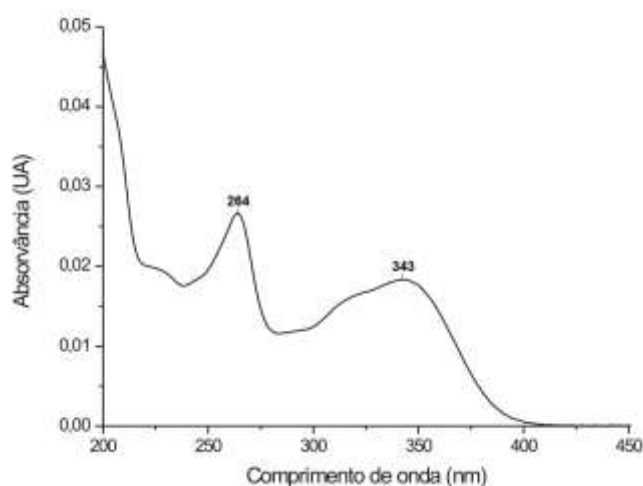
As condições cromatográficas foram primeiramente estabelecidas com a solução extrativa de *B. forficata* e, após otimização dos parâmetros, foram aplicadas para o padrão canferitrina. Para desenvolvimento do método, testaram-se diferentes fases móveis (ácido trifluoroacético: água e acetonitrila; ácido acético: água e acetonitrila e ácido fosfórico: água e acetonitrila) em condições variadas de gradiente, a fim de se obter a melhor separação e resolução do pico da canferitrina na solução extrativa. Selecionou-se a fase móvel composta por ácido fosfórico: água 0,02% (pH = 2,5) e acetonitrila em condições de gradiente (Tabela 1).

Avaliaram-se, também, colunas C₁₈ de diferentes comprimentos (15 e 25 cm), sendo escolhida a coluna C₁₈ de 25 cm da Restek[®]. A temperatura que apresentou maior resolução entre os picos e maior facilidade de estabilização para o forno do cromatógrafo durante as análises foi a de 40 °C. Variaram-se o fluxo e o volume de injeção entre 0,2-1 mL/min e 10-40

μL , respectivamente, sendo selecionados o fluxo de 1,0 mL/ min e o volume de injeção de 20 μL .

Os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda determinado na análise espectrofotométrica da canferitrina em detector de varredura por arranjo diodo (DAD), o qual demonstrou um máximo de absorvância em 343 nm (Figura 2).

Figura 2 - Varredura espectrofotométrica do padrão canferitrina.



O tempo de retenção para o padrão canferitrina, como também para a canferitrina presente na solução extrativa foi de 18,19 min. E os parâmetros utilizados para avaliação da conformidade do sistema cromatográfico escolhido estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros cromatográficos do pico da canferitrina na solução extrativa.

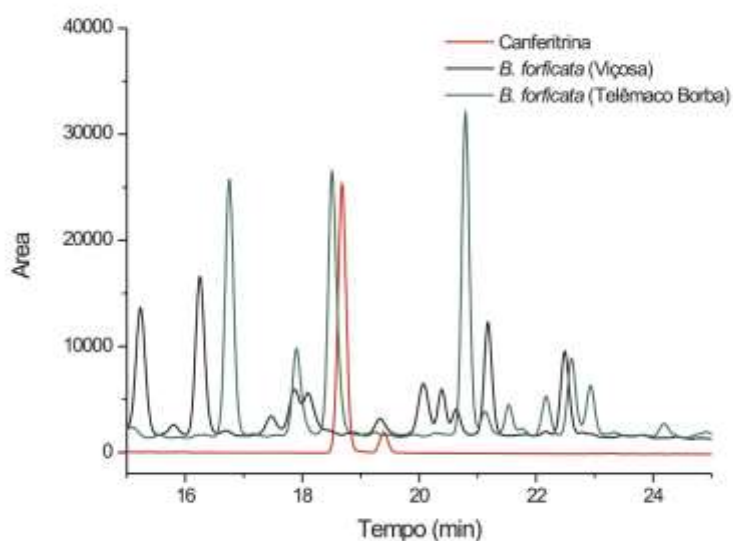
Parâmetros	Valor calculado	Valor aceitável (USP, 2010)
Resolução do pico	2,38	> 2,0
Fator de assimetria	0,96	< 1,5
Pratos teóricos	65528,31	2000
Fator de capacidade	6,806	

Validação do método cromatográfico

Especificidade

A avaliação da especificidade do método cromatográfico pode ser observada na Figura 3, através da sobreposição dos cromatogramas da canferitrina padrão e na solução extrativa das folhas de *B. forficata* L. Evidenciou-se nas amostras de *B. forficata* L. um pico com mesmo tempo de retenção do padrão, como também com o mesmo espectro espectrofotométrico com máximo de absorção em 343 nm. Com isso, confirmamos que neste comprimento de onda é possível quantificar especificamente a canferitrina contida no extrato de *B. forficata* L., mesmo na presença de outros compostos.

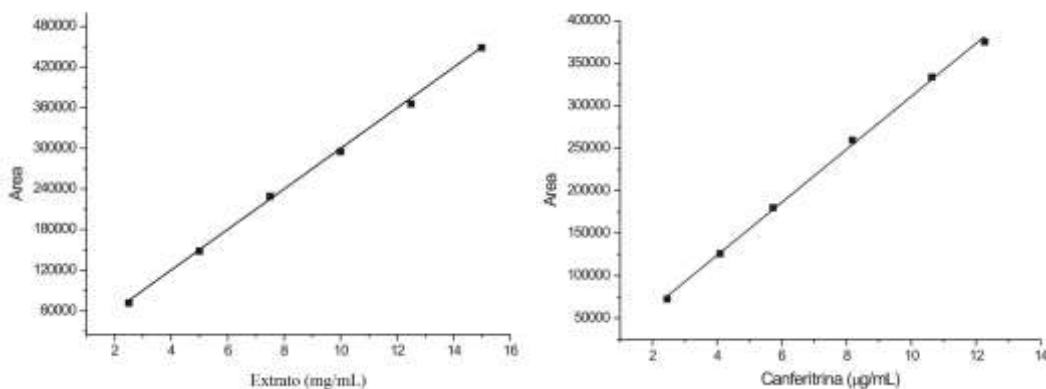
Figura 3 - Cromatograma do extrato de *B. forficata* L. sobreposto com canferitrina padrão.



Linearidade, Limites de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os resultados dos pontos das três curvas da solução extrativa, na faixa de 2,5 a 15 mg/ml, como também do padrão canferitrina, na faixa de 3 a 15 µg/mL, estão plotados na Figura 4 (x,y), onde y é a área (mUA) e x a concentração de canferitrina (µg/mL).

Figura 4 - Curvas de linearidade da solução extrativa de *B. forficata* L. e do padrão canferitrina.



A análise de regressão linear através do método dos mínimos quadrados apresentou, respectivamente, coeficientes de correlação de 0,999 e 0,9986 indicando linearidade dentro dos limites das concentrações estudadas, conforme as equações da reta $y = 0,9561x - 0,0077$ e $y = 31140x - 482,87$. De acordo com os resultados, observou-se também que não houve falta de ajustes para as médias, visto que os resíduos não apresentaram anormalidade na sua distribuição.

Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram 0,213 e 0,710 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Através dos resultados, verificamos que o método possui alta sensibilidade para detectar e quantificar o flavonóide canferitrina.

Precisão

O método mostrou-se precisos nos dois níveis analisados: repetitividade e precisão intermediária. Quanto ao parâmetro repetitividade encontrou-se como resultado uma média de canferitrina de 9,67 $\mu\text{g/mL}$ e um CV de 1,87%, abaixo do valor máximo especificado (5%). Quanto ao parâmetro precisão intermediária, foi demonstrado, através do tratamento estatístico por ANOVA *Two-Way*, que os métodos são precisos para as análises realizadas por analistas diferentes em um mesmo dia e em dias diferentes, em virtude dos F calculados terem sido inferiores aos F tabelados (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados experimentais obtidos na análise de precisão intermediária para método por CLAE.

Analistas	Dia 1	Dia 2	Analista	Dia
Analista 1	9,78 ($\mu\text{g/mL}$)	9,93 ($\mu\text{g/mL}$)	$F_{\text{calculado}} = 0,29$	$F_{\text{calculado}} = 0,84$
Analista 2	9,80 ($\mu\text{g/mL}$)	9,75($\mu\text{g/mL}$)	$F_{\text{tabelado}} = 18,51$	$F_{\text{tabelado}} = 18,51$

Exatidão

A exatidão, calculada pelo teste de recuperação, mostrou-se próximo a 100%, sendo de 97,89% para a amostra da solução extrativa de 11,25 mg/mL , a partir do valor teórico de canferitrina de 10,44 $\mu\text{g/mL}$ e valor real de 10,66 $\mu\text{g/mL}$.

Robustez

O método mostrou-se robusto quanto às variações de fluxo e temperatura do forno, como também, à estabilidade da solução extrativa durante o período de 24 h, pois através do

tratamento estatístico por ANOVA *One-Way*, os *F* calculados para todos os parâmetros apresentaram-se inferiores aos *F* tabelados (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados experimentais obtidos na análise de robustez para método por CLAE.

Parâmetro	(mL/min)	Média (µg/mL) ± dp	F
Fluxo	0,9	9,64 ± 0,06	F _{calculado} = 3,532 F _{Tabelado} = 5,143
	1,0	9,48 ± 0,13	
	1,1	9,71 ± 0,10	
Temperatura	(°C)	Média (µg/mL) ± dp	F _{calculado} = 0,841 F _{Tabelado} = 5,143
	39	9,76 ± 0,06	
	40	9,73 ± 0,05	
	41	9,70 ± 0,04	
Estabilidade	(h)	Média (µg/mL) ± dp	F _{calculado} = 0,741 F _{Tabelado} = 7,708
	0	9,75 ± 0,13	
	24	9,78 ± 0,07	

dp = desvio padrão.

CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida mostrou-se adequado aos parâmetros de validação estabelecidos, estando disponíveis como técnica específica, sensível, precisa, exata e robusta para análise quantitativa de canferitrina em folhas de *B. forficata* L.

REFERÊNCIAS

Andrade S. S., Silva-Lucca R.A., Santana, L.A., Gouvea, I.E., Juliano, M.A., Carmona, A.K., Araujo, M.S., Sampaio, M.U., Oliva, M.L.V. Biochemical characterization of a cysteine proteinase from Bauhinia forficata leaves and its kininogenase activity *Process Biochemistry*, 46,572–578.

Brasil; Resolução RE nº899 de 29/5/2003; Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02/06/2003, seção 1 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

César, I da C.; Braga, F.C.; Vianna-Soares, C.D.; Nunan, E. de A.; Barbosa, T.A.F.; Moreira-Campos, L.M.; *Revista Brasileira Farmacognosia*, 17, 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.

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*, v. 1163, p. 96-104, 2007.

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, 2010.

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

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.

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.

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, 468-475, 2007.

Lopes, G. C.; Sanches, A. C. C. ; Toledo, C. E. M.; Isler, A. C.; 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.

Menezes, F.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.

Petry, R. D.; De Souza, K.C.B.; Bassani, V.L.; Petrovick, P.R.; González Ortega, G.; *Revista Brasileira de Farmácia*, 79, 7-10, 1998.

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*, 2006. Disponível em: <<http://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos/T1483-1.pdf>>. Acesso em: 2. jun. 2009.

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.

Trojan-Rodrigues, M.; Alves 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*, 139,155– 163, 2012.

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

Artigo VI – Avaliação da influência dos métodos extrativos nos teores de canferitrina e flavonóides totais em 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 FOLHAS DE *Bauhinia forficata* Link

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 artigo 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 40°C, agitação a 200 rpm e agitação com aquecimento. A extração com agitação a 200 rpm, aquecimento a 40°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).

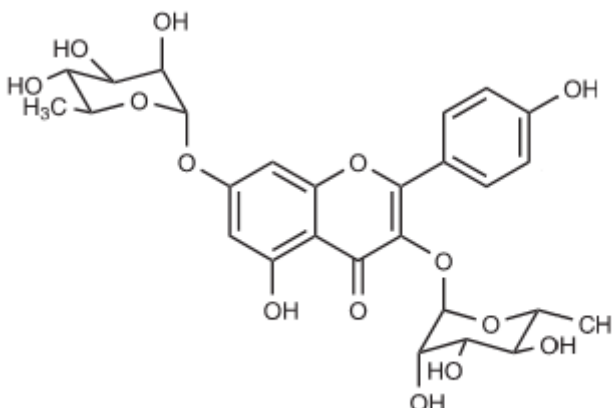
No Brasil, programas oficiais de saúde têm incentivado a exploração e/ou a produção sustentada de espécies medicinais, que vem sendo gradativamente implementados por muitos governos estaduais e municipais (Borgo et al, 2010). Dentre as espécies medicinais relacionadas pelo Ministério da Saúde com grande 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 tem 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 Luferco[®], 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, desgaseificador 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 e em 3 experimentos independentes.

Nos processos extrativos de percolação e maceração, a droga vegetal ficou em contato com o solvente por 7 dias em equipamento correspondente (Silva, 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 (EFS) 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 EFS 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 $AlCl_3$, 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 (Farmacopéia 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, 2010). 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 UV-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). 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 absorvância foi medida a $\lambda = 408 \text{ nm}$. Utilizou-se como branco, a solução extrativa após diluição, sem adição de cloreto de alumínio. O teor de flavonóides foi expresso em quercetina. A capacidade de extrair flavonóides totais foi calculada em função da quantidade total destes na matéria prima vegetal 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 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 canferitrina a 50,0 µg/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 µg/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 C₁₈ Restek® (10 mm × 4mm, 5 µm) e uma coluna C₁₈ Restek® (250 mm x 4,6 mm, 5µm), 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 percentual (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	$11,62 \pm 0,11$	$2,03 \pm 0,02$	$5,09 \pm 0,01$
-----------------	------------------	-----------------	-----------------

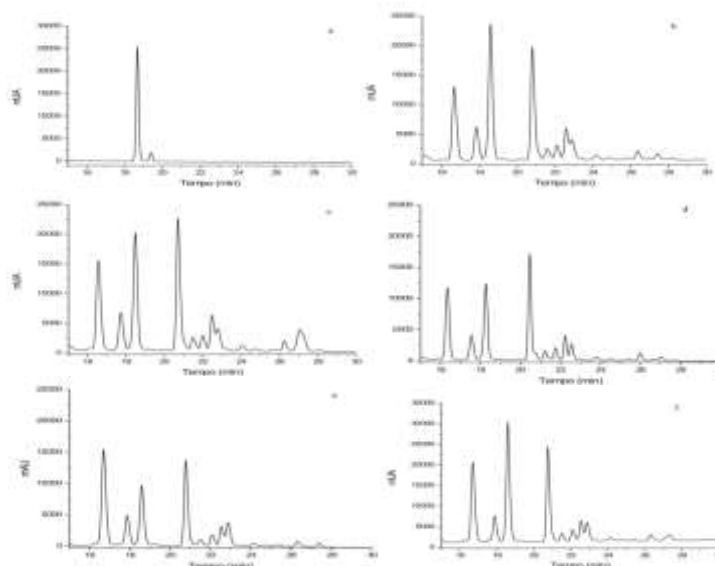
Comparando-se os métodos de extração I a III, que têm em comum a extração sem aquecimento, com os métodos IV e V, que utiliza calor na extração dos metabólitos, o método V mostrou-se o mais eficiente diante dos maiores teores de CNF e flavonóides totais, o que está provavelmente relacionado ao somatório 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

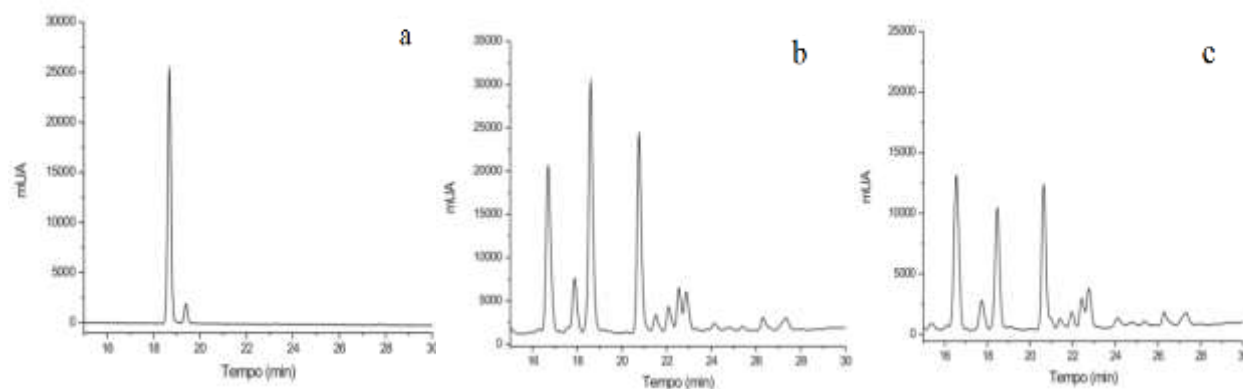
os parâmetros foram verificadas diferenças estatísticas, sendo necessária a análise por CLAE para o monitoramento da CNF.

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

Na avaliação da proporção mp/ms verificou-se que assim como a CNF a quantidade de flavonoides extraídos, aumenta com o 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%.

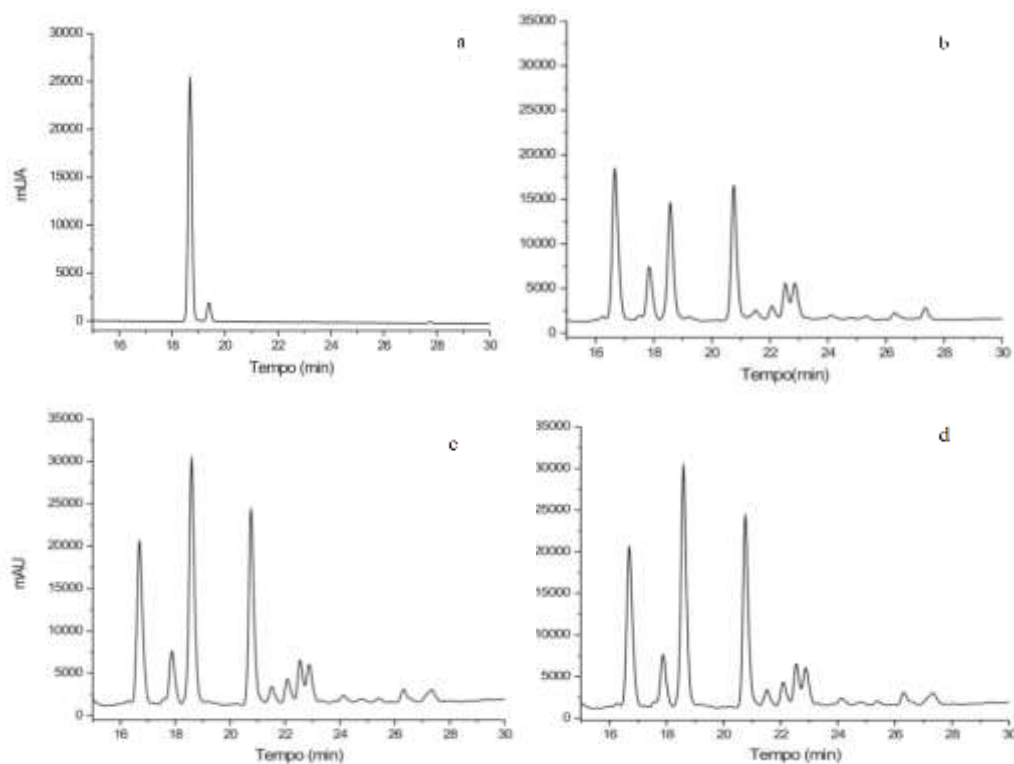
A extração de princípios ativos a partir de insumos vegetais ocorre através da solubilização destes no líquido extrator, neste processo a constante dielétrica tem fundamental importância (Medeiros; Kanis, 2010). Quando analisamos a variação do teor alcóólico na

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 consequente 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 (a), de 50° GL (b) e de 70° GL (c).



