



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Departamento de Farmácia



ANA LUIZA SEREIA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR  
ELETROFORESE CAPILAR PARA IDENTIFICAÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS DE FRAÇÃO SEMIPURIFICADA  
DE *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae)**

MARINGÁ

2013

ANA LUIZA SEREIA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR  
ELETROFORESE CAPILAR PARA IDENTIFICAÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS DE FRAÇÃO SEMIPURIFICADA  
DE *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (área de concentração - Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S483d Sereia, Ana Luiza  
Desenvolvimento de metodologia analítica por eletroforese capilar para identificação e quantificação de polifenóis de fração semipurificada de *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae) / Ana Luiza Sereia. -- Maringá, 2013.  
96 f. : il. col., figs., quadro, tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013

1. Meliaceae - *Trichilia catigua* A. Juss. 2. *Trichilia catigua* A. Juss. - Desenvolvimento analítico. 3. Eletroforese capilar. 4. Polifenóis. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 21.ed. 583.77

MN-0000797

**ANA LUIZA SEREIA**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR  
ELETROFORESE CAPILAR PARA IDENTIFICAÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS DE FRAÇÃO SEMIPURIFICADA  
DE *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2013

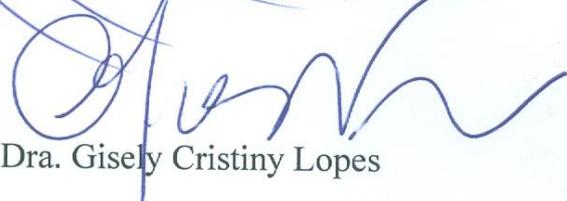
**BANCA EXAMINADORA**



Dr. João Carlos Palazzo de Mello



Dr. Cláudio Celestino de Oliveira



Dra. Gisely Cristiny Lopes

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis” (José de Alencar).

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida e bênçãos concedidas.

Aos meus pais Donizeti e Josiane, e aos meus irmãos Amanda e André, pelas palavras de apoio, incentivo e amor.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de aprendizado e realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello pela orientação, ensinamentos, incentivo e compreensão.

Aos demais docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo conhecimento transmitido.

Aos técnicos, Admir, Cláudio e Fábio pelo auxílio, paciência e ensinamentos extracurriculares.

À doutoranda Renata Longhini e à Ms. Lia A. Ito, pela amizade, companheirismo e contribuição na realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório PALAFITO e do COMCAP, pelo suporte, colaboração e compreensão.

À química Adriana Leandro Santoro, pelo conhecimento técnico transmitido e colaboração no desenvolvimento analítico.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Helena, pela atenção, paciência e suporte.

Aos membros da banca de qualificação e defesa pela disponibilidade e contribuições.

Aos meus amigos, pela compreensão, encorajamento e ajuda.

À Capes pelo suporte financeiro e bolsa concedida durante o período de realização do mestrado.

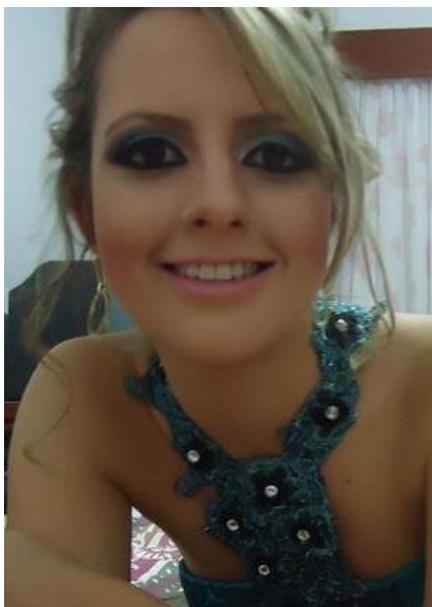
## RESUMO

A espécie *Trichilia catigua* A. Juss., conhecida popularmente como catuaba, destaca-se por apresentar diversas atividades biológicas, como: ação antioxidante, analgésica, vasodilatadora (afrodisíaca), anti-inflamatória e antidepressiva. Considerando o interesse científico e econômico que esta espécie desperta, realizou-se a caracterização físico-química das cascas, extrato bruto (EB) e fração acetato de etila (FAE) de *T. catigua*, além do desenvolvimento e validação de uma metodologia por eletroforese capilar (EC) para separação, identificação e quantificação de polifenóis da FAE. Os ensaios farmacopeicos realizados para controle de qualidade físico-químico das cascas foram: determinação de material estranho (DME), umidade (UMI), cinzas totais (CT), cinzas insolúveis em ácido (CIA), análise granulométrica (AG) e teor de extrativos (TE). Os resultados obtidos foram: DME: 25,9%, UMI: 11,61% ± 0,25 (CV%=2,17), CT: 5,15% ± 0,066 (CV%=1,29), CIA: não quantificáveis, AG:  $d_{50}$  0,237 mm e TE: 25,99% ± 0,87 ( $m\ v^{-1}$ ) (CV%=3,34). As cascas, EB e FAE foram submetidos, ainda, a análises quantitativas para determinação do teor de polifenóis totais (PT), taninos totais (TT) e capacidade antioxidante frente ao radical DPPH ( $IC_{50}$ ). O teor de PT encontrado nas cascas, EB e FAE foram de 9,54% ± 0,24 (CV%=2,50), 42,34% ± 0,27 (CV%=0,63) e 68,86% ± 1,79 (CV%=2,60), respectivamente. O teor de TT foram de 7,07% ± 0,07 (CV%=0,93), 31,42% ± 0,37 (CV%=1,16) e 49,72% ± 2,10 (CV%=4,22), na mesma ordem. O  $IC_{50}$  ( $\mu g\ ml^{-1}$ ) encontrado para o EB e FAE foram de 6,72 ± 0,28 (CV%=4,17) e 4,47 ± 0,07 (CV%=1,58), respectivamente. Para o desenvolvimento da metodologia analítica por EC avaliou-se a influência das variáveis comprimento de onda, voltagem, concentração e pH do tampão borato e uso de ciclodextrinas (CDs) como aditivos. A solução amostra foi submetida à extração em fase sólida. As condições eletroforéticas que propiciaram a separação dos picos da catequina, epicatequina, ácido clorogênico, PB1, PB2, cinchonáinas Ia, Ib, IIa e IIb foram: capilar de sílica fundida de 375  $\mu m$  D.E. x 50  $\mu m$  D.I. com comprimento de 50/60,2 cm, tampão borato 80  $mmol\ l^{-1}$ ; pH 8,80; 2-hidroxiopropil- $\beta$ -CD 10  $mmol\ l^{-1}$ ; 30 kV por 5,7 min, 5 kV por 2 min e 30 kV por 7,3 min a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 1  $mg\ ml^{-1}$ . O método desenvolvido apresentou seletividade e linearidade no intervalo de 20 a 120  $\mu g\ ml^{-1}$  de ácido gálico (padrão interno), repetibilidade de 2,53%, precisão intermediária de 2,92%, exatidão de 100,46%, limite de detecção de 5,19  $\mu g\ ml^{-1}$  e limite de quantificação de 17,29  $\mu g\ ml^{-1}$ . O método não foi robusto nas condições avaliadas. A solução amostra e a solução de ácido gálico apresentaram estabilidade inferior a 72 h, sob temperatura ambiente ou refrigeração. O método desenvolvido é o primeiro que emprega a tecnologia da EC para quantificação de polifenóis em fração semipurificada de *T. catigua*.

## ABSTRACT

The species *Trichilia catigua* A. Juss., popularly known as “catuaba”, shows several biological activities including as an antioxidant, antinociceptive, vasodilator (aphrodisiac), anti-inflammatory and antidepressant. Considering the economic and scientific interest of this species, the physicochemical characterization of the bark, a crude extract (EB) and an ethyl-acetate fraction (FAE) of *T. catigua* was performed, and a methodology using capillary electrophoresis (CE) for the separation, identification and quantification of polyphenols in FAE was developed and validated. The pharmacopeia tests performed for physicochemical quality control of the bark were: determination of foreign matter (DME), water content (UMI), total ash (CT), acid-insoluble ash (CIA), granulometric analysis (AG) and determination of extractives (TE). The results were: DME: 25.9%, UMI: 11.61%  $\pm$  0.25 (CV%=2.17), CT: 5.15%  $\pm$  0.066 (CV%=1.29), CIA: unquantifiable, AG:  $d_{50}$  0.237 mm and TE: 25.99%  $\pm$  0.87 (m v<sup>-1</sup>) (CV%=3.34). The bark, EB and FAE were submitted to quantitative analyses to determine the contents of total polyphenolics (PT) and total tannins (TT), and antioxidant activity using the DPPH scavenging method (IC<sub>50</sub>). The PT contents found in the bark, EB and FAE were 9.54%  $\pm$  0.24 (CV%=2.50), 42.34%  $\pm$  0.27 (CV%=0.63) and 68.86%  $\pm$  1.79 (CV%=2.60), respectively. The TT contents were 7.07%  $\pm$  0.07 (CV%=0.93), 31.42%  $\pm$  0.37 (CV%=1.16) and 49.72%  $\pm$  2.10 (CV%=4.22), in the same order. The IC<sub>50</sub> ( $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) found for EB and FAE were 6.72  $\pm$  0.28 (CV%=4.17) and 4.47  $\pm$  0.07 (CV%=1.58), respectively. For the development of the EC analytical methodology, the influence of the variables wavelength, voltage, concentration and pH of borate buffer and the use of cyclodextrins (CDs) as additives were evaluated. The sample solution was subjected to solid phase extraction. The electrophoretic conditions that enabled the separation of the peaks of catechin, epicatechin, chlorogenic acid, PB1, PB2, and cinchonins Ia, Ib, IIa and IIb were: fused silica capillary of 375  $\mu$ m D.E. x 50  $\mu$ m D.I. with length of 50/60.2 cm, borate buffer 80 mmol l<sup>-1</sup>; pH 8.80; 2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD 10 mmol l<sup>-1</sup>; 30 kV for 5.7 min, 5 kV for 2 min and 30 kV for 7.3 min at 25 °C; injection: 5 s (0.5 psi); detection: 214 nm; FAE: 1 mg ml<sup>-1</sup>. The method thus developed showed selectivity and linearity over the range 20-120  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> of gallic acid (internal standard), repeatability 2.53%, intermediate precision 2.92%, accuracy 100.46%, limits of detection 5.19  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> and limits of quantification 17.29  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. The method was not robust under the conditions evaluated. The sample solution and the gallic-acid solution showed stability below 72 h, at room temperature or under refrigeration. This method is the first to use CE technology for quantification of polyphenols in a semipurified fraction of *T. catigua*.

## NOTA BIOGRÁFICA



Ana Luiza Sereia nasceu em Londrina – PR, no dia 28 de fevereiro de 1987. Em 2004, concluiu o ensino médio no Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná (CEFET-PR), campus Campo Mourão. Em 2006, iniciou o curso de Farmácia pela Universidade Estadual de Maringá e neste período foi bolsista do Programa de Educação Tutorial (PET) da Farmácia (MEC/SESu) e participou do Programa de Iniciação Científica (PIC) sob orientação da Profª Drª Gisely Cristiny Lopes. Realizou estágios em indústria farmacêutica e laboratório de bioequivalência, formando-se em 2010. Em 2011, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello. Atualmente, é professora substituta no Instituto Federal do Paraná, campus Paranavaí, no curso Técnico em Alimentos. Tem participação em artigos nas revistas Acta Scientiarum – Health Sciences (ISSN 1679-9291), The Brazilian Journal of Infectious Diseases (ISSN 1413-8670) e Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (ISSN 0037-8682).

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 A família Meliaceae .....	20
2.2 O gênero <i>Trichilia</i> P. Browne.....	21
2.3 A espécie <i>Trichilia catigua</i> A. Juss. ....	24
2.3.1 <i>Atividades biológicas</i> .....	26
2.3.2 <i>Principais componentes químicos</i> .....	29
2.4 Eletroforese Capilar.....	34
2.5 Validação de metodologia analítica .....	38
3 OBJETIVO .....	40
3.1 Objetivo Geral .....	40
3.2 Objetivos Específicos .....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Matéria-prima vegetal.....	41
4.2 Solventes e reagentes.....	41
4.3 Material e Equipamentos .....	42
4.4 Controle de Qualidade.....	42
4.4.1 <i>Análises físico-químicas</i> .....	43
4.4.2 <i>Análises químicas quantitativas</i> .....	44
4.5 Preparo de extrato bruto e fração acetato de etila .....	46
4.5.1 <i>Extrato bruto (EB)</i> .....	46
4.5.2 <i>Fração acetato de etila (FAE)</i> .....	46
4.6 Desenvolvimento de metodologia analítica por Eletroforese Capilar .....	46
4.6.1 <i>Condições eletroforéticas</i> .....	46
4.6.2 <i>Preparo das soluções de padrões</i> .....	47
4.6.3 <i>Preparo da solução amostra</i> .....	47
4.6.4 <i>Preparo da solução eletrolítica</i> .....	47
4.6.5 <i>Preparo da solução enxágue</i> .....	47
4.6.6 <i>Otimização das condições analíticas</i> .....	47
4.6.7 <i>Determinação dos parâmetros eletroforéticos</i> .....	49
4.7 Validação da metodologia analítica .....	50
4.7.1 <i>Preparo da solução estoque do padrão interno</i> .....	50
4.7.2 <i>Especificidade e seletividade</i> .....	50