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.

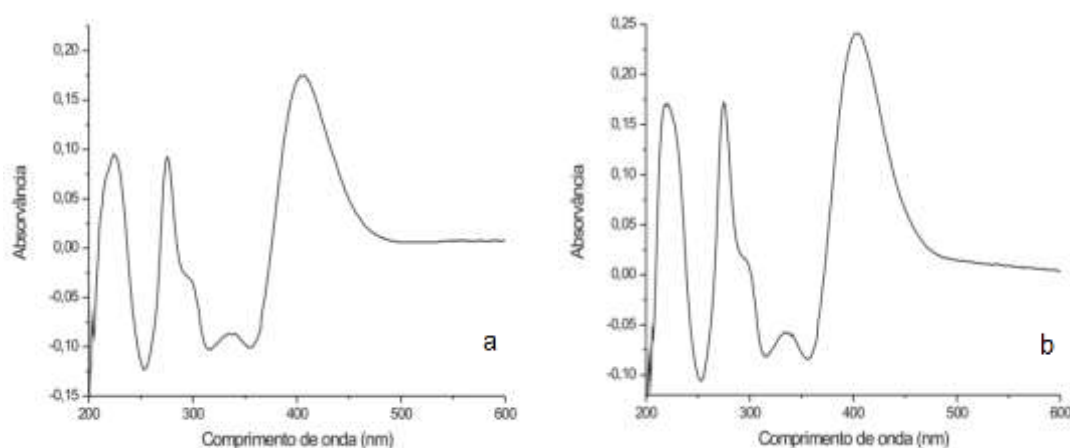
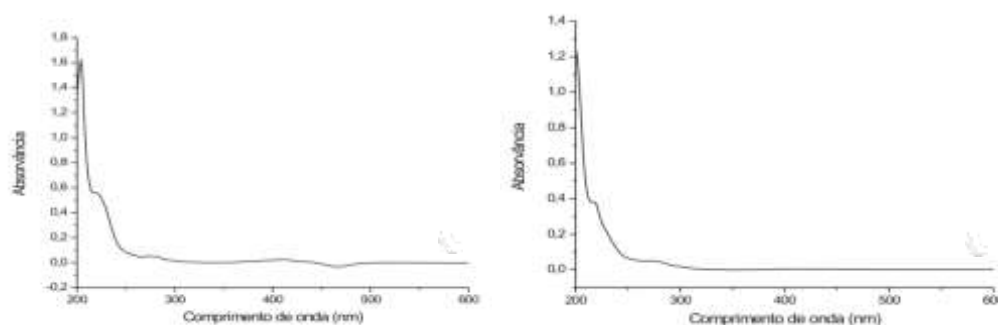


Figura 6 - Espectro de absorção da fração de éter de petróleo obtida por EFS de uma solução extrativa diluída hidroalcoólica 70% (a) e 50% (b) de *B. forficata* L.



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.

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.; Pizzolatti, 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 antifibrinogenolytic 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 Farmacéutica 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.

8. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO SECO

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

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

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* Link, 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 redimentos 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 físicas e 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-vis)

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 Liotop[®] 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).

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

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 $2\theta/s$ e tamanho da fenda $0,02^\circ$.

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.

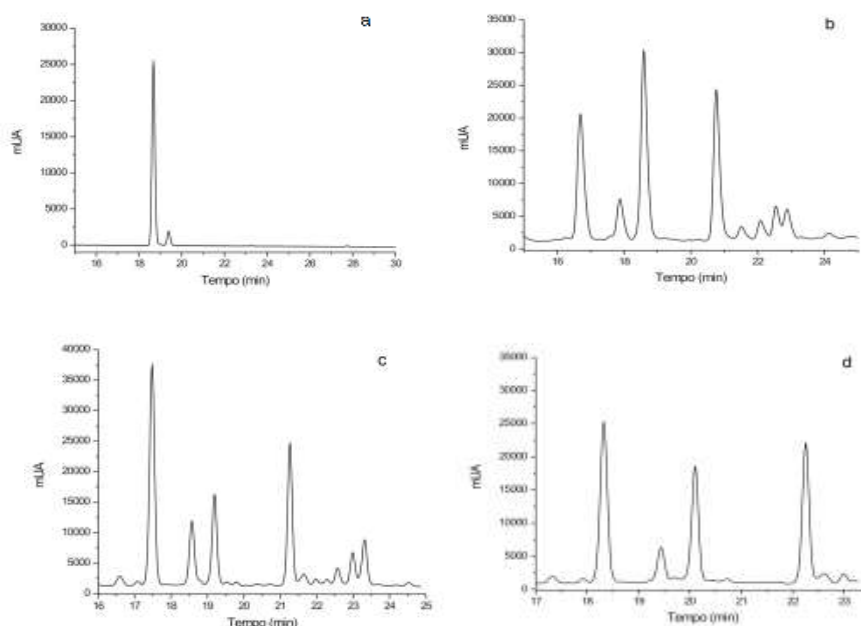
No entanto, a análise estatística mostrou que os métodos de secagem não tiveram efeito significativo sobre os teores flavonoides nas amostras secas, podendo-se inferir que as frações flavonoidicas foram relativamente estáveis durante o processo de secagem.

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

	TFT (mg /mL) $\pm$ dp	Teor de CNF (μg/mL) $\pm$ dp
SE	1,67 $\pm$ 0,01	6,61 $\pm$ 0,03
PSA 20%	1,64 $\pm$ 0,02	8,13 $\pm$ 0,02
PSA 30%	1,66 $\pm$ 0,02	7,75 $\pm$ 0,01
ESL	1,59 $\pm$ 0,01	6,21 $\pm$ 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 (tr) na análise de CLAE dos extratos, foram próximos de 18,64 $\pm$ 0,05 min conforme o tempo de retenção 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).

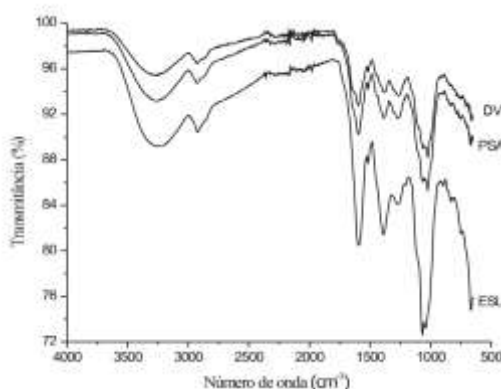
A Figura 2 apresenta os espectros obtidos da droga vegetal (DV), PSA e ESL, onde se evidencia fortes bandas de absorções na região de 3500-3200 cm^{-1} , sugerindo a presença de hidroxilas, absorções na região de 1700-1600 cm^{-1} com bandas alongadas característicos de

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 (CHAVES et al., 2009).

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 ruim 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 (Tabela 3). 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	PSA	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.

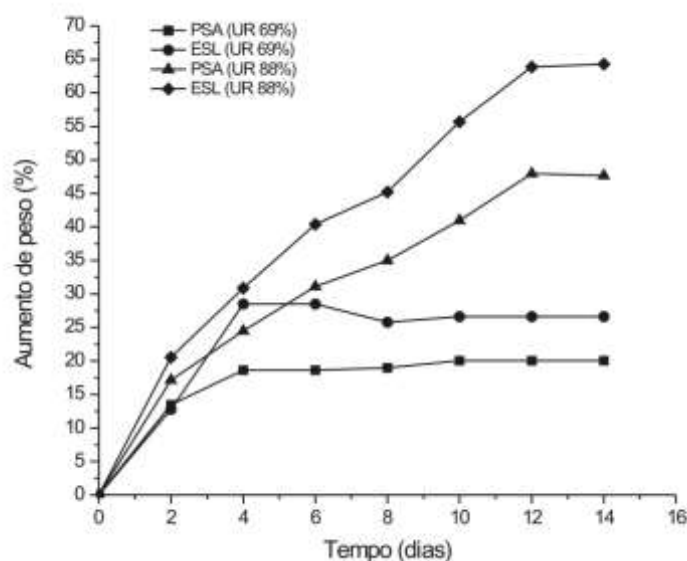
Higroscopicidade e Umidade

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.

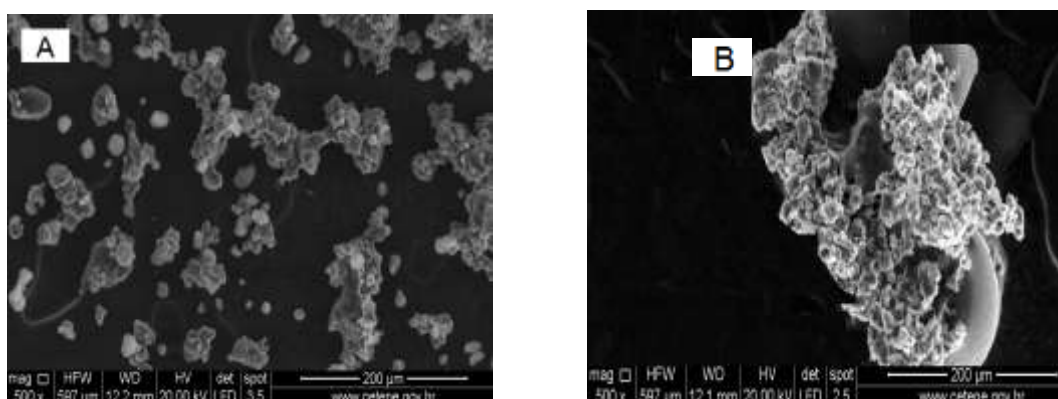
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

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)	Tamanho 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.

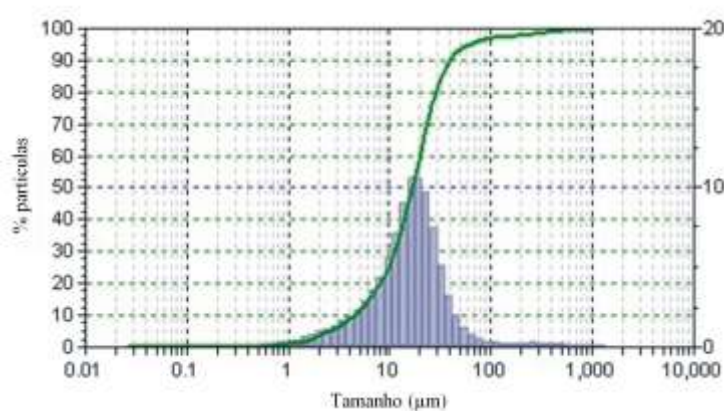
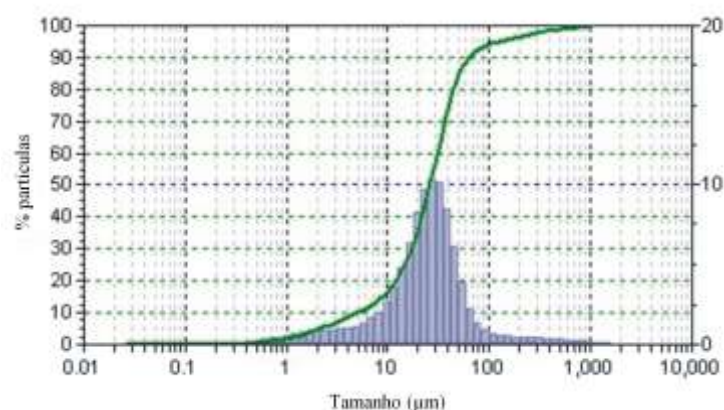


Figura 5 - Distribuição do tamanho de partículas do ESL.

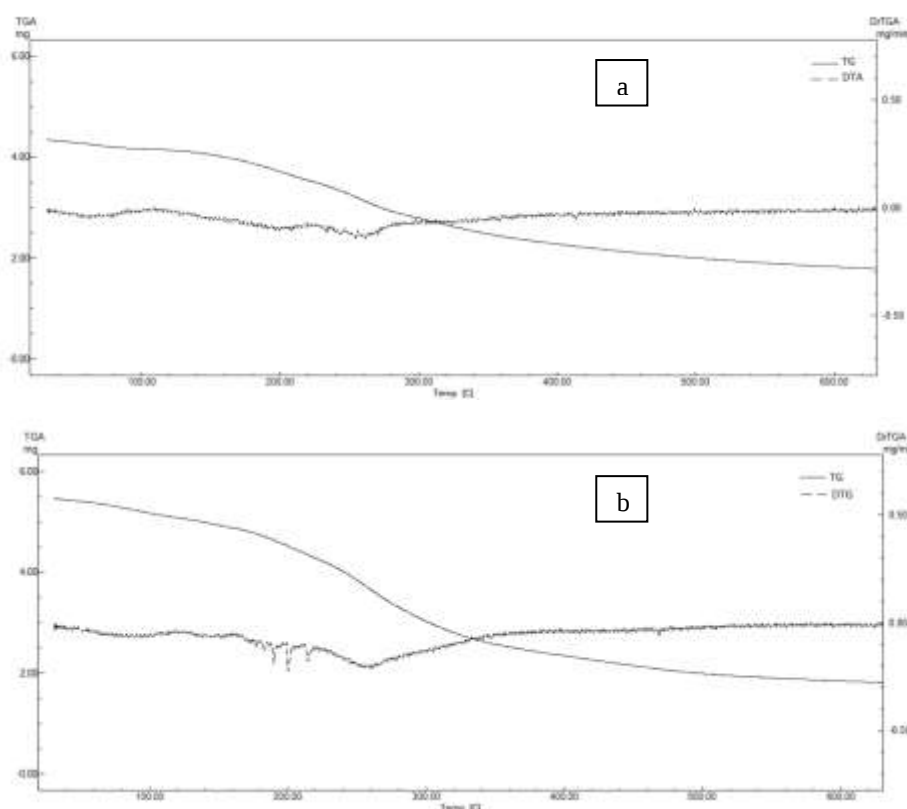


Pode-se observar que o PSA apresentou menor dispersão granulométrica do que o ESL e menor tamanho médio de partícula, propriedade esta vantajosa, visto que partículas pequenas possuem maior solubilidade devido ao aumento da superfície específica, ratificando os resultados anteriores.

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 e substâncias voláteis a 105°. 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.

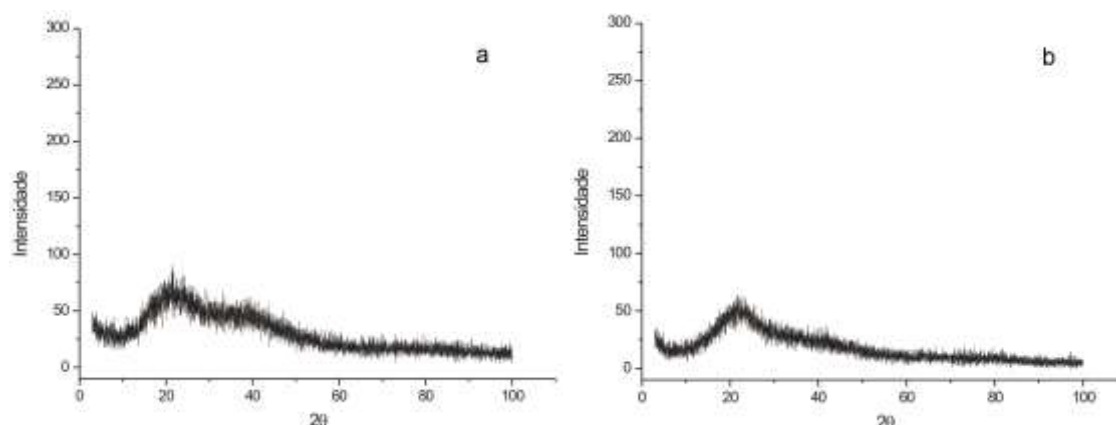
Diante dos resultados anteriores obtidos no ensaio gravimétrico de perda por dessecação para o PSA ($\Delta m = 6,41\%$) e ESL ($\Delta m = 4,52\%$), foi observado que estes valores não estão em concordância com os valores de umidade observados nas curvas de TG que foram de 3,83% para o PSA e 3,05% para 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 física e 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.

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, 5^a. 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 Bioproducts 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.; SOARESA, 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 antioxidante properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril poder. **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.

9. TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA

Artigo VIII – 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

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 camuundongos *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 camundongos 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 camuundongos *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 (SILVA, 1995; FILHO, 2002) observou-se que o extrato bruto por via intraperitoneal possui DL_{50} 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), respectivamente.

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, degaseificador 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°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 ($n = 5/\text{grupo}$) 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.

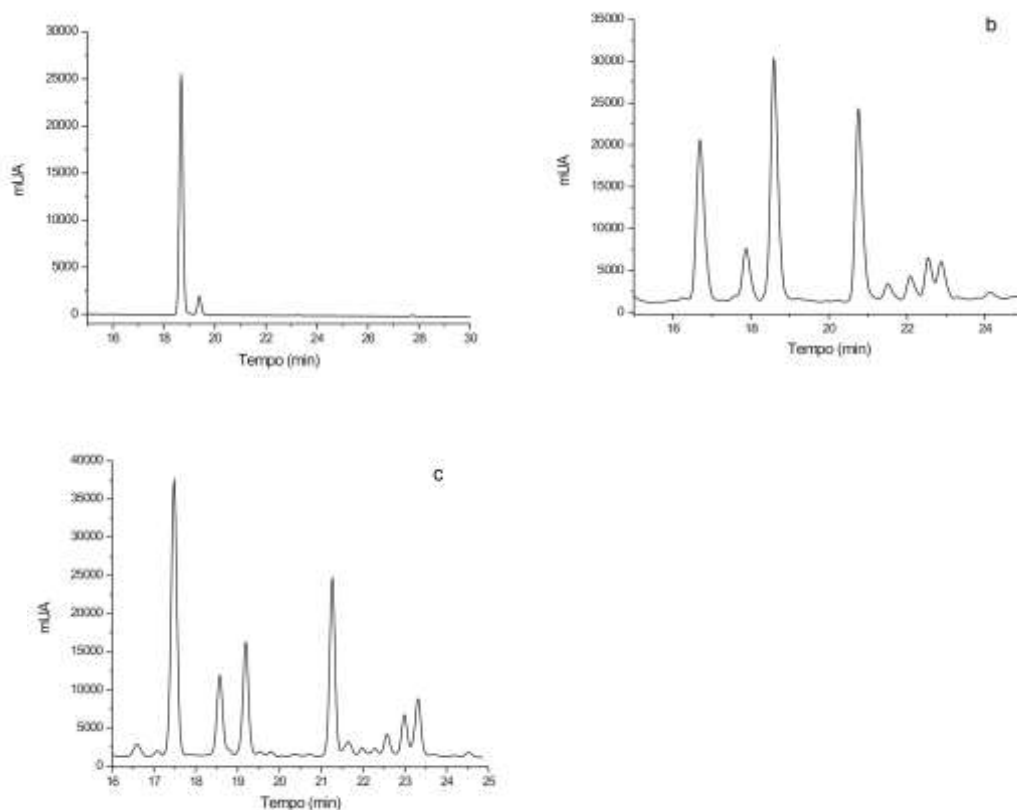
Tabela 1 - Resultados da análise de TFT e CNF no extrato fluido e PSA.

	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.

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).