4.7.3 Linearidade.....	51
4.7.4 Precisão.....	51
4.7.5 Limite de detecção (LD).....	51
4.7.6 Limite de quantificação (LQ).....	51
4.7.7 Exatidão.....	51
4.7.8 Robustez.....	52
4.8 Estabilidade da solução amostra e da solução do padrão interno .....	52
4.9 Recuperação do procedimento de preparo da amostra e quantificação de polifenóis da FAE de <i>T. catigua</i> .....	53
4.10 Análise estatística.....	53
5 RESULTADOS .....	54
5.1 Controle de Qualidade.....	54
5.1.1 Análises físico-químicas.....	54
5.1.2 Análises químicas quantitativas .....	55
5.2 Desenvolvimento de metodologia analítica por Eletroforese Capilar .....	55
5.2.1 Comprimento de onda ( $\lambda$ ) .....	55
5.2.2 Voltagem.....	56
5.2.3 Concentração do tampão.....	57
5.2.4 pH do tampão .....	59
5.2.5 Tipo e concentração de seletor quiral .....	62
5.2.6 Gradiente de voltagem.....	65
5.2.7 Determinação dos parâmetros eletroforéticos .....	66
5.3 Validação da metodologia analítica .....	67
5.3.1 Especificidade e seletividade .....	67
5.3.2 Linearidade.....	67
5.3.3 Precisão.....	68
5.3.4 Limite de detecção, limite de quantificação e intervalo de quantificação .....	69
5.3.5 Exatidão.....	69
5.3.6 Robustez.....	70
5.4 Estabilidade da solução amostra e da solução do padrão interno .....	70
5.5 Recuperação do procedimento de preparo da amostra e quantificação de polifenóis da FAE de <i>T. catigua</i> .....	71
6 DISCUSSÃO.....	72
6.1 Controle de Qualidade.....	72
6.2 Desenvolvimento de metodologia analítica por Eletroforese Capilar .....	74
6.2.1 Comprimento de onda ( $\lambda$ ) .....	75

6.2.2	<i>Voltagem</i> .....	75
6.2.3	<i>Concentração do tampão</i> .....	76
6.2.4	<i>pH do tampão</i> .....	76
6.2.5	<i>Tipo e concentração de seletor quiral</i> .....	77
6.2.6	<i>Gradiente de voltagem</i> .....	79
6.2.7	<i>Determinação dos parâmetros eletroforéticos</i> .....	79
6.3	<i>Validação da metodologia analítica</i> .....	79
6.3.1	<i>Especificidade e seletividade</i> .....	80
6.3.2	<i>Linearidade e intervalo de quantificação</i> .....	81
6.3.3	<i>Precisão</i> .....	81
6.3.4	<i>Limite de detecção e limite de quantificação</i> .....	82
6.3.5	<i>Exatidão</i> .....	82
6.3.6	<i>Robustez</i> .....	82
6.4	<i>Estabilidade da solução amostra e da solução do padrão interno</i> .....	82
6.5	<i>Recuperação do procedimento de preparo da amostra e quantificação de polifenóis da FAE de <i>T. catigua</i></i> .....	83
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	84
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	85

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Distribuição geográfica de <i>T. catigua</i> A. Juss. no estado do Paraná....	24
2	Folhas e inflorescências de <i>T. catigua</i> A. Juss. (Meliaceae).....	25
3	Aspectos macroscópicos de cascas de <i>T. catigua</i> A. Juss. (Meliaceae)	26
4	Aspectos macroscópicos do pó de cascas de <i>T. catigua</i> A. Juss. (Meliaceae).....	26
5	Medicamento fitoterápico Catuama®.....	27
6	Representação esquemática do sistema de Eletroforese Capilar (EC)..	35
7	Estrutura molecular da $\beta$ -ciclodextrina, metil- $\beta$ -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.....	49
8	Curvas cumulativas de resíduo e passagem após a tamisação da matéria-prima vegetal.....	55
9	Eletroferogramas da FAE de <i>T. catigua</i> com detecção a 200, 214, 254 e 280 nm. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l <sup>-1</sup> ; pH 8,5; voltagem: 20 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); FAE: 500 $\mu$ g ml <sup>-1</sup> ...	56
10	Eletroferogramas da FAE de <i>T. catigua</i> submetida a diferentes voltagens. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol l <sup>-1</sup> ; pH 8,6; voltagem: 15 e 25 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 1 mg ml <sup>-1</sup> .....	57
11	Eletroferogramas da FAE de <i>T. catigua</i> em diferentes concentrações da solução eletrolítica. Condições eletroforéticas: tampão borato 50, 60, 70, e 80 mmol l <sup>-1</sup> ; pH 9,1; voltagem: 18 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 500 $\mu$ g ml <sup>-1</sup> .....	58
12	Eletroferogramas da FAE de <i>T. catigua</i> em diferentes pH da solução eletrolítica. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l <sup>-1</sup> ; pH 9,10; 9,25; 9,35; 9,45; voltagem: 18 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 500 $\mu$ g ml <sup>-1</sup> .....	59
13	Eletroferogramas da FAE de <i>T. catigua</i> em diferentes pH da solução eletrolítica. Condições eletroforéticas: tampão borato 60 mmol l <sup>-1</sup> ; pH 9,10; 9,25; 9,35; 9,45; voltagem: 18 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 500 $\mu$ g ml <sup>-1</sup> .....	60

14	Eletroferogramas da FAE de <i>T. catigua</i> em diferentes pH da solução eletrolítica. Condições eletroforéticas: tampão borato 70 mmol l <sup>-1</sup> ; pH 9,10; 9,26; 9,35; voltagem: 18 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 500 µg ml <sup>-1</sup> .....	61
15	Eletroferogramas da FAE de <i>T. catigua</i> em diferentes pH da solução eletrolítica. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol l <sup>-1</sup> ; pH 8,96; 9,21; 9,29; voltagem: 18 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 500 µg ml <sup>-1</sup> .....	62
16	Eletroferogramas da FAE de <i>T. catigua</i> com diferentes tipos de β-CD na concentração 10 mmol l <sup>-1</sup> . Picos: 1) catequina, 2) epicatequina, 3) procianidina B2, 4) cinchonaína Ia, 5) cinchonaína Ib. Condições eletroforéticas: tampão borato 70 mmol l <sup>-1</sup> ; pH 9,26; voltagem: 20 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 1 mg ml <sup>-1</sup> .....	63
17	Eletroferogramas da FAE de <i>T. catigua</i> com diferentes concentrações de 2-hidroxipropil-β-CD. Picos: 1) catequina, 2) epicatequina, 3) procianidina B2, 4) cinchonaína Ia, 5) cinchonaína Ib. Condições eletroforéticas: tampão borato 70 mmol l <sup>-1</sup> ; pH 9,26; voltagem: 20 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 1 mg ml <sup>-1</sup> .....	64
18	Eletroferogramas da FAE de <i>T. catigua</i> com diferentes gradientes de voltagem. Picos: 1) catequina, 2) epicatequina, 3) ácido clorogênico, 4) procianidina B2, 5) cinchonaína Ia, 6) cinchonaína Ib, 7) cinchonaína IIa, 8) cinchonaína IIb, 9) procianidina B1. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol l <sup>-1</sup> ; pH 8,80; 2-hidroxipropil-β-CD 10 mmol l <sup>-1</sup> ; 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 1 mg ml <sup>-1</sup> .....	65
19	Perfil eletroforético da FAE de <i>T. catigua</i> . Picos: 1) catequina, 2) epicatequina, 3) ácido clorogênico, 4) procianidina B2, 5) cinchonaína Ia, 6) cinchonaína Ib, 7) cinchonaína IIa, 8) cinchonaína IIb, 9) procianidina B1, 10) ácido gálico 120 µg ml <sup>-1</sup> (padrão interno).....	66
20	Representação da curva de calibração do ácido gálico, com coeficiente de determinação (r <sup>2</sup> ) e equação da reta.....	68
21	Separação enantiomérica das cinchonaínas Ia e Ib da FAE de <i>Trichilia catigua</i> por CLAE com coluna quiral.....	80
22	Cromatograma da FAE de <i>T. catigua</i> . Picos: 1) PB2, 2) mistura de catequina e ácido clorogênico, 3) cinchonaína IIb, 4) cinchonaína IIa, 5) epicatequina, 6) mistura de cinchonaínas Ia e Ib.....	80

## LISTA DE QUADROS

QUADRO		PÁGINA
1	Atividade biológica observada em espécies do gênero <i>Trichilia</i> .....	22
2	Substâncias isoladas de extratos de <i>T. catigua</i> A. Juss. (Meliaceae).	30
3	Programação utilizada para análise de amostras por EC.....	46
4	Gradientes de voltagem avaliados no desenvolvimento de metodologia por EC.....	49
5	Parâmetros avaliados para determinação da robustez do método desenvolvido.....	52

## LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
1	Resultados dos ensaios físico-químicos realizados para o controle de qualidade de cascas de <i>T. catigua</i> .....	54
2	Análise granulométrica por tamisação das cascas de <i>T. catigua</i> moídas por moinho de martelos.....	54
3	Teor médio de polifenóis totais e taninos totais encontrados em cascas, EB e FAE de <i>T. catigua</i> .....	55
4	Capacidade antioxidante média encontrada no EB e FAE de <i>T. catigua</i> e substâncias de referência.....	55
5	Tempo de migração e resolução das cinchonaínas Ia e Ib nos diferentes sistemas testados.....	66
6	Parâmetros eletroforéticos do padrão interno e polifenóis da FAE de <i>T. catigua</i> .....	67
7	Parâmetros avaliados para determinação de especificidade da metodologia desenvolvida.....	67
8	Análise estatística do modelo e falta de ajuste na linearidade do ácido gálico.....	68
9	Resultados dos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária do ácido gálico.....	69
10	Limite de detecção, limite de quantificação e intervalo de quantificação do ácido gálico.....	69
11	Concentrações obtidas e exatidão do ácido gálico.....	69

<b>12</b>	Recuperação do procedimento de preparo da amostra.....	71
<b>13</b>	Quantificação de polifenóis da FAE de <i>T. catigua</i> expressos em equivalentes de ácido gálico.....	71
<b>14</b>	Comparação entre o teor médio de polifenóis totais e taninos totais encontrados em cascas, EB e FAE de <i>T. catigua</i> .....	73
<b>15</b>	Comparação entre a capacidade antioxidante média encontrada no EB e FAE de <i>T. catigua</i> .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASR	Atividade de sequestro de radicais
AU	Unidades de absorvância
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCE	Cromatografia capilar eletrosmótica
CCEM	Cromatografia capilar eletrocinética micelar
CD	Ciclodextrina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	Concentração micelar crítica
EB	Extrato bruto
EC	Eletroforese capilar
ECG	Eletroforese capilar em gel
ECZ	Eletroforese capilar de zona
EM	Espectrometria de massas
FAE	Fração acetato de etila
FDM	Fração diclorometano
FEO	Fluxo eletrosmótico
FIC	Focalização isoelétrica capilar
ICH	International Conference on Harmonisation
D.I.	Diâmetro interno
ITFC	Isotacoforese capilar
D.E.	Diâmetro externo
PALAFITO	Laboratório de biologia farmacêutica
PB2	Procianidina B <sub>2</sub>
PC1	Procianidina C <sub>1</sub>
SDS	Dodecil sulfato de sódio

## 1 INTRODUÇÃO

Há milhares de anos, a natureza tem sido utilizada como uma abundante fonte de agentes medicinais, compostos bioativos e protótipos de novos fármacos com potencial econômico. Neste contexto, o Brasil é um país que se destaca mundialmente por sua biodiversidade rica em espécies vegetais, muitas delas empregadas como alvos em investigações farmacológicas. O conhecimento popular aliado a estudos criteriosos são indispensáveis para garantir a eficácia, segurança e qualidade, ampliar a variedade de fitoterápicos ou fitomedicamentos disponíveis no mercado e estimular parcerias com prefeituras e indústrias farmacêuticas, já que estes medicamentos podem ser obtidos a menor custo e são bem aceitos pela população (DELAPORTE et al., 2001; RODRIGUES; CARLINI, 2002; GOMES, 2007; VALMORBIDA, 2007; YUNES; CECHINEL FILHO, 2012).

Além do Brasil, outros países como os Estados Unidos, Alemanha, Índia e China fazem uso de medicamentos derivados de drogas vegetais. Desta forma, é crescente o rigor na padronização e controle de qualidade desses produtos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2012).

Amplo esforço tem sido feito para o desenvolvimento de métodos analíticos adequados para o controle de qualidade de drogas vegetais utilizadas como matérias-primas, objetivando sua identificação e quantificação dos principais marcadores químicos, responsáveis ou não pela atividade farmacológica (BELTRAME et al., 2004; DAOLIO et al., 2008). Ainda assim, maiores investimentos em pesquisa e desenvolvimento nesta área são necessários, principalmente no Brasil (YUNES; CECHINEL FILHO, 2012).

Em relação à espécie *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae), conhecida popularmente como catuaba, os métodos comumente utilizados são por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e CLAE acoplada à espectrometria de massas (EM), todavia, além de apresentarem um longo tempo de análise, os cromatogramas e espectros gerados costumam apresentar muitos picos sobrepostos, o que impossibilita a análise quantitativa dos extratos (BELTRAME et al., 2004; KLETTER et al., 2004; BELTRAME et al., 2006; DAOLIO et al., 2008; MARTINELLI, 2010; LONNI et al., 2012; LONGHINI et al., no prelo, 2013).

Comparada aos outros métodos analíticos, a eletroforese capilar (EC) apresenta as vantagens de ser mais rápida, eficiente, simples (fácil automatização) e com menor custo operacional. Ainda assim, nenhum relato que empregue esta técnica analítica para avaliação de extratos e frações semipurificadas de *T. catigua* foi encontrado na literatura, até o presente momento.

Diversos estudos que avaliam as propriedades farmacológicas do extrato bruto (EB) e da fração acetato de etila (FAE) de *T. catigua* estão em andamento nos Departamentos de

Farmácia, de Farmacologia e Terapêutica e de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, e dos Departamentos de Farmacologia e Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, bem como outras avaliações junto ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina. Desta forma, faz-se necessário o controle de qualidade da matéria-prima vegetal bem como o desenvolvimento e validação de uma metodologia rápida e exata por EC para avaliação da autenticidade e controle de extratos e frações de *T. catigua* utilizados nesses estudos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A família Meliaceae

Pertencente à divisão Angiospermae e ordem Rutales, a família Meliaceae é constituída por 46 gêneros e 559 espécies (THE PLANT LIST, 2010) distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América (LAWRENCE, 1951; JOLY, 1975; CRONQUIST, 1981). No Brasil, são encontrados representantes de oito gêneros, 84 espécies e 15 subespécies (SAKURAGUI et al., 2012), destacando-se os gêneros *Cedrela*, conhecido como cedro ou cedro-rosa, *Carapa*, popular andiroba na região amazônica, *Trichilia* e *Guarea*, conhecidos indistintamente como canjeranas na mata tropical (JOLY, 1975; SAKURAGUI et al., 2012).

Comparada a outras famílias de tamanho similar, a Meliaceae possui ampla diversidade morfológica de flores, sementes e frutos. Em geral, são arbustos ou árvores com até 30 metros de altura, madeira perfumada (LAWRENCE, 1951; PENNINGTON, 1981; PASTORE, 1997) e células secretoras de resinas nas folhas, córtex e cascas. Estas, geralmente são rígidas e de sabor amargo e adstringente, algumas vezes silicificadas e com segmentos apresentando perfurações simples. Os elementos traqueais são imperfuráveis e septados em muitas espécies (CRONQUIST, 1981). As folhas são grandes, alternadas ou opostas, geralmente agrupadas nas pontas dos ramos, pinadas ou bipinadas, compostas, trifoliadas ou unifoliadas, com crescimento apical e estômatos anomocíticos. Não possuem estípulas e podem apresentar pontuações, linhas translúcidas ou púlvinos na base. As inflorescências são do tipo: axilar, terminal, cauliflora ou extra-axilar, em tirso, panículas ou racemos. As flores são geralmente pequenas, diclamídeas, bissexuais ou unissexuais, com simetria radial, 4 a 5 meras e cálice raso com 3 a 5 lóbulos. As pétalas (4 a 7) podem apresentar-se alternadas com as sépalas, coalescentes ou adnatas ao tubo estaminal. O número de estames pode ser igual ou o dobro do número de pétalas. Os filetes encontram-se geralmente unidos em forma de tubo e as anteras, em número de 5 a 10, apresentam-se presas na borda ou na face interna do tubo estaminal, inclusas ou expostas na extremidade dos filetes. O nectário é intraestaminal ou ausente. O ovário é livre, com 4 a 5 carpelos, 3 a 5 lóculos 1, 2 ou multiovulados. Os óvulos são colaterais, superpostos ou seriados. A maioria das sementes são pequenas e secas, aladas ou não, e os frutos, em geral, são secos tipo cápsula, baga ou drupa (LAWRENCE, 1951; JOLY, 1975; CRONQUIST, 1981; PENNINGTON, 1981; PASTORE, 1997).

Quimicamente, a família apresenta óleos essenciais, alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides, cumarinas, esteroides, sesquiterpenos e tetranortriterpenos conhecidos como limonoides ou meliacinas (CRONQUIST, 1981; CHASE et al., 1999; LAGOS, 2006;

MATOS, 2006; PAIVA et al., 2006; RESENDE, 2007; VALMORBIDA, 2007; AKHTAR et al., 2008; GOUVÊA et al., 2008; NEBO, 2008; NAYAK et al., 2010).

Embora com pouca importância doméstica (LAWRENCE, 1951), as meliáceas destacam-se pela sua importância ecológica e econômica, podendo ser utilizadas como fontes de madeira (como o mogno, ébano ou maógani) (JOLY, 1975; CRONQUIST, 1981), corantes e óleos essenciais. Além da *Trichilia*, outros gêneros como *Guarea*, *Aglaia*, *Carapa*, *Turraea* e *Cedrela* apresentam atividades biológicas, como: inseticida, antiparasitária, anti-inflamatória, imunomodulatória, antirreumática, antiúlcera, cicatrizante, antioxidante, entre outras (BRAY et al., 1990; MACKINNON et al., 1997; NUNES et al., 2003; OMAR et al., 2003; LAGOS, 2006; MATOS, 2006; SHI et al., 2006; PAIVA et al., 2006; RESENDE, 2007; VALMORBIDA, 2007; AKHTAR et al., 2008; GOUVÊA et al., 2008; NEBO, 2008; LIMA et al., 2009; NAYAK et al., 2010).

## 2.2 O gênero *Trichilia* P. Browne

Este gênero foi descrito por Browne em 1756 e possui 71 espécies (THE PLANT LIST, 2010) distribuídas na região tropical da América, África e Indo-Malaia (PENNINGTON, 1981). No Brasil, existem 47 espécies e 7 subespécies (SAKURAGUI et al., 2012). No Paraná, são encontradas 7 espécies [*T. casaretti* C. DC., *T. catigua* A. Juss., *T. clausenii* C. DC., *T. pallens* C. DC., *T. pallida* Sw., *T. pseudostipularis* (A. Juss.) C. DC. e *T. silvatica* C. DC.] e 2 subespécies [*T. elegans* A. Juss, subsp. *elegans*, *T. lepidota* subsp. *schumanniana* (Harms) T.D. Penn.] (PATRÍCIO; CERVI, 2005).

Os representantes desse gênero são árvores ou arvoretas com folhas pinadas, trifoliadas ou unifoliadas. As flores são normalmente unissexuais, em tirso ou panículas axilares. O cálice é geralmente raso, com 4 a 6 lóbulos ou sépalas livres seguidas de 4 a 6 pétalas livres ou parcialmente unidas, imbricadas ou valvadas. Os filetes estão unidos parcial ou totalmente em forma de tubo. As anteras (5 a 10) podem estar inseridas no tubo estaminal ou no ápice dos filamentos. O nectário está em torno da base do ovário ou ausente. O ovário possui 2 a 3 lóculos com 1 ou 2 óvulos colaterais ou superpostos. As sementes são carnosas, cercadas por um aro carnudo ou fino. O fruto é do tipo cápsula loculicida com 2 ou 3 valvas (PENNINGTON, 1981; PASTORE, 1997).

Muitas espécies do gênero *Trichilia* destacam-se por possuírem atividade biológica, principalmente inseticida. Alguns dos estudos que comprovam essas atividades encontram-se resumidos no Quadro 1.

**Quadro 1.** Atividade biológica observada em espécies do gênero *Trichilia*

<b>Espécie</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referência</b>
<i>T. americana</i>	Atividade tóxica e antialimentar sobre a lagarta de cereais <i>Spodoptera litura</i> .	WHEELER; ISMAN, 2001
<i>T. casaretti</i>	Atividade antimicrobiana sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , atividade citotóxica sobre o microcrustáceo <i>Artemia salina</i> Leach e indícios de atividade antitumoral.	FIGUEIREDO, 2010
<i>T. claussenii</i>	Atividade tóxica sobre larvas e pupas da lagarta <i>S. frugiperda</i> e atividade anti-helmíntica <i>in vitro</i> contra nematódeos gastrointestinais de ovelhas.	MATOS et al., 2006 NEBO, 2008; CALA, 2010 CALA et al., 2012
<i>T. elegans</i>	Atividade inseticida sobre larvas e pupas da lagarta <i>S. frugiperda</i> .	MATOS et al., 2006 MATOS et al., 2009
<i>T. emetica</i>	Atividade inibitória da biossíntese de ciclooxygenase e prostaglandina e atividade antifúngica sobre cepas de <i>Candida glabrata</i> .	MCGAW et al., 1997 KOLACZKOWSKI et al., 2009
<i>T. glabra</i>	Atividade anticomplementar e imunomodulatória <i>in vitro</i> .	BENENCIA; COULOMBIÉ, 1998
<i>T. pallens</i>	Atividade inseticida sobre lagartas e larvas de <i>S. frugiperda</i> .	BOGORNI; VENDRAMIM, 2003
<i>T. pallida</i>	Atividade inseticida sobre lagartas de <i>S. frugiperda</i> , atividade acaricida sobre o ectoparasita <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e atividade antifúngica.	BOGORNI; VENDRAMIM, 2003; AMARO, 2007 PINTO et al. 2010
<i>T. pleena</i>	Atividade antifúngica.	FICKER et al., 2003
<i>T. quadrijuga</i>	Atividade antimicrobiana sobre cepas de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> .	RODRIGUES, 2009
<i>T. rubescens</i>	Atividade antimalária sobre a forma intraeritrocitária de <i>Plasmodium falciparum</i> .	KRIEF et al., 2004; KRIEF et al., 2006
<i>T. silvatica</i>	Atividade antimicrobiana sobre cepas de <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> e <i>Streptococcus mutans</i> e indícios de atividade antitumoral.	FIGUEIREDO, 2010

Fitoquimicamente, diversos metabólitos secundários derivados principalmente da rota biossintética dos terpenos foram isolados do gênero *Trichilia*. Essa rota envolve vários passos reacionais e leva a diferentes classes de terpenoides. Dentre essas, destacam-se os sesquiterpenos, triterpenos e tetranortriterpenos, que podem estar relacionados com a atividade inseticida (AKHTAR et al., 2008; SOUZA, 2008; MATOS et al., 2009; RODRIGUES, 2009; FIGUEIREDO, 2010).

Souza (2008) identificou os sesquiterpenos:  $\beta$ -elemeno, aromadendreno, germacreno D, elemol, ledol, espatulenol, óxido de cariofileno e veridiflorol no óleo essencial de *T. casaretti*. Entre os constituintes isolados desta espécie, incluem-se o sesquiterpeno aromadendrano-4 $\beta$ ,10 $\alpha$ -diol, os diterpenos 8-epi-esclareol (SOUZA, 2008) e fitol, os triterpenos lupeol, 24-metilenocicloartano-12-oxo-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ -diol, 24-metilenocicloartano-3 $\beta$ -22-diol, trichiliol, 24,25-diidroxicicloart-22-enol e 22-hidroxicicloart-24-enol, os esteroides  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, estigma-5,20(22)-dien-3 $\beta$ -ol e itesmol e a cumarina escopoletina (FIGUEIREDO, 2010).

O sesquiterpeno criptomeridiol, os triterpenos 24-metileno-26-hidroxicicloartan-3-ona,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, lupeol, lupenona, os esteroides  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol, sitostenona (MATOS, 2006), 24-metileno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22 $\alpha$ -triidroxi-colesterol, 3- $\beta$ -O-

$\beta$ -D-glucopiranosil sitosterol (CALA, 2010) e os ácidos  $\omega$ -fenil alcanóicos e alquenóicos (NEBO, 2008) foram isolados de sementes e folhas de *T. clausenii*.

O pentanortriterpenoide trijugin C, a pregnana  $3\beta,4\alpha$ -dihidroxipregnan-16-ona (ZHANG et al., 2003) e os limonoides  $\Delta^{8,14}$ -2-hidroxi-6-deoxiswietenina e trichiliton A foram encontrados em raízes e folhas de *T. connaroides* (FANG et al., 2010).

Os frutos de *T. elegans* forneceram os limonoides  $11\beta$ -acetoxiobacunona, 1,2-diidro-1 $\alpha$ -acetoxi- $11\beta$ -acetoxi-14,15-epoxicneorina (NEBO, 2008), a mistura dos esteroides estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, sitostenona, campesterol e 3- $\beta$ -O- $\beta$ -D-glucopiranosil sitosterol e as cumarinas escoporona, escopoletina, umbeliferona, 6,7-dimetoxicumarina, 6-metoxi-7-hidroxycumarina e 7-hidroxycumarina (MATOS, 2006; MATOS et al., 2009).

Os limonoides 3,7-di-O-acetil-14,15-deoxihavanense, 1,7-di-O-acetil-14,15-deoxihavanense, azadirona e  $\gamma$ -hidroxibutenolida, foram obtidos a partir de folhas de *T. havanensis* (RODRIGUEZ, 2003).

O óleo essencial da *T. pallida* teve 13 substâncias identificadas, sendo: naftaleno,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -elemeno, cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\gamma$ -muuroleno, viridifloreno,  $\alpha$ -selineno,  $\Delta$ -cadineno, germacreno B, 10-epi- $\gamma$ -eudesmol e 1-epi-cubenol (TISSOT, 2008).

Caules e folhas de *T. quadrijuga* apresentaram os sesquiterpenos quadrijugol, kuditiol e espatulenol, os triterpenos bourjotinolona B, nilocitina, piscidinol e diidronilocitina e os esteroides  $3\beta,4\beta$ -dihidroxipregnan-16-ona,  $\beta$ -sitosterol, 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil itesmol, estigmasterol e  $2\beta,3\beta,4\beta$ -trihidroxipregnan-16-ona (RODRIGUES, 2009; RODRIGUES et al., 2009).

Os limonoides trichirubina A e B foram extraídos e identificados de folhas de *T. rubescens* (KRIEF et al., 2004 e 2006).