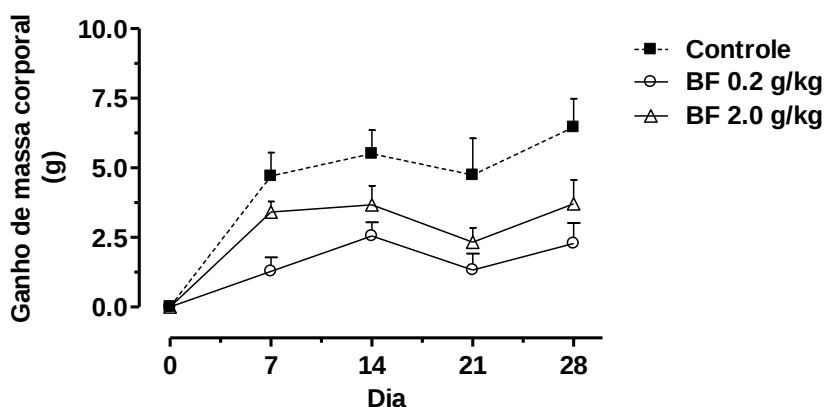


Figura 3 – Curvas de ganho de peso corporal de camundongos machos tratados por via oral com extrato seco por aspersão de Bauhinia forficata Link (BF 0,2 e 2,0 g/kg) por 28 dias consecutivos. Os valores foram expressos como media $\pm$ erro padrão (n= 10/grupo).

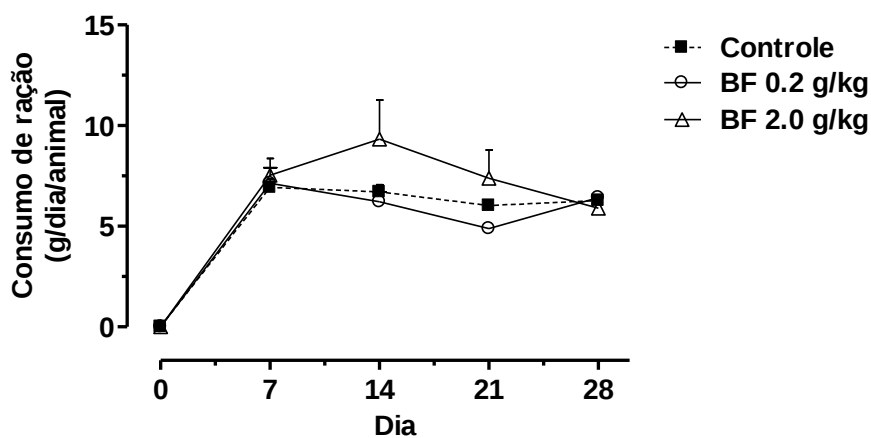


Figura 4 – Curvas de ganho de peso corporal de camundongos machos tratados por via oral com extrato seco por aspersão de Bauhinia forficata Link (BF 0,2 e 2,0 g/kg) por 28 dias consecutivos. Os valores foram expressos como media $\pm$ erro padrão (n= 10/grupo).

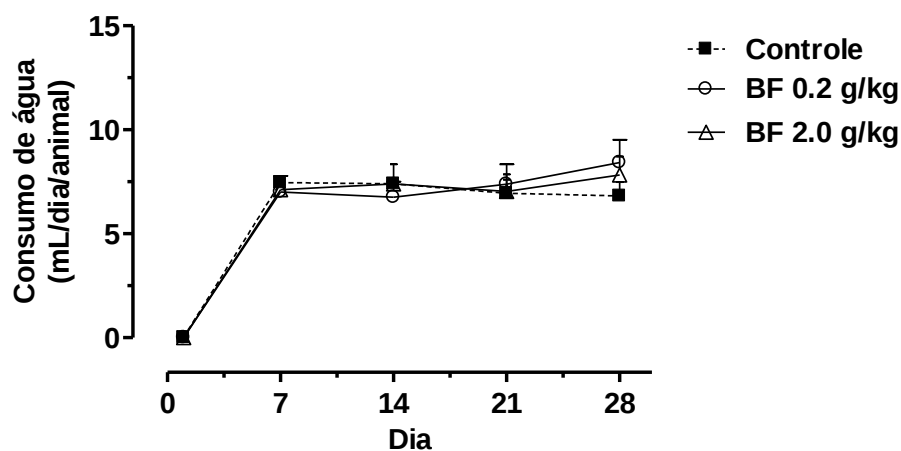


Tabela 1 – Efeito do produto seco por aspersão de folhas de *Bauhinia forficata* Link (BF 0,2 e 2,0 g/kg) por via oral nos parâmetros hematológicos de camundongos machos tratados por 28 dias consecutivos.

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-Habori et 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 leite 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, o 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

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 Medicinais: 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 Medicinais.** 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. Disponíble 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.

10. DESENVOLVIMENTO DA FORMA FARMACÊUTICA

Artigo IX – Desenvolvimento tecnológico de granulados efervescentes a base de extratos de *Bauhinia forficata* link como alternativa no tratamento do diabetes *melittus*

Patente depositada

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE GRANULADOS EFERVESCENTES A BASE DE EXTRATOS DE *Bauhinia forficata* LINK COMO ALTERNATIVA NO TRATAMENTO DO DIABETES MELITTUS

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. Por *Bauhinia forficata* Link ser uma planta de grande interesse pela comunidade farmacêutica, há o interesse em desenvolver métodos, processos e formulações a base deste vegetal para a obtenção de formas farmacêuticas. O objetivo do trabalho foi desenvolver formulação de granulados efervescentes a base de extratos de *Bauhinia forficata* Link como alternativa no tratamento do diabetes *melittus*. O material vegetal utilizado foi identificado e registrado. A solução extrativa obtida foi seca por aspersão e o extrato seco resultante foi utilizado no desenvolvimento da formulação dos granulados efervescentes juntamente com os excipientes. A caracterização e o controle de qualidade dos granulados foram realizados utilizando diversas técnicas tais como: Doseamento por Espectrofotometria Ultravioleta (UV) e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), determinação da umidade, Análise Térmica (Termogravimetria), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise de superfície específica e tamanho de poros, Análise granulométrica a laser, Difração de raios- X e Análises reológicas. Os resultados da análise do granulado comparados aos do produto seco por aspersão (PSA), apresentaram melhores características físicas, químicas e reológicas, o que justifica o desenvolvimento da forma farmacêutica granulada.

Palavras-chave: formulação, fitoterapicos, flavonoides.

ABSTRACT

Bauhinia forficata Link is a native of South America widely used in the treatment of diabetes mellitus due to antidiabetic activity attributed to flavonoid compounds, mainly canferitrina marker, present in the leaves of this plant material. For *Bauhinia forficata* Link is a plant of great interest in the pharmaceutical community, there is interest in developing methods, processes and formulations of this vegetable base for obtaining pharmaceutical forms. The objective was to develop a formulation of granulated effervescent base extracts *Bauhinia forficata* Link as an alternative in the treatment of diabetes mellitus. The plant material was identified and recorded. The extraction solution obtained was spray dried and the resulting dried extract was used in the formulation development of effervescent granules together with excipients. The characterization and quality control of aggregates were performed using various techniques such as: Assay by Spectrophotometry Ultraviolet (UV) and high performance liquid chromatography (HPLC), determination of moisture, thermal analysis (thermogravimetry), Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis of specific surface and pore size, laser particle size analysis, X-ray diffraction and rheological analysis. The results of the analysis of granular compared to the spray dried extract (PSA), showed better physical, chemical and rheological properties, which justifies the development of the pharmaceutical form granules.

Keywords: formulation, herbal products, flavonoids.

INTRODUÇÃO

A grande maioria dos produtos fitoterápicos utilizados na terapêutica hoje foi originada de estudos desenvolvidos a partir da medicina popular que fazem da rica biodiversidade brasileira um vasto campo de pesquisa científica (BRASIL, 2011).

A utilização de plantas para fins terapêuticos é uma prática milenar que acompanha a história da farmácia e dos medicamentos. Cada vez mais, devido à comprovação científica da existência de ações farmacológicas relevantes associadas a excelente relação custo-benefício tornou-se alvo de intensas pesquisas e investimentos por parte da indústria de fitoterápicos e também de incentivos governamentais por exercer papel primordial na atenção primária a saúde (SIANI, 2003; SOUZA, 2009).

Este cenário propiciou a aprovação em 22 de julho de 2006 da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos pelo governo federal e recentemente, a divulgação pelo Ministério da Saúde, da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) que tem como objetivo direcionar a pesquisas científicas na área. Nesta lista, constam 71 espécies vegetais que apresentam potencial para gerar fitoterápicos que poderão ser disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2009).

Dentre as plantas divulgadas na RENISUS, figuram alguns representantes do gênero *Bauhinia*, sendo a *Bauhinia forficata* Link, umas das espécies mais estudadas no Brasil em função do seu amplo uso popular como auxiliar no tratamento da diabetes e também por possuir uma vasta distribuição geográfica (PIZZOLATI et al., 2003 ;VAZ; TOZZI, 2005). Por *Bauhinia forficata* Link ser uma planta de grande interesse pela comunidade farmacêutica, há o interesse em desenvolver métodos, processos e formulações a base deste vegetal para a obtenção de formas farmacêuticas.

Considerando a obtenção de fitomedicamentos, este artigo tem por objetivo o desenvolvimento tecnológico de granulados efervescentes a base de extratos de *Bauhinia forficata* Link como alternativa no tratamento do diabetes *melittus*.

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 n°150 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.

Obtenção do extrato seco

Determinação do Resíduo seco

A determinação do resíduo seco foi realizada seguindo a Farmacopeia Brasileira 5ª edição. Foram obtidas alíquotas de 2 ml do extrato, que foram pesadas e transferidas para pesa-filtros limpos e desengordurados, previamente pesados em balança Bel Engineering[®] e identificados, os quais, após evaporação em banho-maria digital Nova Ética[®] foram colocados em estufa a uma temperatura de 100°C a 105°C por três horas. Após esse período, os pesa-filtros foram colocados em um dessecador até atingirem a temperatura ambiente e só então foram pesados novamente. Em seguida foram recolocados em estufa por mais 30 minutos, repetindo este procedimento até peso constante. O resultado foi expresso em porcentagem sobre o volume, calculado pela média de três determinações.

Secagem por aspersão

Na secagem por aspersão da solução extrativa, foi utilizado um mini *spray-dryer* BUCHI B-290. 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 adjuvante de secagem foi o Aerosil[®], na concentração de 20% em relação ao resíduo seco.

Rendimento do Processo de Secagem

O rendimento bruto da operação de secagem dos extratos secos foi calculado em relação à massa teórica de sólidos totais presentes nas soluções extrativas. Os sólidos totais correspondem ao teor do resíduo seco da solução extrativa, somada ao peso do adjuvante adicionado (SU et al, 2008).

Desenvolvimento da formulação dos granulados efervescentes

Na obtenção tecnológica da formulação, foram utilizados como matérias-primas: o extrato seco por aspersão de *B. forficata*, como insumo ativo, o polivinilpirrolidona (PVP K30), como aglutinante, o ácido cítrico, o ácido tartárico e o bicarbonato de sódio, como promotores de efervescência, e álcool etílico como co-solvente, em diferentes proporções de ativo (40%, 50% e 70%).

Foram manipulados lotes de granulados com peso médio de 4,0 g, contendo entre 40-70% de extrato seco de *B. forficata*, 1-2% de PVP K 30, 6-8% de ácido cítrico, 10-20% de ácido tartárico, 20-30% de bicarbonato de sódio e quantidade suficiente de álcool etílico para a dispersão do aglutinante.

O processo foi realizado utilizando o método de granulação por via úmida. Primeiramente, os componentes da base efervescente (ácido cítrico, ácido tartárico e bicarbonato de sódio) foram pulverizados separadamente e, em seguida, misturados, utilizando um misturador. O extrato seco de *B. forficata* foi adicionado e misturado com a base efervescente. O PVP K30 foi disperso em álcool etílico e vertido sob a mistura contendo o insumo ativo e a base efervescente. A massa formada foi tamisada utilizando com abertura de malha de 850 µm. O granulado foi seco em estufa com fluxo de ar circulante, à temperatura entre 40-50°C, durante 40 min, até a completa secagem, e, em seguida, foi calibrado utilizando uma malha de abertura 500 µm. O granulado obtido foi armazenado em recipiente hermeticamente fechado.

Caracterização dos granulados efervescentes

Doseamento por 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, 2012.

As soluções dos granulados e do Produto Seco por Aspersão (PSA) foi obtida a partir de diluições das soluções-mãe de concentrações baseando-se no resíduo seco de 3,5 %. Alíquotas das foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, onde se adicionaram 2,0 mL de solução etanólica de AlCl_3 (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 flavonoides totais foi expresso em porcentagem (p/p) expresso em quercetina 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 AlCl_3 - quercetina.

Doseamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A curva-padrão foi preparada a partir de solução etanólica de canferitrina a 50 $\mu\text{g/mL}$. 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 curva padrão teve com equação da reta $y = 31140x - 482,87$ e coeficiente de correlação de 0,9986.

O preparo das soluções dos granulados e do PSA para análise por CLAE foi leitura direta da solução mãe de concentrações baseando-se também no resíduo seco de 3,5 %. 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 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 C_{18} Restek® (250 mm x 4,6 mm, 5 μm), mantida a 40°C e protegida por uma pré-coluna C_{18} Restek® (10 mm x 4mm, 5 μm). Os padrões e as amostras foram eluídas 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. Maíque 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

Determinação da umidade

Amostras de 2 g de granulados foram colocadas em pesa-filtros previamente tarados e dessecados. 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.

Análise Térmica

Termogravimetria (TG)

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 100 mL.min⁻¹, razão de aquecimento 10°C.min⁻¹ e num intervalo de temperatura de 25- 600°C. 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.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das superfícies das partículas das amostras foi analisada utilizando-se um microscópio específico, após serem fixadas em fita de dupla face de carbono e metalizadas com ouro por 15 min. As eletromicrografias foram obtidas em uma câmara com tensão de excitação de 10 kV.

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).

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 granulado foi analisado 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.

Difração de raios- X

Os resultados de difração de Raios-X dos granulados e do PSA 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 $2,0 < 2\theta < 90^\circ$, velocidade de digitalização $2\theta/s$ e tamanho da fenda $0,02^\circ$.

Características reológicas

Ângulo de repouso

O ângulo de repouso foi avaliado através da passagem de uma quantidade padronizada de granulados (20 g) em funil de altura fixa (10 cm), com diâmetros superior e inferior de 14 e 1 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).

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

Na determinação da densidade aparente (ρ_a) dos granulados, utilizou-se uma amostra de 20 g e transferidos para uma proveta graduada para medida do volume ocupado pelos granulados. A densidade compactada (ρ_c) foi determinada em equipamento *Tap density Varian*®. Os granulados contido na proveta foi submetido a 10 e 1250 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).

$$FH = \frac{\rho_a}{\rho_c} \quad (4)$$

$$IC = \frac{\rho_c - \rho_a}{\rho_c} \times 100 \quad (4)$$

$$ID = V_{10} - V_{1250} \quad (5)$$

onde: V_{10} = volume do pó após 10 quedas; V_{1250} = volume do pó após 1250 quedas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento da formulação dos granulados efervescente

Entre os granulados obtidos, foi selecionado o lote que apresentou melhor desempenho de efervescência, solubilidade e as melhores características reológicas, o qual possui a seguinte composição: 50% de extrato seco de *B. forficata*, 2% de PVP K 30, 7,5% de ácido cítrico, 15% de ácido tartárico, 25,5% de bicarbonato de sódio e quantidade suficiente de álcool etílico para a dispersão do aglutinante.

Caracterização dos granulados efervescentes

Doseamento por Espectrofotometria Ultravioleta (UV) e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os teores de flavonoides totais e de canferitrina determinados pelas metodologias por UV e por CLAE respectivamente encontra-se descritos na Tabela 2.

A análise estatística mostrou que os métodos de na obtenção do extrato seco e no processo de obtenção dos granulados não tiveram efeito significativo sobre os teores flavonoides, podendo-se inferir que as frações flavonoidicas foram relativamente estáveis durante os processos de secagem.

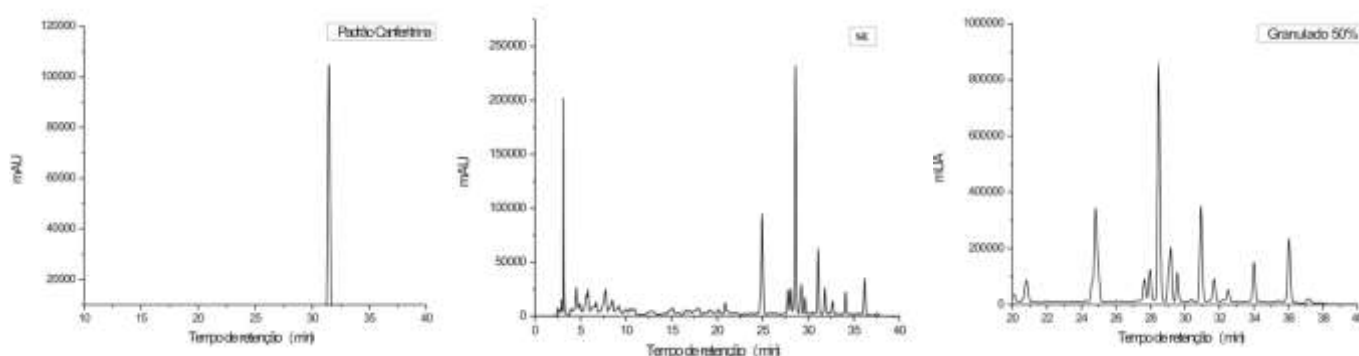
Tabela 2 - Análise de TFT e CNF na SE e Granulados.

	TFT (mg /mL) $\pm$ dp	Teor de CNF (μg/mL) $\pm$ dp
SE	10,73 $\pm$ 0,01	17,25 $\pm$ 0,05
Granulados	12,27 $\pm$ 0,02	26,65 $\pm$ 0,02

Conforme o cromatograma apresentado na Figura 1, observa-se que o SE e os granulados apresentaram perfis químicos semelhantes em relação a presença dos flavonoides, principalmente da CNF, a qual é atribuído a propriedade de marcador farmacológico e químico.

Os tempos de retenção (t_r) na análise de CLAE dos extratos, foram próximos de 31,5 $\pm$ 0,05 min conforme o t_r reportado para a canferitrina.

Figura 1 - Perfil cromatográfico do padrão CNF, SE e Granulados.



Determinação da 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).

Na avaliação da umidade nos granulados, os resultados mostraram valores dentro do preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição, entre o intervalo de 0,5-2,0 % de água.

Análise Térmica

Na Figura 2 encontram-se as curvas TG do PSA, do granulado e dos excipientes da formulação. A curva TG do PSA mostrou quatro eventos de perda de massa nas seguintes faixas de temperatura e percentuais de perda e compostos voláteis: 47-105°C ($\Delta m=4\%$), neste caso podendo ser perda de água; 157-216°C ($\Delta m=14\%$); 254-274°C ($\Delta m=8\%$) e 329-363°C ($\Delta m=10\%$), restando ainda 50% de massa da amostra.