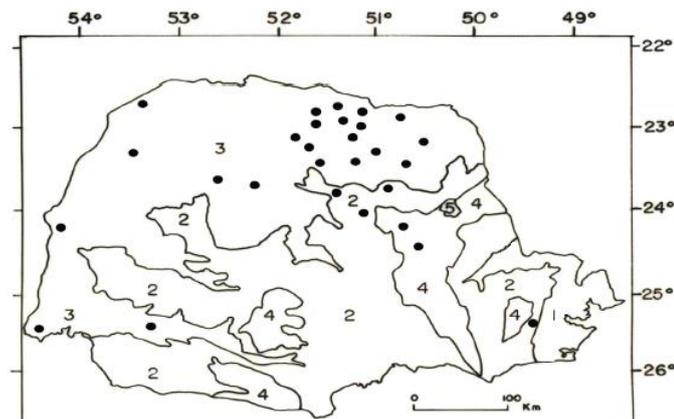
O  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e escopoletina também foram isolados da *T. silvatica*, além dos sesquiterpenos ambrosanoli-11,10-diol (FIGUEIREDO, 2010), espatulenol, veridiflorol, óxido de humuleno, (2,3,6,7)-humuleno-2,3;6,7-diepóxido, mustacona, os triterpenos  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, pseudotaraxasterol e lupeol, o ácido graxo palmitato de etila e a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol). Os sesquiterpenos  $\delta$ -elemeno, isoledeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -gurjeneno; aromadendreno,  $\alpha$ -humuleno, aloaromadendreno, germacreno D, biciclogermaceno, germacreno A,  $\delta$ -cadineno, elemol, germacreno B e  $\delta$ -cadinol foram identificados no óleo essencial dessa espécie (SOUZA, 2008).

Os diterpenos (1,3,7,11,12)-dolabella-3,7,18-trien-17-ácido óico, (1,3,6,7,11,12)-dolabella-3,7,18-trien-6,17-olida e (1,3,4,7,11,12)-3-hidroxi-dolabella-7,18-dien-4,17-olida, foram extraídos da *T. trifolia* (RAMÍREZ et al., 2000) e os cetosteroides trichilasterona A ( $3\beta$ -hidroxipregnan-2,16-diona) e trichilasterona B (2-hidroxiandrost-1,4-dieno-3,16-diona) foram isolados das espécies *T. americana* e *T. hirta* (HANTOS et al., 2001).

### 2.3 A espécie *Trichilia catigua* A. Juss.

Mais de dez espécies de diferentes gêneros e famílias são conhecidas popularmente como catuaba (DUCKE, 1966, MARQUES, 1998; BELTRAME et al., 2004). No Nordeste do Brasil, por exemplo, esta droga é fornecida como *Erythroxylum catuaba* ou *Erythroxylum vacciniifolium* no Ceará e em Pernambuco, *Secundatia floribunda* no Ceará, *Pouteria* subgen. *micropholis* no Maranhão e *Trichilia* sp. na Bahia (DUCKE, 1966; MARQUES, 1998). Destas, sem dúvida a mais utilizada é a *T. catigua* A. Juss. (MARQUES, 1998; KLETTER et al., 2004).

Esta espécie também é conhecida como pau de catuaba, catiguá (DUCKE, 1966), tatuaba, caramuru, pyrantaçara (SILVA, 2004a), catiguá-vermelho, lagarteiro, cataguá, anjelim-rosa, mangaltô-catinga e espeto e possui as sinonímias *T. affinis* A. Juss. e *Moschoxylum catigua* A. Juss.. No Brasil, distribui-se pelos estados de Pará, Manaus, Ceará, Pernambuco, Bahia, Sergipe, Alagoas, Maranhão, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SILVA, 2004a; PATRÍCIO; CERVI, 2005). No Paraná, é encontrada em altitudes compreendidas entre 150 e 600 metros na Floresta Estacional Semidecidual (Floresta do Rio Paraná), Floresta Ombrófila Mista (na região de transição entre floresta Atlântica e floresta com Araucária), e Estepe Gramíneo-Lenhosa (Campos) (Figura 1) (MING; CORREA JUNIOR, 2002; PATRÍCIO; CERVI, 2005).



**Figura 1.** Distribuição geográfica de *T. catigua* A. Juss. no estado do Paraná. (1. Floresta Ombrófila Densa, 2. Floresta Ombrófila Mista, 3. Floresta Estacional Semidecidual, 4. Estepe Gramíneo-Lenhosa, 5. Savana arborizada). **Fonte:** adaptado de PATRÍCIO; CERVI, 2005.

Em geral, são árvores frondosas com 3 a 7,5 m de altura que florescem o ano todo. As características diferenciais desta espécie são os folíolos (7 a 11) elípticos ou oblongos e os frutos avermelhados, tipo cápsula ovóide ou oblonga, com 1 a 1,5 cm de comprimento.

As folhas são compostas, alternas, imparipinadas com 12 a 25 cm de comprimento com face adaxial e abaxial glabra (SILVA, 2004a; PATRÍCIO; CERVI, 2005).

A inflorescência é do tipo axilar, em panícula ou tirso. As flores são pequenas, amarelas ou brancas, unissexuais, com cálice pateliforme, 4 a 5 sépalas triangulares ovaladas e 4 a 5 pétalas valvares, parcialmente unidas. O androceu possui um tubo estaminal urceolado e filetes gamostêmones com tricomas. As anteras (7 a 9) são glabras, os estaminódios delgados e o nectário ausente. O ovário é di ou tri locular. Possuem 1 ou 2 sementes, oblongas, completamente circundadas por uma espermoderma vermelho vivo e carnosa (Figura 2) (SILVA, 2004a; PATRÍCIO; CERVI, 2005).



**Figura 2.** Folhas e inflorescências de *T. catigua* A. Juss. (Meliaceae). **Fonte:** Cláudio Roberto Novello (2008).

Microscopicamente, as folhas apresentam células epidérmicas com contorno poligonal ou levemente ondulado. A epiderme, uniestratificada, é revestida por uma cutícula delgada e estriada. Os estômatos anomocíticos ocorrem exclusivamente na superfície abaxial. Tricomas tectores simples, uni e pluricelulares, revestidos por cutícula levemente granulosa estão presentes. O clorênquima, tipo anelar, é percorrido por feixes vasculares colaterais. A nervura principal apresenta um feixe vascular em arranjo cêntrico. No mesófilo são encontrados idioblastos com conteúdo lipofílico ou drusas de oxalato de cálcio (LAGOS, 2006; LAGOS et al., 2007).

As cascas da catuaba são muito requisitadas na medicina popular ou como matéria-prima industrial para produção de medicamentos, bebidas e corantes, além de ser útil para o curtume. Desta forma, técnicas adequadas de cultivo e manejo devem ser realizadas para prover matéria-prima de qualidade e evitar a degradação ambiental (MING; CORREA JUNIOR, 2002; SILVA, 2004a; PATRÍCIO; CERVI, 2005; LAGOS, 2006; MELO et al., 2009).

Macroscopicamente, apresentam-se planas ou levemente encurvadas, acinzentadas, com aspecto granuloso, pequenas lenticelas circulares e fendas longitudinais curtas e superficiais. A superfície interna é avermelhada, com fibras finamente estriadas no sentido

longitudinal. Não possui odor próprio e o sabor é fortemente amargo (MARQUES, 1998) e adstringente (Figura 3) (PATRÍCIO; CERVI, 2005).



**Figura 3.** Aspectos macroscópicos de cascas de *T. catigua* A. Juss. (Meliaceae). **Fonte:** Ana Luiza Sereia (2011).

Microscopicamente, apresentam periderme com súber espesso. A região cortical e floemática é extensa, apresentando várias camadas de parênquima cortical e inúmeros feixes de fibras esclerenquimáticas alongadas e distribuídas transversalmente. No floema, observam-se elementos crivados, células parenquimáticas e fibras. No pó da droga (Figura 4) é possível visualizar fibras com bainhas cristalíferas, cristais prismáticos de oxalato de cálcio e grãos de amido (MARQUES, 1998; LAGOS, 2006; LAGOS et al., 2007).



**Figura 4.** Aspectos macroscópicos do pó de cascas de *T. catigua* A. Juss. (Meliaceae). **Fonte:** Ana Luiza Sereia (2011).

### **2.3.1 Atividades biológicas**

Sob o ponto de vista medicinal, a catuaba é empregada empiricamente em forma de extrato fluido, tintura, infusão, vinho e xarope (SILVA, 2004b) como afrodisíaco (DUCKE, 1966), estimulante sexual (BELTRAME et al., 2004) e do sistema nervoso (SILVA, 2004a),

tônico, digestivo ou purgante (MING; CORREA JUNIOR, 2002). Externamente, é usada contra o reumatismo e a hidropisia (PATRÍCIO; CERVI, 2005).

Um exemplo de formulação contendo *T. catigua* disponível no Brasil desde a década de 80 é a Catuama® (Figura 5), usada para o tratamento de doenças crônicas como fadiga física e mental, astenias neuromusculares e fraqueza. Este produto era composto pela associação dos extratos hidroalcoólico de *T. catigua* (28,23%), *Paullinia cupana* (40,31%), *Ptychopetalum olacoides* (28,23%) e *Zingiber officinalis* (3,26%) (VAZ et al., 1997; CAMPOS et al., 2004; VIANA et al., 2011). Atualmente, a composição registrada na ANVISA (nº de registro: 100660015) inclui apenas extratos de *T. catigua*, *Paullinia cupana* e *Croton heliotropiifolius*.



**Figura 5.** Medicamento fitoterápico Catuama®. **Fonte:** [www.farmagora.com.br/cat/medicamentos/4185.html](http://www.farmagora.com.br/cat/medicamentos/4185.html)

Diversos estudos avaliaram o potencial terapêutico deste medicamento. Em pacientes com síndrome da boca ardente, Catuama® foi capaz de amenizar significativamente os sintomas manifestados (SPANEMBERG et al., 2012). Em modelos animais, este medicamento apresentou atividade antidepressiva (CAMPOS et al., 2004) e diminuiu a resposta inflamatória, contudo não interferiu com a sensibilização térmica e não afetou a produção dos mediadores inflamatórios IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> ou LTB<sub>4</sub> (QUINTÃO et al., 2008).

O fitoterápico e os extratos individuais dos constituintes apresentaram, ainda, ação analgésica. Vaz e colaboradores (1997) atribuíram o mecanismo desta ação a uma interação com o sistema opioide. Quintão e colaboradores (2008) e Viana e colaboradores (2011) associaram este efeito à estimulação dos receptores do sistema dopaminérgico. Como substâncias purificadas não apresentaram efeito antinociceptivo, supõe-se um efeito sinérgico ou a existência de algum metabólito ativo no plasma.

Além destas ações, Catuama® reverte e previne fibrilação ventricular (PONTIERI et al., 2007) e produz significante relaxamento dos corpos cavernosos de coelhos (ANTUNES et al., 2001) e outros vasos isolados de diferentes espécies animais, como a artéria torácica,

pulmonar e mesentérica. Este efeito está ligado à liberação de óxido nítrico ou substâncias derivadas do endotélio e depende dos princípios ativos presentes principalmente no extrato hidroalcoólico de *T. catigua* (CALIXTO; CABRINI, 1997; PONTIERI et al., 2007).

Os efeitos da infusão aquosa de cascas de *T. catigua* e da Catuama® também foram avaliados sobre a biometria corporal, glândula vesicular, túbulos seminíferos e componentes do espaço intersticial testicular de ratos Wistar adultos. Os extratos (36 e 72 mg/animal/dia) e solução de Catuama® (0,7 ml/kg/animal/dia) causaram efeito deletério sobre a população e volume de células de Leydig nos testículos dos animais tratados por 56 dias (GOMES, 2007).

A atividade antioxidante *in vitro* foi observada em extratos brutos (EB) produzidos com água, acetona, etanol (LONNI et al., 2012), metanol (TANG et al., 2007; LONNI et al., 2012), água-metanol (LONNI et al., 2012); água-etanol (BRIGHENTE et al., 2007; LONNI et al., 2012), água-acetona (RESENDE, 2007; CHASSOT et al., 2011; LONNI et al., 2012), metanol-acetona, metanol-etanol, acetona-etanol, água-metanol-acetona, água-metanol-etanol, água-acetona-etanol, metanol-acetona-etanol, água-metanol-acetona-etanol (LONNI et al., 2012), fração aquosa (FA), fração acetato de etila (FAE), e nas substâncias epicatequina, cinchonaína Ia, cinchonaína Ib (ALBRECHT et al., 2007), cinchonaína IIb, cinchonaína IIc, procianidina B<sub>2</sub> (PB2) e procianidina C<sub>1</sub> (PC1), isoladas das cascas de *T. catigua* (RESENDE, 2007; RESENDE et al., 2011).

Chassot e colaboradores (2011) relataram a ação antidepressiva da FAE na dose de 400 mg kg<sup>-1</sup>. O extrato hidroacetônico (800 mg kg<sup>-1</sup>) e a FAE (200 e 400 mg kg<sup>-1</sup>) apresentaram, ainda, um efeito positivo na memória de ratos, contudo, não apresentaram efeito ansiolítico ou alteração na atividade motora.

O efeito antidepressivo também foi observado no extrato hidroalcoólico (CAMPOS et al., 2005), que demonstrou ainda propriedades anti-inflamatórias (BARBOSA et al., 2004), efeito dilatador prolongado e mantido nos corpos cavernosos de coelhos (ANTUNES et al., 2001) e ação contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. A FA e a fração diclorometano (FDM) foram ativas contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* (PIZZOLATTI et al., 2002). O efeito afrodisíaco não foi observado nos extratos aquosos e metanólico de *T. catigua* (KLETTER et al., 2004).

Assim, o extrato padronizado ou seus constituintes e frações derivadas, associados ou não a outras drogas disponíveis, representam uma potencial alternativa para o tratamento de doenças degenerativas desencadeadas por radicais livres (BRIGHENTE et al., 2007; RESENDE, 2007), processos inflamatórios (BARBOSA et al., 2004), distúrbios depressivos (CAMPOS et al., 2005; CHASSOT et al., 2011) e doenças associadas à dor (SPANEMBERG et al., 2012), onde a terapia clássica não é efetiva. Viana e colaboradores

(2011) sugerem a realização de estudos para investigar e identificar as substâncias envolvidas com esses efeitos.

Sob o ponto de vista ambiental, alguns estudos relatam a atividade inseticida de *T. catigua*. Extratos hexânico, metanólico, hidrometanólico e aquoso de folhas, ramos, sementes e inflorescências afetaram o desenvolvimento da lagarta do cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda*), inibindo o desenvolvimento larval, reduzindo o peso das pupas e provocando moderada mortalidade larval (BOGORNÍ; VENDRAMIM, 2005; MATOS et al., 2006; NEBO, 2008; MATOS et al., 2009).

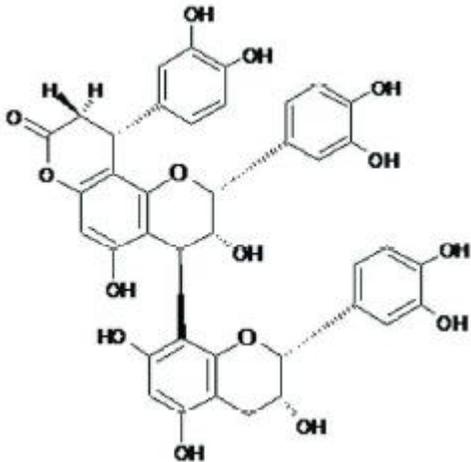
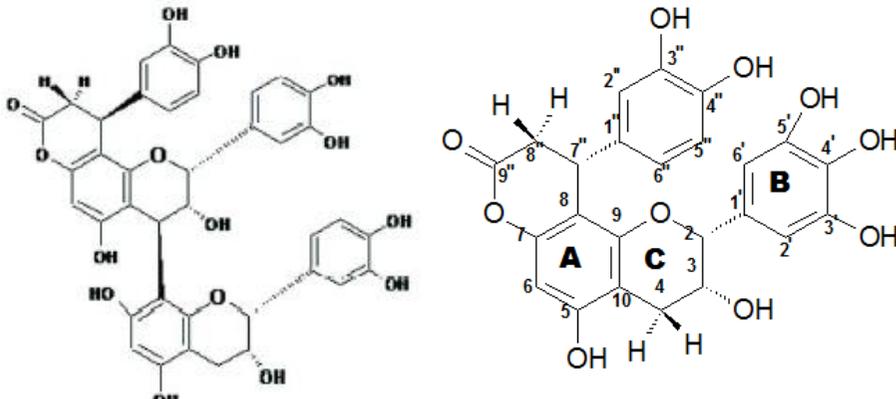
### **2.3.2 Principais componentes químicos**

Na literatura é possível encontrar diversos estudos que identificam substâncias presentes na *T. catigua*. Triagem fitoquímica preliminar indicou a presença de esteroides, saponinas (MARQUES, 1998), heterosídeos (LAGOS, 2006), flavonoides, taninos e mucilagem (SILVA, 2005; RESENDE, 2007; RESENDE et al., 2011). As cascas possuem maior teor de compostos fenólicos, enquanto as folhas possuem maior teor de esteroides (LAGOS, 2006).

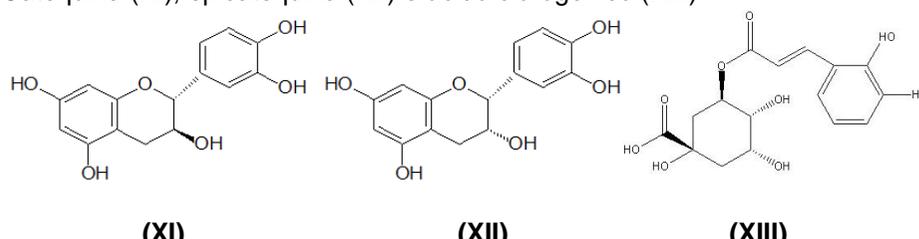
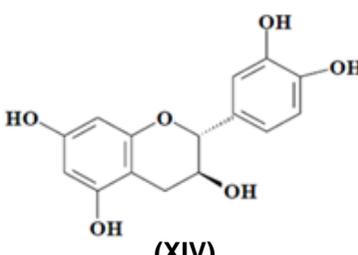
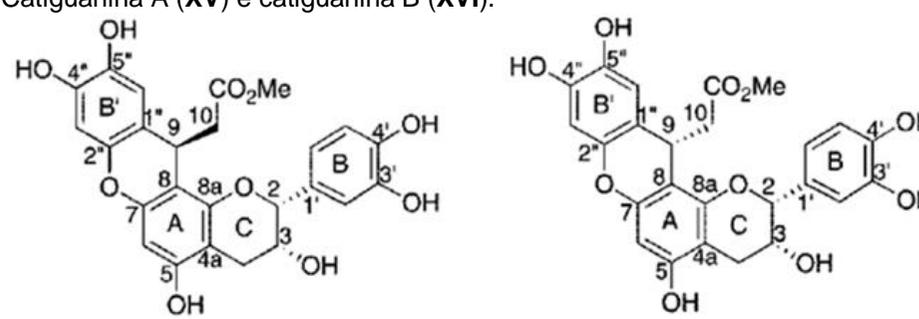
Algumas substâncias isoladas de extratos de *T. catigua* estão apresentadas no Quadro 2, separadas por grupos químicos.



**Quadro 2.** Substâncias isoladas de extratos de *T. catigua* A. Juss. (Meliaceae) (continuação)

GRUPO QUÍMICO	REFERÊNCIA	TIPO DE EXTRATO	PARTE UTILIZADA	SUBSTÂNCIA ISOLADA
FLAVO-LIGNANAS	BELTRAME et al., 2006; MARTINELLI, 2010; VIANA et al., 2011	Hidroalcoólico	Cascas	<p>Cinchonaínas Ia (IV), Ib (V) e IIb (VIII).</p>  <p>(VIII)</p>
	RESENDE, 2007	Hidroacetônico	Cascas	<p>Cinchonaínas Ia (IV), Ib (V), IIb (VIII), IIa (IX) e apocinina E (X).</p>  <p>(IX) (X)</p>

**Quadro 2.** Substâncias isoladas de extratos de *T. catigua* A. Juss. (Meliaceae) (continuação)

GRUPO QUÍMICO	REFERÊNCIA	TIPO DE EXTRATO	PARTE UTILIZADA	SUBSTÂNCIA ISOLADA
FLAVONOIDES	LAGOS, 2006	Hidroalcoólico	Cascas e folhas	<p>Catequina (XI), epicatequina (XII) e ácido clorogênico (XIII).</p>  <p>(XI) (XII) (XIII)</p>
	NEBO, 2008	Metanólico	Inflorescências	<p><i>ent</i>-catequina (XIV).</p>  <p>(XIV)</p>
	TANG et al., 2007	Metanólico	Cascas	<p>Catiguanina A (XV) e catiguanina B (XVI).</p>  <p>(XV) (XVI)</p>



## 2.4 Eletroforese Capilar

O grande número de espécies conhecidas como catuaba pode gerar situações tipificadas como fraudulentas ou, no mínimo, displicentes pela utilização de nomes errados para matérias-primas fitoterápicas (MARQUES, 1998). Estudo realizado por Kletter e colaboradores (2004) mostrou que a minoria das amostras comercializadas como catuaba continha a espécie informada no rótulo e mais da metade dos produtos apresentavam-se adulterados. Beltrame e colaboradores (2006) também comprovaram que amostras comercializadas no mercado popular de Recife como Catuaba não eram de *T. catigua*.

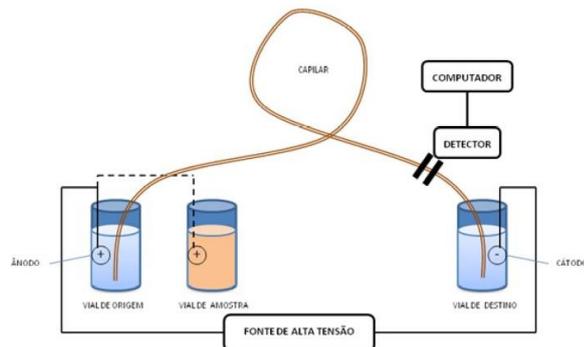
Neste sentido, os métodos analíticos constituem-se ferramentas adequadas para a avaliação da autenticidade e controle de qualidade das matérias-primas e formas farmacêuticas disponíveis no mercado.

Alguns estudos foram realizados com o objetivo de desenvolver métodos úteis para a análise de *T. catigua* utilizando espectrofotometria, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e CLAE acoplada à espectrometria de massas (EM) (BELTRAME et al., 2004; KLETTER et al., 2004; ROLIM et al., 2005; BABY et al., 2006; BELTRAME et al., 2006; ROLIM et al., 2006; DAOLIO et al., 2008; MARTINELLI, 2010; LONNI et al., 2012; LONGUINI et al., no prelo, 2013). Contudo, até o presente momento, nenhum estudo utilizando eletroforese capilar (EC) para avaliação qualitativa e quantitativa de extratos e frações semipurificadas de *T. catigua* foi encontrado.

A EC representa uma fusão das tecnologias derivadas da eletroforese tradicional e da CLAE e permite a separação de moléculas baseada na migração dessas espécies através de um fluído sobre a influência de um campo elétrico. O fluído, conhecido como tampão de corrida, é uma solução que mantém o pH e fornece condutividade suficiente para permitir a passagem da corrente necessária para a separação. Esta técnica tem se sobressaído nas últimas décadas por sua automação, reprodutibilidade e confiabilidade e apresenta vantagens como alta eficiência, alta resolução, alta seletividade, curto tempo de análise, baixo consumo de reagentes, pequeno volume de amostra, boa recuperação e menor custo quando comparada à CLAE (WEINBERGER, 1993; BAKER, 1995; HEEGAARD et al., 1998; TAGLIARO et al., 1998; HU; MARTIN, 1999; LUNTE et al., 2002; EVANS; STALCUP, 2003; CHU et al., 2008; MELLO; ITO, 2011).

O sistema de EC (Figura 6) consiste em um capilar de sílica fundida, com 10 a 120 cm de comprimento e 5 a 100 µm de diâmetro interno, preenchido com um tampão e colocado entre dois reservatórios com eletrodos imersos no tampão. Uma fonte de energia de alta voltagem é utilizada para aplicar um campo elétrico através do capilar de até 30 kV e corrente elétrica de 0 a 300 µA. Em polaridade normal, a carga na parede interna do capilar, provoca o fluxo eletroosmótico na direção do ânodo (eletrodo positivo, onde a amostra é

aplicada) para o cátodo (eletrodo negativo, onde a amostra é analisada). A detecção pode ser realizada diretamente no capilar (on-line) em tempo real, criando-se uma janela óptica pela remoção de uma pequena parte do revestimento de poliamida do capilar. Os detectores comumente utilizados são por espectrofotometria (UV), EM e fluorescência induzida por laser. A injeção da amostra pode ser realizada por duas formas: eletrocinética ou sifonamento (WEINBERGER, 1993; HEEGAARD et al., 1998; TAGLIARO et al., 1998; HU; MARTIN, 1999; LINHARDT; TOIDA, 2002; LUNTE et al., 2002; MELLO, ITO, 2011).



**Figura 6.** Representação esquemática do sistema de Eletroforese Capilar (EC). **Fonte:** MELLO; ITO, 2011.

Idealmente, o capilar deve ser química e fisicamente resistente, opticamente transparente e ter o menor comprimento e diâmetro interno (D.I.) possível para que se aumente a razão área/volume da superfície interna do capilar. Este aumento permite ao capilar dissipar mais eficientemente o aquecimento, o que se contrapõe ao efeito Joule e permite a aplicação de altas voltagens, resultando em separações extremamente rápidas e com alta eficiência. Contudo, na rotina o uso de capilares com D.I. menor que 50  $\mu\text{m}$  é limitado pelo carregamento da amostra, sensibilidade do detector e entupimento do capilar. Para que a eficiência da separação não seja prejudicada, o volume de injeção deve estar entre 1 a 2% do volume total do capilar (WEINBERGER, 1993; TAGLIARO et al., 1998; HU; MARTIN, 1999; LUNTE et al., 2002).

No capilar, os analitos migram baseados na combinação entre as forças eletroforéticas e eletrosmótica. Esta última controla a velocidade e a resolução da separação. Em geral, os íons positivos (cátions) migram primeiro, seguidos pelos compostos neutros e, finalmente, os íons negativos (ânions) (WEINBERGER, 1993; TAGLIARO et al., 1998; HU; MARTIN, 1999; LINHARDT; TOIDA, 2002; LUNTE et al., 2002; GUTERRES, 2005).

Os modos utilizados de EC são eletroforese capilar em gel (ECG), eletroforese capilar de zona (ECZ), cromatografia capilar eletrosmótica (CCE), cromatografia capilar eletrocinética micelar (CCEM), focalização isoelétrica capilar (FIC) e isotacoforese capilar

(ITFC) (WEINBERGER, 1993; BAKER, 1995; TAGLIARO et al., 1998; HU; MARTIN, 1999; GUTERRES, 2005; MELLO; ITO, 2011). A escolha do modo geralmente baseia-se na facilidade do desenvolvimento analítico, robustez do processo de separação e características das substâncias que serão analisadas. Dentre os modos, a ECZ destaca-se como a mais reprodutível (WEINBERGER, 1993) e utilizada, devido ao seu poder de separação, versatilidade e simplicidade de operação (HU; MARTIN, 1999; WANG, 2000; GUTERRES, 2005). Os tampões normalmente empregados são fosfato, borato, citrato ou fosfato-borato, em altas concentrações, por apresentarem melhor capacidade tamponante e reduzirem a adsorção de analitos à parede do capilar, principalmente em análises de amostras biológicas (TAGLIARO et al., 1998).

A grande desvantagem da ECZ é que ela não é capaz de separar os analitos neutros. Todavia, a CCEM pode ser utilizada com este fim. Neste caso, um surfactante com carga, geralmente o dodecil sulfato de sódio (SDS), é adicionado ao tampão de corrida acima da concentração micelar crítica (CMC) e a separação ocorre pelos diferentes graus de partição do analito entre a fase aquosa e as micelas carregadas (WEINBERGER, 1993; TAGLIARO et al., 1998; HU; MARTIN, 1999; LINHARDT; TOIDA, 2002; LUNTE et al., 2002; GUTERRES, 2005).