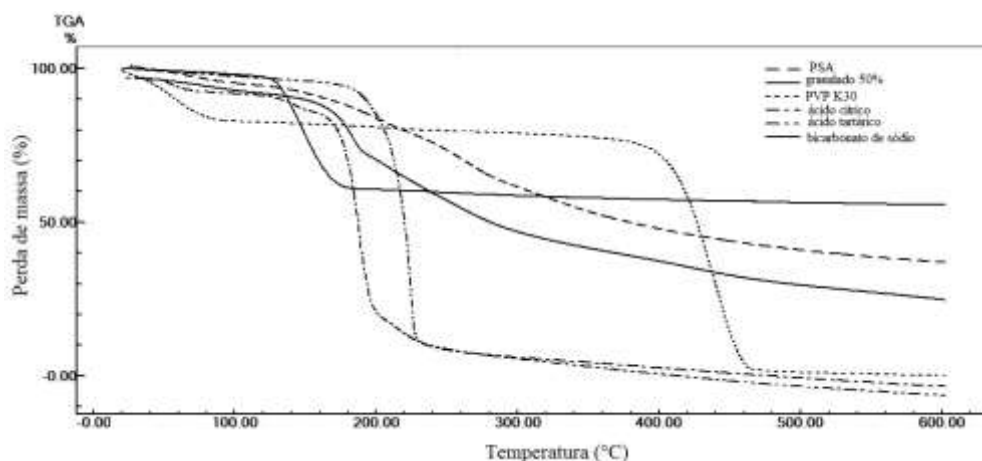
A curva TG do granulado mostrou também quatro eventos de perda de massa nas seguintes faixas de temperatura e percentuais de perda: 52-105°C ($\Delta m=4,6\%$), relacionado à perda de água; 169-190°C ($\Delta m=20\%$); 207-261°C ($\Delta m=24\%$) e 441-449°C ($\Delta m=7\%$).

A curva TG dos excipientes da formulação do granulado (ácido tartárico, bicarbonato de sódio, ácido cítrico, PVP) mostrou diferentes eventos de perda de massa entre os excipientes. O ácido tartárico e o bicarbonato de sódio mostraram apenas um evento de perda de massa nas seguintes faixas de temperatura e percentuais de perda respectivamente: 212-226°C ($\Delta m=85\%$) e 132-169°C ($\Delta m=36\%$). O ácido cítrico mostrou três eventos de perda de massa, perda de água entre 48-64°C ($\Delta m=3\%$), seguidos de dois eventos degradativos entre

133 e 197°C ($\Delta m=73\%$). E o PVP mostrou dois eventos de perdas de massa, perda de água entre 37-78°C ($\Delta m=16\%$) e degradação entre 412-457°C ($\Delta m=75\%$).

Ao comparar o primeiro evento de perda de massa na faixa de 47-105°C do PSA e do granulado, percebe-se que o teor de água no granulado foi menor que o extrato seco, tendo em vista que o percentual de água foi em torno de 4,6% incluindo a umidade dos excipientes, levando-se a concluir que a etapa de secagem no processo de obtenção do granulado foi eficiente, não resultando em massa de água residual.

Figura 2 - Curva TG do PSA, granulado e excipientes obtida na razão de aquecimento de 10° C.min⁻¹, utilizando fluxo de nitrogênio de 100 mL.min⁻¹.

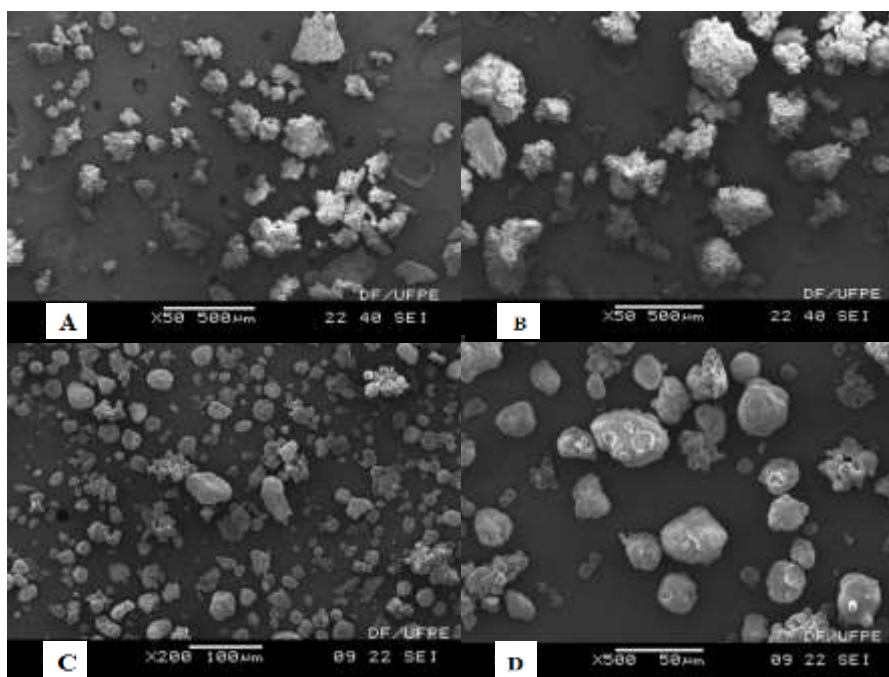


Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica de fármacos constitui um parâmetro de monitoramento capaz de detectar mudanças cristalinas em decorrência de variações no processo de síntese ou mesmo no processamento farmacêutico.

As micrografias das partículas dos granulados e do PSA estão apresentadas na Figura 3. Ambas as amostras apresentaram superfícies esféricas com a presença de diversos aglomerados, sendo as partículas do granulado com propriedades morfológicas que proporciona melhores características reológicas.

Figura 3 - Fotomicrografias do granulado (A e B) e do PSA (C e D). Barras de escala nas figuras equivalem a 500 μm com aumento de 50x e 100 μm , com aumento de 200x respectivamente.



Análise de superfície específica e tamanho de poros

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. O granulado apresentou tamanho de poro de 227 Å e uma área superficial específica 3,2783 m²/g. Considerando o parâmetro molhabilidade das partículas, em virtude do maior tamanho de poros, o granulado apresentou uma melhores características de porosidade frente ao PSA isolado, como verificado na Tabela 3.

Tabela 3 – Determinação da superfície específica e tamanho de poro de granulados.

Amostra	Superfície específica BET (m ² /g)	Volume de poros (cm ³ /Kg)	Volume de microporos (cm ³ /Kg)	Tamanho de poros (Å)
Granulado	3,2783	17,54	5,43	227,00
PSA	44,30	123,54	19,28	111,54

Análise granulométrica a laser

Na avaliação do tamanho de partícula do granulado evidenciou-se um diâmetro médio de 33,64 μm na faixa granulométrica, variando de 7,21 a 76,59 μm (Figura 4). Comparando com a granulometria do PSA (Figura 5), diâmetro médio de 16,83 μm , verifica-se para os granulados tamanhos bem diferenciados e maiores, característicos de grânulos formados por aglomerações de pós.

Figura 4 - Distribuição do tamanho de partículas do granulado.

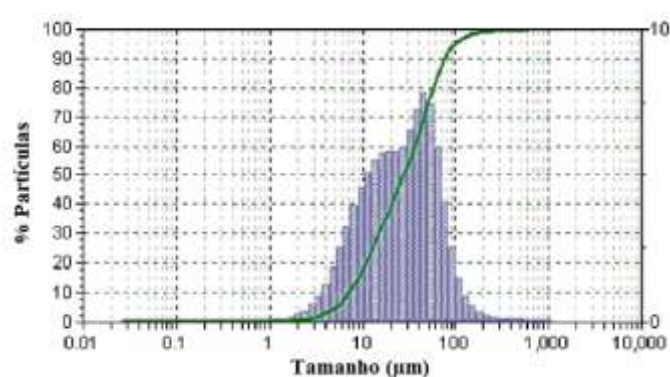
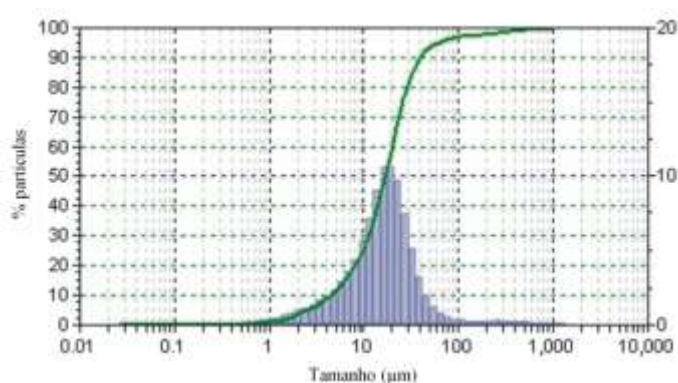


Figura 5 - Distribuição do tamanho de partículas do PSA.

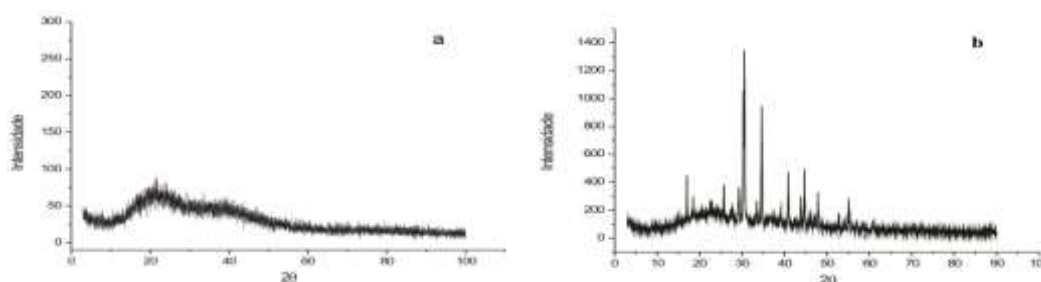


Difração de raios- X

Os difratogramas do PSA e do granulado estão representados na Figura 6. O perfil difractométrico do PSA revela 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. No perfil do granulado, a característica amorfa do extrato seco se repete, mas há a sobreposição dos picos definidos e intensos dos excipientes que estão na formulação e que possui características cristalinas.

Figura 6 – Resultados da difração de raios-X do PSA (a) e do granulado (b).



Características reológicas

Ângulo de repouso

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 (CHAVES et al., 2009).

O resultado obtido na determinação do ângulo de repouso do granulado foi de 0,36 °. Quando o valor do ângulo é menor ou igual a 30°, as partículas apresentam bom escoamento, e se for superior a 40°, poderá apresentar um fluxo ruim. Com relação ao tempo de escoamento, os granulados apresentaram um tempo de escoamento de 2,7 segundos. Pós com tempo de escoamento inferior ou igual a 10 segundos apresentam um bom fluxo (Prista et al., 1997; Nigro & Carazzatto, 1999). Já com o PSA, o produto não apresentou escoamento e o ângulo de repouso foi infinito.