O desenvolvimento de métodos por EC pode ser complexo, já que muitas variáveis experimentais necessitam de otimização. A seletividade da separação, bem como a velocidade de separação e a resolução podem ser ajustadas pela escolha do modo adequado de EC, modificações no revestimento da parede do capilar, alterações na concentração ou pH do tampão de corrida, voltagem, direção do fluxo eletroosmótico (FEO) e temperatura ou pelo uso de aditivos como ciclodextrinas (CDs), surfactantes, sais biliares, proteínas (albumina, anticorpos), metilcelulose, poliácridamida, íons metálicos, antibióticos, ureia, polímeros lineares, ácidos sulfônicos, aminas quaternárias ou solventes orgânicos (metanol, isopropanol ou acetonitrila). Como pequeno volume de tampão de corrida é utilizado na separação, aditivos que seriam caros para separações por cromatografia líquida (CL) podem ser empregados (WEINBERGER, 1993; HEEGAARD et al., 1998; TAGLIARO et al., 1998; HU; MARTIN, 1999; LINHARDT; TOIDA, 2002; LUNTE et al., 2002; EVANS; STALCUP, 2003; GUTERRES, 2005; CHU et al., 2008; MELLO; ITO, 2011).

O uso de padrões durante o desenvolvimento analítico auxilia na avaliação da separação e otimização do método (EVANS; STALCUP, 2003). Geralmente, o desenvolvimento progride rapidamente devido ao número de pratos teóricos (mais de cem mil) e a enorme capacidade de pico (número de picos separados por unidade de tempo) da técnica. Além disso, a simetria dos picos é excelente, pois a ausência da fase estacionária minimiza muitos fatores que contribuem para o alargamento do pico (WEINBERGER, 1993).

Ferramentas estatísticas, como análise fatorial, colaboram com o desenvolvimento analítico, principalmente quando se utiliza mistura de solventes ternários ou CDs. Estas, principalmente as sulfatadas na concentração de 0,5 a 10%, têm sido amplamente utilizadas para separações quirais em misturas racêmicas. Solutos com mobilidades idênticas, como os enantiômeros, podem ser separados baseados nas interações estereoespecíficas entre o par de enantiômeros e a CD, o que dá origem a diferentes velocidades de migração (WEINBERGER, 1993; TAGLIARO et al., 1998; EVANS; STALCUP, 2003).

Além de separações quirais, a EC aplica-se à análise de uma variedade de amostras, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, substâncias hidro ou lipossolúveis, metabólitos, aminoácidos, íons inorgânicos, ácidos orgânicos, carboidratos, poluentes ambientais, nucleosídeos e nucleotídeos, fármacos, catecolaminas, peptídeos, proteínas, biomarcadores, herbicidas, drogas, biopolímeros e extratos vegetais (BAKER, 1995; HEEGAARD et al., 1998; TAGLIARO et al., 1998; HU; MARTIN, 1999; LUNTE et al., 2002; EVANS; STALCUP, 2003; MELLO; ITO, 2011).

A aplicação da EC na análise fitoquímica tem se destacado desde o início da década de 90 (GUTERRES, 2005). Diversos relatos empregando, principalmente, a ECZ e CCEM na análise de produtos naturais podem ser encontrados na literatura. Dentre estes, podemos citar estudos com as espécies *Arabidopsis thaliana*, *Cucurbita maxima*, *Erechtites hieracifolia*, *Eucalyptus viminalis*, *Nicotiana tabacum*, *Spinacia oleracea* (KAWAMURA et al., 1996), *Sapindus saponaria* (GUTERRES, 2005), *Prunella vulgaris* L. (CHEUNG; ZHANG, 2008), *Fructus cnidii* (WANG et al., 2010), *Paullinia cupana* (ITO, 2011), além do café (CHU et al., 2008), vinho (PERES et al., 2009; ROVIO et al., 2011), chá verde (LI et al., 2010) e preparações farmacêuticas (TIAN; QIN, 2009; CHEN et al., 2011).

Nesses estudos foi possível determinar os níveis dos íons  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  (KAWAMURA et al., 1996),  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HPO}_4^{-2}$  e  $\text{SO}_4^{-2}$  (ROVIO et al., 2011) e das substâncias ácido betulínico, ácido oleanólico, ácido rosmarínico, ácido ursólico (CHEUNG; ZHANG, 2008), ácido cumárico, quercetina (CHEUNG; ZHANG, 2008; PERES et al., 2009), ácido cafeico, rutina (CHEUNG; ZHANG, 2008; CHU et al., 2008; PERES et al., 2009), ácido clorogênico (CHU et al. 2008; CHEN et al., 2011), ácido ferúlico, ácido protocatéquico, *o*-diidroxibenzeno (CHU et al. 2008), ácido gálico (CHU et al. 2008; PERES et al., 2009), cafeína (ITO, 2011); catequina (CHU et al. 2008; PERES et al., 2009; LI et al., 2010; ITO, 2011), baicalina, farrerol, puerarina (TIAN; QIN, 2009), ácido siríngico, canferol, miricetina, resveratrol (PERES et al., 2009), epicatequina (LI et al., 2010; ITO, 2011), isopimpineline, bergapteno, imperatorina, ostol (WANG et al., 2010), ácido geniposídico, ácido glicirrízico, berberina, coptisina, 20-hidroxiecdisona, 5-hidroxiacetilfuraldeído, luteolina e paeoniflorina (CHEN et al., 2011), acetato, citrato, formato, fumarato, glicolato, lactato, malato, maleato, malonato, oxalato, succinato, tartrato, celobiose, frutose, fucose, galactose, glicose, mio-

inositol, manitol, manose, ramnose, ribose, sorbitol, trealose, xilose (ROVIO et al., 2011), além de avaliar o emprego de frações semipurificadas como aditivos em tampão para CCEM (GUTERRES, 2005).

Estudos como estes corroboram a ideia de que a EC continuará a crescer como uma técnica analítica importante, confiável e versátil. Embora a EC esteja ainda no estágio de desenvolvimento, ela se tornará uma ferramenta de rotina nas áreas química, biológica e clínica, devido à alta resolução, fácil automatização e rapidez na análise de matrizes complexas (HEEGAARD et al., 1998; TAGLIARO et al., 1998; HU; MARTIN, 1999; LINHARDT; TOIDA, 2002). Em relação às amostras de extratos vegetais, a principal vantagem dos capilares de sílica fundida quando comparados às colunas empacotadas é que as amostras podem ser diretamente injetadas sem qualquer etapa prévia de separação ou purificação (CHEUNG; ZHANG, 2008). Contudo, a extração em fase sólida pode ser aplicada no preparo de amostras com o objetivo de melhorar a seletividade, detectabilidade, confiabilidade, exatidão e repetibilidade das análises pela remoção de interferentes da matriz (GUTERRES, 2005). Ademais, o capilar pode ser facilmente lavado entre as corridas e está livre de contaminação irreversível pela matriz (CHEUNG; ZHANG, 2008). A grande limitação do método, principalmente quando se utiliza detector UV, é a baixa sensibilidade, sendo que o limite de detecção (LD) é cerca de 50 vezes maior que o da CL (WEINBERGER, 1993; HEEGAARD et al., 1998). Além disso, apenas uma amostra pode ser analisada por vez. Contudo, esta limitação poderá ser contornada no futuro pelo desenvolvimento de equipamentos com multicapilares (WEINBERGER, 1993).

## **2.5 Validação de metodologia analítica**

Os métodos cromatográficos de alta eficiência como CLAE, cromatografia gasosa e EC, são frequentemente utilizados na análise quantitativa de produtos vegetais (FARIAS, 2007; TIAN; QIN, 2009). A maioria das substâncias químicas de referência para extratos vegetais não está disponível na forma sintética, mas pode ser isolada de fontes naturais e aplicada em métodos para padronização, normalização, controle de processo e controle de qualidade de drogas vegetais e derivados (PAULI, 2001). Contudo, antes que o método possa ser implementado na rotina laboratorial, é necessário que seja validado (ROZET et al., 2007).

A validação consiste em uma série de procedimentos que garantem a conformidade do método frente a um valor referência, fornecendo uma evidência documentada aos laboratórios e órgãos reguladores de que o método é confiável, seguro e eficaz ao que se aplica (NETTO et al., 2006; GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007; ROZET et al., 2007; CASS; DEGANI, 2010). Para tanto, de acordo com a International Conference on Harmonisation

(ICH, 2005) e a Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA, deve apresentar seletividade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão, LD e limite de quantificação (LQ) adequados a análise.

Considerando o pequeno volume (nl) e quantidade de analitos (ng–pg) injetados na EC, a validação pode ser uma tarefa difícil. Contudo, o uso de equipamentos mais modernos e padrões internos adequados colaboram para o sucesso do procedimento (TAGLIARO et al., 1998).

Na literatura, é possível encontrar diversos exemplos de validação de métodos desenvolvidos para quantificação de metabólitos em extratos e frações obtidos de drogas vegetais. Esses relatos incluem, principalmente, métodos desenvolvidos por CLAE. Contudo, com o advento da EC observa-se, nos últimos anos, um incremento nos processos de validação de métodos desenvolvidos por esta técnica para quantificação de flavonoides (CHEUNG; ZHANG, 2008; CHU et al., 2008; PERES et al., 2009; TIAN; QIN, 2009; LI et al., 2010; CHEN et al., 2011; ITO, 2011), metilxantinas (ITO, 2011), ácidos fenólicos (CHEUNG; ZHANG, 2008; CHU et al., 2008; PERES et al., 2009; CHEN et al., 2011), cumarinas (WANG et al., 2010), terpenoides (CHEUNG; ZHANG, 2008; CHEN et al., 2011), fenilpropanoides (CHEUNG; ZHANG, 2008), hidroquinonas (CHU et al. 2008), esteroides, iridoides e alcaloides (CHEN et al., 2011).

Em relação à *T. catigua*, existem poucos trabalhos publicados com metodologias validadas para quantificação de seus marcadores. Beltrame e colaboradores (2006) quantificaram a cinchonina lb por CLAE. Lagos (2006) descreveu a validação de um método para quantificação do ácido clorogênico por CLAE, e outro para quantificação de  $\beta$ -sitosterol por cromatografia gasosa. Outros autores desenvolveram e validaram metodologias espectrofotométricas para quantificação de flavonoides, expressos como rutina, em extrato comercial e formas farmacêuticas contendo extrato de *T. catigua* (ROLIM et al., 2005; BABY et al., 2006; ROLIM et al., 2006). Lonni e colaboradores (2012) e Longhini e colaboradores (no prelo, 2013) utilizaram uma metodologia validada por CLAE capaz de identificar e quantificar as substâncias: catequina, epicatequina, PB2, ácido clorogênico e as cinchoninas Ia, Ib, IIa e IIb.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização físico-química das cascas, EB e FAE de *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae) bem como desenvolver, otimizar e validar uma metodologia rápida e exata empregando a eletroforese capilar na separação, identificação e quantificação de polifenóis da fração semipurificada (FAE).

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a qualidade físico-química das cascas, EB e FAE de *T. catigua*;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do EB e FAE através do método com o radical DPPH;
- Desenvolver metodologia analítica por EC para quantificação de marcadores químicos envolvidos na padronização da FAE de *T. catigua*;
- Validar a metodologia analítica previamente desenvolvida segundo critérios estabelecidos pelos órgãos oficiais RE 899/2003-ANVISA (BRASIL, 2003) e ICH (2005) no que diz respeito à seletividade, linearidade, intervalo, LD, LQ, precisão, exatidão e robustez;
- Avaliar a estabilidade das soluções da amostra e do padrão interno, em temperatura ambiente e de refrigeração;
- Quantificar os polifenóis da FAE de *T. catigua*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Matéria-prima vegetal

As cascas do vegetal *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae) foram coletadas em maio de 2011, pelo Sr. José Maria Fernandes Monteiro, estabelecido na Avenida Valdique Soriano, nº 187, cidade de Caitité, estado da Bahia, Brasil. A exsicata encontra-se depositada no herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUEM#19434). As cascas foram fragmentadas com auxílio de tesouras de poda manual e secas à temperatura ambiente. No laboratório de biologia farmacêutica (PALAFITO), as cascas foram colocadas em estufa, a 40 °C, por 24 h e posteriormente moídas em moinho de martelos (Tigre ASN5).

### 4.2 Solventes e reagentes

Todos os solventes e reagentes possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.), das marcas J. T. Baker®, Sigma Aldrich® ou Synth® ou outra especificada:

- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH);
- 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina;
- Acetato de etila;
- Acetona;
- Ácido bórico;
- Ácido clorídrico;
- Água destilada (UEM);
- Água Ultrapura (Milli-Q) - Millipore®;
- Álcool etílico - Ilha®;
- Butil-hidroxi-tolueno (BHT);
- Carbonato de sódio anidro;
- Hidróxido de sódio;
- Metanol;
- Metil- $\beta$ -ciclodextrina;
- Nitrogênio líquido (UEM);
- Padrões de ácido clorogênico, ácido gálico, catequina e epicatequina;
- Padrões de PB1, PB2, Cinchonaína Ia, Cinchonaína Ib, Cinchonaína IIa e Cinchonaína IIb isolados por Resende (2007);
- Pó de pele - Freiberg;
- Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu - Laborclin®;
- Tetraborato de sódio anidro – Acros Organics®;

- $\beta$ -ciclodextrina (98%).

### 4.3 Material e Equipamentos

- Aparelho de EC modelo P/ACE System MDQ da Beckman Coulter, equipado com detector UV-Vis e software Karat versão 7.0 de aquisição e tratamento de dados;
- Aparelho de ultra-som Unique USC Cleaner 1450, 25 kHz;
- Balança de infravermelho Ohaus MB35;
- Balança analítica Marte AY220;
- Banho-maria;
- Bomba a vácuo Vaccubrand Labortechnik tipo MZ 2C;
- Cartucho de extração em fase sólida Strata C18-E (55  $\mu$ m, 70 Å; 200 mg/3 ml);
- Colunas capilares de sílica fundida revestidos externamente com poliamida com diâmetro interno de 50  $\mu$ m, diâmetro externo de 375  $\mu$ m - Beckman Coulter;
- Dessecador;
- Espectrofotômetro Shimadzu UV/VIS PC-1650;
- Estufa S.E. Fanem;
- Evaporador rotatório Büchi R-114;
- Liofilizador Christh Alpha 1-4;
- Manta aquecedora Fisatom;
- Membrana Millipore HAWP01300 0,45  $\mu$ m;
- Micropipeta Eppendorf (10 a 1000  $\mu$ l);
- Moinho de martelos Tigre ASN-5;
- Mufla;
- Papel filtro quantitativo Framex;
- pHmêtro de bancada Gehaka mod PG 1800;
- Tamisador vibratório RETSCH;
- Tamises com abertura de malha de 2,000; 0,840; 0,420; 0,250; 0,177 e 0,149 mm;
- Ultra-turrax UTC 115 KT, Ika® Works, Wilmington, Carolina do Norte, EUA;
- Vortex IKA.

### 4.4 Controle de Qualidade

A avaliação da qualidade da droga vegetal foi realizada segundo normas da Farmacopeia Brasileira (2010), Farmacopeia Europeia (2002) e técnicas não farmacopeicas. Como a espécie *T. catigua* não possui monografia descrita na Farmacopeia Brasileira, os padrões de qualidade foram avaliados comparando-se os resultados com estudos

anteriores. Em ensaios quantitativos, as variações nos resultados foram consideradas estatisticamente, calculando-se a média, desvio padrão e coeficiente de variação.

#### **4.4.1 Análises físico-químicas**

##### **4.4.1.1 DETERMINAÇÃO DE MATERIAL ESTRANHO**

Todo o material vegetal recebido foi espalhado em camada fina sobre uma superfície plana. Os materiais estranhos à droga foram separados manualmente a olho nu. O material separado foi posteriormente pesado e a porcentagem determinada (FARMACOPEIA, 2010).

##### **4.4.1.2 DETERMINAÇÃO DA PERDA POR DESSECAÇÃO**

Cinco amostras de 2 g da droga vegetal cominuída exatamente pesadas foram uniformemente distribuídas no coletor de alumínio da balança de infravermelho e submetidas ao aquecimento à temperatura de 115 °C, pelo período de 20 min. Após esse tempo, foram feitas as leituras das massas. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, através da média de cinco determinações (FARMACOPEIA, 2010).

##### **4.4.1.3 DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS**

Seis cadinhos de porcelana foram previamente calcinados em mufla, a 450 °C por 6 h, resfriados em dessecador e tarados em balança analítica. Amostras de 3 g da droga vegetal pulverizada foram exatamente pesadas e distribuídas uniformemente nos cadinhos, os quais foram incinerados e levados à mufla a 450 °C, até eliminação de todo o carvão. Após resfriamento em dessecador, os cadinhos foram pesados. Os resultados foram expressos em porcentagem de cinzas em relação à droga seca ao ar, através da média de seis determinações (FARMACOPEIA, 2010).

##### **4.4.1.4 DETERMINAÇÃO DE CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO**

O resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi fervido durante 5 min com 25 ml de ácido clorídrico a 7% (p v<sup>-1</sup>) em cadinho coberto com vidro de relógio. O vidro de relógio foi lavado com 5 ml de água quente e esta água foi adicionada ao cadinho. O resíduo insolúvel em ácido foi recolhido sobre papel de filtro e lavado até que o filtrado se mostrasse neutro. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original, secado sobre chapa quente e incinerado a cerca de 500 °C até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca ao ar, através da média de seis determinações (FARMACOPEIA, 2010).

#### 4.4.1.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE EXTRATIVOS

Cerca de 1,0 g da droga vegetal cominuída exatamente pesada foi submetida à decocção com 100,0 ml de água, durante 10 min. Após o resfriamento, a solução foi transferida para balão volumétrico e o volume completado a 100,0 ml. Após filtração em papel filtro, os primeiros 20,0 ml foram desprezados. Uma alíquota equivalente a 20,0 ml foi pesada em pesa-filtro previamente tarado, e levada à evaporação até *secura* em banho-maria. O pesa-filtro contendo o resíduo foi colocado em estufa, à temperatura de 105 °C até peso constante, resfriado em dessecador e pesado. Os resultados foram expressos em porcentagem de extrativos, através da média de cinco determinações (DEUTSCHES, 1986).

#### 4.4.1.6 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA

A técnica da granulometria por tamisação foi empregada. Três determinações foram realizadas submetendo-se 50 g do material vegetal em pó à passagem forçada por vibração através de seis tamises individualmente tarados, com abertura de malha de 2,000; 0,840; 0,420; 0,250; 0,177 e 0,149 mm e coletor, utilizando-se tamisador vibratório RETSCH durante 25 min a 70 vibrações por minuto. Após a tamisação, procedeu-se a pesagem, determinando-se a quantidade de material retido em cada peneira. O resultado foi fornecido sob forma tabelar, apresentando-se classe granulométrica (CG; mm); intervalo de abertura de malha ( $\Delta m$ ; mm); dimensão granulométrica média ( $\bar{m}$ ; mm); fração retida percentual (F; %); fração resíduo percentual (R; %) e fração passagem percentual (P; %) (HELMAN, 1982).

### **4.4.2 Análises químicas quantitativas**

#### 4.4.2.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS E TANINOS TOTAIS

Cerca de 0,750 g da droga pulverizada foram exatamente pesados e, transferidos para um erlenmeyer com 150 ml de água deixando-se durante 30 min em banho-maria à temperatura de 85 °C. Após resfriamento, o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 250 ml, completando-se o volume com água. Cerca de 80 ml do extrato foi filtrado, desprezando-se os primeiros 50 ml. O filtrado obtido foi denominado solução-mãe (SM) (FARMACOPEIA, 2002).

Para a determinação de polifenóis totais (PT), 5 ml da SM foram diluídos com água em balão volumétrico de 25 ml. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml do reagente fenólico de Folin-Ciocalteu (2 mol l<sup>-1</sup>) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio anidro 10,75%. Após 30 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 760 nm, empregando-se água como branco (FARMACOPEIA, 2002).

Para determinações de polifenóis não adsorventes (PNA), 10 ml da SM foram transferidos com 0,100 g de pó-de-pele R para um béquer e agitados durante 60 min. Após, a solução foi filtrada e 2 ml do filtrado foram diluídos com água para 10 ml em balão volumétrico. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml do reagente fenólico de Folin-Ciocalteu ( $2 \text{ mol l}^{-1}$ ) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio anidro 10,75%. Após 30 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 760 nm, empregando-se água como branco. Foram realizadas três determinações (FARMACOPEIA, 2002).

Para a determinação do teor de PT e taninos totais do EB e FAE, realizou-se a mesma técnica, porém a etapa de extração não se fez necessária. A quantidade de EB utilizada foi de 0,150 g (rendimento=20%). A quantidade de FAE utilizada foi de 0,070 g (rendimento=9,33%).

#### 4.4.2.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH - 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZILA

Para determinação da capacidade antioxidante utilizou-se metodologia descrita por Amarowicz e colaboradores (2004). O EB e a FAE foram diluídos em 3 ml de metanol, de modo a atingir concentrações de 3 a  $8,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ . A estas soluções acrescentaram-se 300  $\mu\text{l}$  de solução de DPPH ( $1 \text{ mmol l}^{-1}$ ). A mistura foi agitada em vortex por 15 s e deixada em repouso à temperatura ambiente durante 30 min. As absorvâncias das soluções resultantes foram medidas a 517 nm. Foi utilizado como branco uma solução metanólica de BHT (2 mg em 4 ml de metanol) adicionada de 500  $\mu\text{l}$  de solução de DPPH e como controle negativo, uma solução contendo 3 ml de metanol e 300  $\mu\text{l}$  de solução de DPPH. Como controle positivo, foram utilizadas soluções de Vitamina C e Trolox nas concentrações de 3 a  $8,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ . A atividade de sequestro de radicais (%ASR) foi calculada como porcentagem de descoloramento do DPPH, usando a seguinte equação:

$$\%ASR = \frac{AbsCN - AbsA}{AbsCN} \cdot 100$$

Onde:

Abs CN = Absorvância do controle negativo

Abs A = Absorvância da amostra

## 4.5 Preparo de extrato bruto e fração acetato de etila

### 4.5.1 Extrato bruto (EB)

As cascas secas foram moídas em moinho de martelos, empregando-se o material sem separação granulométrica. A extração foi realizada por Ultra-turrax, utilizando acetona:água (7:3; v v<sup>-1</sup>) como líquido extrator, na proporção de 10% (m v<sup>-1</sup>). Em seguida, o extrato foi concentrado sob pressão reduzida, congelado em nitrogênio líquido e liofilizado, obtendo-se assim o EB (RESENDE, 2007).

### 4.5.2 Fração acetato de etila (FAE)

O EB (50 g) foi ressuscitado em água destilada (500 ml) e particionado com acetato de etila (500 ml; 12 vezes) (MELLO et al., 1996). As fases acetato de etila foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida até eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas, obtendo-se a FAE. A fase aquosa restante também foi concentrada, congelada e liofilizada, obtendo-se a FA (RESENDE, 2007).

## 4.6 Desenvolvimento de metodologia analítica por Eletroforese Capilar

### 4.6.1 Condições eletroforéticas

O método foi desenvolvido em um sistema capilar eletroforético Beckman P/ACE MDQ equipado com detector UV-Vis. Os dados foram processados em software Beckman 32 Karat versão 7.0. Utilizou-se capilar da Beckman Coulter de sílica fundida de 375 µm D.E. x 50 µm D.I. com comprimento de 50/60,2 cm (comprimento efetivo/comprimento total). Em seu primeiro uso, o capilar foi condicionado bombeando-se HCl 1,0 mol l<sup>-1</sup> por 1h, NaOH 1,0 mol l<sup>-1</sup> por 1h e água ultrapura por 1h. Na análise, a temperatura do capilar foi ajustada para 25 °C e as amostras foram injetadas hidrodinamicamente, a 0,5 psi, por 5 segundos. Antes de cada injeção, foi realizado um pré-condicionamento do capilar, bombeando-se solução de NaOH 1,0 mol l<sup>-1</sup> por 5 min, água ultrapura por 7 min e tampão de enxague por 10 min. Ao fim das análises, realizou-se o enxague do capilar, bombeando-se solução de NaOH 1,0 mol l<sup>-1</sup> por 10 min e água ultrapura por 20 min. A programação utilizada durante as análises foi estabelecida por Ito (2011), e encontra-se descrita no Quadro 3.

**Quadro 3.** Programação utilizada para análise de amostras por EC

Condicionamento	5 min	20 psi	1,0 mol l <sup>-1</sup> de NaOH
Condicionamento	7 min	20 psi	Água ultrapura
Condicionamento	10 min	20 psi	Tampão de enxágue
Injeção	5 s	0,5 psi	Amostra

#### **4.6.2 Preparo das soluções de padrões**

As soluções dos padrões ácido clorogênico, catequina, epicatequina, PB1, PB2, cinchonaína Ia, cinchonaína Ib, cinchonaína IIa e cinchonaína IIb utilizadas para identificação dos picos foram preparadas solubilizando-se uma pequena quantidade dos padrões em 1 ml de metanol, por 1 min em ultrassom. Estas soluções foram mantidas em geladeira por no máximo uma semana, sob proteção da luz.

#### **4.6.3 Preparo da solução amostra**

Para preparo de solução amostra nas concentrações de  $500 \mu\text{g ml}^{-1}$  ou  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ , foram pesados, respectivamente, 5 ou 10 mg da FAE e solubilizados em aproximadamente 5 ml de solução metanol:água (2:8 v v<sup>-1</sup>), com auxílio do ultrassom. A solução foi posteriormente submetida à passagem por um cartucho C18 previamente condicionado pela passagem de 3 ml de metanol e 3 ml de água ultrapura. A solução extraída foi transferida para um balão volumétrico de 10 ml que teve o seu volume completado com solução metanol:água (2:8 v v<sup>-1</sup>). Antes de ser injetada, a solução foi filtrada através de membrana de filtro de  $0,45 \mu\text{m}$  e armazenada em geladeira por no máximo uma semana.

#### **4.6.4 Preparo da solução eletrolítica**

A solução estoque de tetraborato de sódio  $100 \text{ mmol l}^{-1}$  (solução A) foi preparada solubilizando-se 2,0126 g deste sal em 100,0 ml de água ultrapura. A solução estoque do ácido bórico  $100 \text{ mmol l}^{-1}$  (solução B) foi preparada solubilizando-se 0,6183 g do ácido em 100,0 ml de água ultrapura. Ambas as soluções foram submetidas ao ultrassom até solubilização e filtradas através de membrana de filtro de  $0,45 \mu\text{m}$ . Para obtenção da solução eletrolítica, as soluções A e B foram previamente diluídas na concentração de interesse e misturadas até obtenção do pH desejado. Nos ensaios que utilizaram  $\beta$ -ciclodextrinas ( $\beta$ -CD), metil- $\beta$ -CD e 2-hidroxipropil- $\beta$ -CD, adicionou-se a quantidade adequada de CD na solução eletrolítica pronta. As soluções estoques foram armazenadas em geladeira por no máximo 48 h e as misturas foram preparadas diariamente.