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

Os resultados da caracterização reológica do granulado estão sumarizados na Tabela 4. O granulado apresentou valores inferiores a 20% no IC e 1,25 para o FH, indicativo de

materiais com características de facilidade para a capacidade de escoamento, pois IC e FH medem de forma indireta o fluxo e empacotamento dos pós, quanto menor, melhores serão essas características reológicas (THOMAS; POURCELOT, 1991).

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). O granulado mostrou o ID dentro do especificado, com volume de 6,5 mL.

Porém, diante de todos os resultados, evidencia-se que o produto farmacêutico granulado possui melhores características reológicas que o PSA.

Tabela 4 – Resultados da caracterização reológica do PSA e do granulado.

Parâmetros	PSA	Granulado	Especificações (USP 34)
ρ_a	0,24 g/mL	0,5g/mL	----
ρ_c	0,4 g/mL	0,6g/mL	----
FH	1,68	0,83	<1,25 (facilmente compressíveis)
IC	40,5 %	16,6%	<20%
ID	31 mL	6,5 mL	< 20 mL

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

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, concluímos que o desenvolvimento dos granulados efervescentes a base de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link foi obtido dentro dos parâmetros de qualidade, atendendo aos aspectos físicos, químicos e organolépticos. A obtenção deste produto farmacêutico proporcionará a população diabética uma nova alternativa terapêutica fitomedicamentosa com qualidade, segurança e eficácia.

REFERÊNCIAS

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.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS**, DAF/SCTIE-RENISUS, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da**

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.

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.

CORNEC, M. Aérosil: um adjuvant efficace pour lês formes sèches, liquids et pâteuses. **STP Pharma Science**, v. 6, p. 110-112, 1990.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

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 methods 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.

NIGRO, P.R.A.; CARAZZATTO, R. **A Farmacotécnica das Cápsulas**. Revista Racine, nº 52, 1999. p. 19 – 22.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, p. 466-469, 2003.

PRISTA,L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1997. p.291-297.

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.

SIANI, A.C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica**. 1ed. Rio de Janeiro: Scriptorio, 2003. p.97.

SOUZA, A.P.T.B. et al. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, p. 13-21, 2010.

SOUZA, C. R. F. et al. Antioxidant activity and physical-chemical properties of spray and spouted bed dried extracts of *Bauhinia forficata*. **Brasilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, p. 209-218, 2009.

SU, Y.L., FU, Z.Y., ZHANG,J.Y., WANG, W.M., WANG,H., WANG,Y.C.,ZHANG,Q.J. Microencapsulation of Radix salvia miltiorrhiza nanoparticles by spray dryer. **Powder Technol**, v. 184, p. 114-12, 2008.

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.

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.

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.

11. Conclusão e Perspectivas

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A caracterização fitoquímica e físico-química contribuíram no processo de identificação e padronização de parâmetros de qualidade para a espécie. Pois, observou-se um perfil fitoquímico similar para as amostras vegetais analisadas.

As metodologias analíticas desenvolvidas por espectrofotometria e CLAE para análise quantitativa de flavonóides nas folhas de *B. forficata* Link foram validadas, estando todas disponíveis como técnicas específicas, sensíveis, precisas, exatas e robustas, sendo então aptas para rotina laboratorial e de fundamental importância para as análises realizadas.

Os métodos de extração influenciam diretamente no teor de CNF e o TFT em 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 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 alteração hepática.

O desenvolvimento dos granulados efervescentes a base de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link foi obtido dentro dos parâmetros de qualidade, atendendo aos aspectos físicos, químicos e organolépticos. A obtenção deste produto farmacêutico proporcionará a população diabética uma nova alternativa terapêutica fitomedicamentosa com qualidade, segurança e eficácia.

- Realizar estudo farmacológico pré-clínicos e clínicos dos granulados efervescentes para a determinação da dose na ADF.
- Obtenção de formulações de formas farmacêuticas sólidas ADF que proporcione a incorporação do extrato seco de *B. forficata* L. e o fármaco sintético, através de uma planificação qualitativa e quantitativa de excipientes;
- Desenvolver e validar método para doseamento da forma farmacêutica final por espectroscopia de Ultravioleta (UV) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Realizar estudo de estabilidade das formulações desenvolvidas.

Referências

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DO SETOR FITOTERÁPICO, SUPLEMENTO 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.

Adelmann, J. Própolis: **Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante**. 2005. 186 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2005.

Almeida, M. M. de. **Determinação e quantificação das vitaminas C e E em produtos cosméticos**. 2008. 83 f. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) -- Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, SP, 2008.

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.

Buriol, L. et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009.

Caricati-Neto, A. *et al.* Effects of the aqueous and alcoholic extracts of *Bauhinia forficata* on blood glucose in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 18, 726A, 1985.

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.

César, I. da C. et al. 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, n. 4, p. 616-625, 2007.

Chang, Chia-Chi. et al. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

Chen, X. J. et al. Simultaneous determination of 15 flavonoids in *Epimedium* using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1163, p. 96-104, 2007.

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

DAMASCENO, D.C. et al. Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. **Phytomedicine**, v. 11, p. 196–201, 2004.

Duarte M.R. et al. *Bauhinia variegata*: Diagnose Morfoanatômica e Análise Comparativa entre Exemplos de Regiões Climáticas Distintas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 837-845, 2007.

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.

Fortunato, R.H. Revision del genero *Bauhinia* (Cerdideae, Casalpinoidea, Febaceae) para la Argentina. **Darwiniana**, v. 27, n. 1-4, p. 527-557, 1986.

Funari, C. S.; Ferro, V.O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

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.

Huber, L. S. **Flavonóides**: identificação de fontes brasileiras e investigação dos fatores responsáveis pelas variações na composição. 2007. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.

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.P

Juliane, C. Ação hipoglicemiante da *unha-de-vaca*. **Revista Médica Farmacologia Química e Fisiologia**, Florianópolis, v. 2, p. 165-169, 1929.

Juliane, C.; Ação hipoglicemiante da *Bauhinia forficata* Link. Novos estudos clínicos e experimentais. **Jornal dos Clínicos**, Florianópolis, v. 3, p. 93-112, 1941.

Juliane, C.; Ação hipoglicemiante da *Bauhinia forficata* Link. Novos estudos clínicos e experimentais. **Revista Sudamericana de Endocrinologia, Imunologia e Quimioterapia**, Florianópolis, v. 14, n. 3, p. 326-334, 1931.

Khalil, N.M. *et al.* Free Radical Scavenging Profile and Myeloperoxidase Inhibition of Extracts from Antidiabetic Plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. **Biological Research**, v. 41, p. 165-171, 2008.

Komarova, N. I. *et al.* Quantitative HPLC determination of main flavonoid content of *Rhododendron adamsii* leaves and stems. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 1, 2009.

Lima, J.F. **Estabelecimento da cultura de células de *Bauhinia forficata* Link como fonte de metabólitos bioativos**. 2009. 74p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Produtos Naturais e Sintéticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

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.

Marcucci, M. C.; Woisky, R. G.; Salatino A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v. 46, p. 3-8, 1998.

Martinez-Flórez, S. *et al.* Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

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.

Miyahe, E.T. *et al.* Caracterização Farmacognóstica da Pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n. 1, p. 58-68, 1986.

Müller, S. D. **Determinação de alcalóides e flavonóides através de CLAE e UV de extratos de *Passiflora alata* Curtis, Passifloraceae – Maracujá-doce**. 2006, 91. f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale de Itajaí, Itajaí, MG, 2006.

Muschiatti, L. V.; Martino, V. S. Atividades biológicas dos flavonóides naturais. In: Yunes, R. A.; Cechinel Filho, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Univali, p. 183-207, 2007. 303 p.

Negri, M. L. S. **Secagem das folhas de espinheira-santa – *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. sob diferentes temperaturas e influência nos teores de polifenóis, na atividade**

antioxidante e nos aspectos microbiológicos. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

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**. 81: 191_/197 (2002).

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.

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, 1-7, 2004.

Petry, R. D. ; González Ortega, G. ; Silva, W. B. . Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behaviour of the aluminium chloride - flavonoid complex. **Die Pharmazie**, v. 56, p. 465-470, 2001.

Petry, R. D. *et al.* Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcoólicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, n. 1/2, p. 7-10, 1998.

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.

Pizzolatti, M G. *et al.* Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.

Pozzi, A. C. S. **Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonóides do “maracujá” (*Passiflora alata* e *Passiflora edulis*).** 2007. 73 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) -- Programa de Pós-Graduação em Química Analítica. Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, SP, 2007.

Reimberg, M. C. H. **Estudo de algumas variáveis que interferem na concentração de flavonóides do cultivo de folhas de *Passiflora incarnata* L.** 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) -- Programa de Pós-Graduação em Química Analítica. Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, SP, 2006.

Rolim, A. et al. Total flavonoids quantification from O/W emulsion with extract of Brazilian plants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 308, p. 107-114, 2006.

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.

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, 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.

Simon, B. F. De; Estrella, I.; Hernandez, T. Flavonoid Separation by Capillary Electrophoresis. Effect of Temperature and pH. **Chromatographia**, v. 41, n. 7/8, 1995.

Soares, L. A. L.; Bassani, V. L.; González Ortega, G.; Petrovick, P. R. Total Flavonoid Determination for the Quality Control of Aqueous Extractives from *Phyllanthus niruri* L. **Acta Farmaceutica Boanaerense**, v. 22, n. 3, p. 203-207, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. Rio de Janeiro, 2010.

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, R. F. V. De; Giovani, W. R, F. de. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al (III) and Zn (II) complexes with flavonoids. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 61, p. 1985–1990, 2005.

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.

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.

Xu, X.; Ye, H.; Wang, W.; Chen, G. An improved method for the quantitation of flavonoids in herba leonuri by capillary electrophoresis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 5853-5857, 2005.

Zuanazzi, J. A. S.; Montanha, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2007. cap. 23, p. 577-611.