#### **4.6.5 Preparo da solução enxágue**

A solução de NaOH  $1 \text{ mol l}^{-1}$  foi preparada solubilizando-se 4,0 g de NaOH em 100,0 ml de água ultrapura. Antes do uso, esta solução foi filtrada em filtro de membrana com poro de  $0,45 \mu\text{m}$ .

#### **4.6.6 Otimização das condições analíticas**

Os seguintes parâmetros foram testados:

#### 4.6.6.1 COMPRIMENTO DE ONDA ( $\lambda$ )

O detector UV-Vis acoplado ao equipamento utilizado possui quatro possibilidades de  $\lambda$ : 200, 214, 254 e 280 nm. As quatro possibilidades de  $\lambda$  foram analisadas. As demais condições eletroforéticas foram: tampão borato 50 mmol l<sup>-1</sup>; pH 8,5; voltagem: 20 kV a 25 °C, injeção 5 s a 0,5 psi, FAE: 500 µg ml<sup>-1</sup>.

#### 4.6.6.2 VOLTAGEM

As voltagens de 15 e 25 kV foram analisadas nas condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol l<sup>-1</sup>, pH 8,6; 25 °C, detecção: 214 nm, injeção: 0,5 psi por 5 s; FAE: 1 mg ml<sup>-1</sup>.

#### 4.6.6.3 CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO

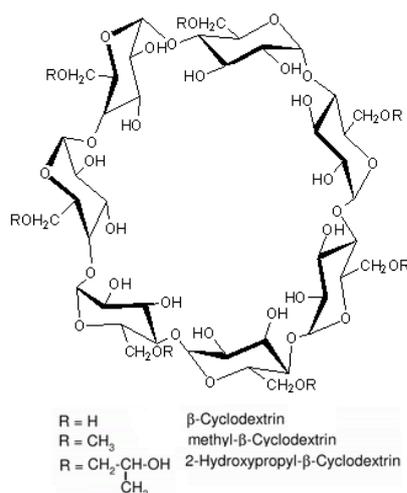
Quatro concentrações de solução eletrolítica foram testadas: 50, 60, 70 e 80 mmol l<sup>-1</sup>. Essas concentrações foram obtidas por diluição das soluções A e B. As soluções diluídas foram misturadas até pH 9,1. As demais condições eletroforéticas foram: voltagem: 18 kV a 25 °C, injeção 5 s a 0,5 psi, detecção: 214 nm; FAE: 500 µg ml<sup>-1</sup>.

#### 4.6.6.4 pH DO TAMPÃO

Foram avaliados os valores de pH 9,10; 9,25; 9,35 e 9,45 em soluções eletrolíticas com concentração de 50 e 60 mmol l<sup>-1</sup>. Os valores de pH 9,10; 9,26 e 9,35 foram avaliados em soluções eletrolíticas com concentração de 70 mmol l<sup>-1</sup>. Os valores de pH 8,96, 9,21 e 9,30 foram avaliados em soluções eletrolíticas com concentração de 80 mmol l<sup>-1</sup>. As demais condições eletroforéticas foram: voltagem: 18 kV a 25 °C, injeção 5 s a 0,5 psi, detecção: 214 nm; FAE: 500 µg ml<sup>-1</sup>.

#### 4.6.6.5 TIPO E CONCENTRAÇÃO DE SELETOR QUIRAL

Três ciclodextrinas (CD) foram testadas:  $\beta$ -CD, metil- $\beta$ -CD e 2-hidroxipropil- $\beta$ -CD (Figura 7). Cada CD foi adicionada à solução eletrolítica nas concentrações: 10, 15 e 20 mmol l<sup>-1</sup>. As condições eletroforéticas foram: tampão borato 70 mmol l<sup>-1</sup>, pH 9,26; voltagem: 20 kV a 25 °C, injeção: 5 s a 0,5 psi, detecção: 214 nm; FAE: 1 mg ml<sup>-1</sup>. Soluções padrões das substâncias catequina, epicatequina, PB2, cinchonaína Ia e cinchonaína Ib foram utilizadas para identificação dos picos.



**Figura 7.** Estrutura molecular da β-ciclodextrina, metil-β-ciclodextrina e 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina.

**Fonte:** adaptado de [www.tocris.com/disprod.php?ItemId=2248#.UP8NXSdZUhN](http://www.tocris.com/disprod.php?ItemId=2248#.UP8NXSdZUhN)

#### 4.6.6.6 GRADIENTE DE VOLTAGEM

Três gradientes de voltagem foram avaliados, conforme apresentados no Quadro 4:

**Quadro 4.** Gradientes de voltagem avaliados no desenvolvimento de metodologia por EC

Gradiente 1	30 kV por 5,7 min	5 kV por 2 min	30 kV por 7,3 min
Gradiente 2	30 kV por 5,7 min	7,5 kV por 2 min	30 kV por 7,3 min
Gradiente 3	30 kV por 5,7 min	10 kV por 2 min	30 kV por 7,3 min

As condições eletroforéticas foram: tampão borato 80 mmol l<sup>-1</sup>, pH 8,80; 2-hidroxiopropil-β-CD 10 mmol l<sup>-1</sup>, 25 °C, injeção: 5 s a 0,5 psi, detecção: 214 nm; FAE: 1 mg ml<sup>-1</sup>. Soluções padrões das substâncias catequina, epicatequina, ácido clorogênico, PB1, PB2, cinchonáinas Ia, Ib, IIa e IIb foram utilizadas para identificação dos picos. Os parâmetros: tempo de migração e resolução entre os picos dos enantiômeros cinchonáinas Ia e Ib foram monitorados.

#### 4.6.7 Determinação dos parâmetros eletroforéticos

Para determinação dos parâmetros eletroforéticos utilizou-se as fórmulas descritas por Weinberger (1993) e Baker (1995). Na determinação do tempo do fluxo eletroosmótico, utilizou-se como marcador o metanol presente na solução amostra, uma vez que ele provoca um ponto de inflexão facilmente identificável no eletroferograma.

A velocidade do fluxo eletroosmótico ( $V_{EOF}$ ) foi calculada utilizando a fórmula:

$$V_{EOF} = \frac{L_D}{t_{EOF}}$$

Onde,  $L_D$  = comprimento efetivo do capilar (cm)

$t_{EOF}$  = tempo de migração do marcador (s)

A velocidade aparente de migração ( $V_{ap}$ ) das substâncias ácido clorogênico, catequina, epicatequina, PB1, PB2, cinchonáinas Ia, Ib, IIa e IIb e ácido gálico foi calculada pela fórmula:

$$V_{ap} = \frac{L_D}{t_{ap}}$$

Onde,  $L_D$  = comprimento efetivo do capilar (cm)

$t_{ap}$  = tempo de migração do composto (s)

Com os valores da velocidade aparente ( $V_{ap}$ ) e da velocidade eletroosmótica ( $V_{EOF}$ ), calculou-se a velocidade eletroforética ( $V_e$ ) de cada substância pela fórmula:

$$V_e = V_{ap} - V_{EOF}$$

A mobilidade eletroforética ( $\mu_e$ ) de cada composto foi encontrada pela fórmula:

$$\mu_e = \frac{V_e L_T}{H}$$

Onde,  $\mu_e$  = mobilidade eletroforética do composto ( $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )

$V_e$  = velocidade eletroforética do composto ( $\text{cm s}^{-1}$ )

$L_T$  = comprimento total do capilar (cm)

$H$  = potencial aplicado no capilar (V)

Em sistemas que apresentam o fluxo eletroosmótico, a mobilidade total do íon ( $\mu_{ap}$ ) é a soma da sua mobilidade eletroforética ( $\mu_e$ ) mais a mobilidade eletroosmótica ( $\mu_{EOF}$ ).

$$\mu_{ap} = \mu_e + \mu_{EOF}$$

## 4.7 Validação da metodologia analítica

### 4.7.1 Preparo da solução estoque do padrão interno

Para preparo da solução estoque do padrão interno ácido gálico  $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ , 5 mg de ácido gálico foram pesados e solubilizados em 10 ml de solução metanol:água (2:8 v v<sup>-1</sup>), com auxílio do ultrassom.

### 4.7.2 Especificidade e seletividade

Nesta análise foram avaliados os seguintes parâmetros para catequina, epicatequina, PB2, cinchonáina Ia, cinchonáina Ib, cinchonáina IIa, cinchonáina IIb e ácido gálico ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ): 1) Coeficiente de variação do tempo de retenção, 2) Coeficiente de variação da área, 3) Resolução, 4) Eficiência (Pratos Teóricos) e 5) Assimetria. Os valores foram comparados com os critérios estabelecidos pelo ICH (2005).

### **4.7.3 Linearidade**

Para determinação da linearidade, utilizou-se a amostra de FAE 1 mg ml<sup>-1</sup> adicionada de ácido gálico como padrão interno. A curva de calibração foi obtida a partir da análise de seis concentrações (20, 40, 60, 80, 100 e 120 µg ml<sup>-1</sup>) do ácido gálico em triplicata e em três dias diferentes. Os resultados foram tratados estatisticamente para determinação do coeficiente de correlação (r), intersecção com o eixo y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. O critério mínimo para aceitação foi r = 0,99 (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

### **4.7.4 Precisão**

#### **4.7.4.1 PRECISÃO INTRA-CORRIDA**

A precisão intra-corrída ou repetibilidade do método foi verificada por no mínimo seis determinações do ácido gálico a 120 µg ml<sup>-1</sup>. O critério para aceitação foi coeficiente de variação (CV) menor que 5% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

#### **4.7.4.2 PRECISÃO INTER-CORRIDA**

A precisão inter-corrída ou intermediária foi verificada por no mínimo seis determinações do ácido gálico a 120 µg ml<sup>-1</sup> em dois dias distintos. O critério para aceitação foi coeficiente de variação (CV) menor que 5% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

### **4.7.5 Limite de detecção (LD)**

O limite de detecção foi determinado pela fórmula:

$$LD = \frac{3 \cdot DP_a}{IC}$$

em que DP<sub>a</sub> é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo 3 curvas de calibração construídas e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

### **4.7.6 Limite de quantificação (LQ)**

O limite de quantificação foi determinado pela fórmula:

$$LQ = \frac{10 \cdot DP_a}{IC}$$

em que DP<sub>a</sub> é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo 3 curvas de calibração construídas e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

### **4.7.7 Exatidão**

A exatidão do método foi determinada pela fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \cdot 100$$

a partir da análise de três concentrações de ácido gálico (20, 60 e 120  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) em triplicata (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

#### 4.7.8 Robustez

A avaliação da robustez foi realizada através de pequenas variações das condições eletroforéticas estabelecidas. Os parâmetros alterados estão apresentados no Quadro 5.

**Quadro 5.** Parâmetros avaliados para determinação da robustez do método desenvolvido

Parâmetros	Variações	
Tampão borato 80 $\text{mmol l}^{-1}$	84 $\text{mmol l}^{-1}$	76 $\text{mmol l}^{-1}$
Tampão borato pH 8,8	pH 8,9	pH 8,7
Gradiente de voltagem - 5 kV	5,1 kV	4,9 kV
Gradiente de voltagem - 30 kV	29 kV	

Monitorou-se as áreas e o tempo de migração das substâncias catequina, epicatequina, cinchonaína Ia, cinchonaína Ib, cinchonaína IIa e cinchonaína IIb nas variações da concentração e pH do tampão borato; das substâncias cinchonaína Ia e cinchonaína Ib na variação do gradiente de voltagem de 5 kV, e das substâncias catequina, epicatequina, cinchonaína IIa e cinchonaína IIb na variação do gradiente de voltagem de 30 kV. Análises estatísticas (ANOVA e teste de Tukey) foram realizadas para avaliar a ocorrência de alterações significativas em relação às condições eletroforéticas previamente estabelecidas.

#### 4.8 Estabilidade da solução amostra e da solução do padrão interno

Para avaliação da estabilidade, analisaram-se amostras da solução de FAE 1  $\text{mg ml}^{-1}$  e da solução do padrão de ácido gálico 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  mantidas em temperatura ambiente e refrigeração por 24, 48 e 72 h. Os resultados obtidos com relação à área e tempo de migração das substâncias catequina, epicatequina, PB2, cinchonaína Ia, cinchonaína Ib, cinchonaína IIa, cinchonaína IIb e ácido gálico foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém preparadas. Análises estatísticas (ANOVA e teste de Tukey) foram realizadas para avaliar a ocorrência de alterações significativas durante o período avaliado.

#### **4.9 Recuperação do procedimento de preparo da amostra e quantificação de polifenóis da FAE de *T. catigua***

Para avaliação da recuperação do procedimento de preparo da amostra, analisaram-se amostras de ácido gálico nas concentrações de 20, 60 e 120  $\mu\text{g ml}^{-1}$  submetidas ao processo de extração por fase sólida (cartucho C18), em triplicata. Os resultados obtidos foram comparados com soluções não extraídas e expressos em porcentagem. As áreas médias obtidas para as substâncias catequina, epicatequina, PB2, cinchonaína IIa e cinchonaína IIb (n=3) foram corrigidas e o teor foi dado em equivalentes de ácido gálico, conforme equação da reta.

#### **4.10 Análise estatística**

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas e quantitativas (teor de polifenóis totais, taninos totais e capacidade antioxidante), expressos como a média  $\pm$  desvio padrão da média foram analisados utilizando o programa Excel®, versão 2007 (Microsoft Office). A análise estatística dos dados de validação e estabilidade foi realizada utilizando o programa Statistica®, versão 8.0 (StatSoft Office Inc.). Os resultados de linearidade foram obtidos por análise de regressão linear simples. Os resultados de robustez e estabilidade foram avaliados por análise de variância unilateral (one-way ANOVA). As diferenças significativas foram determinadas através do teste de Tukey e  $p < 0,05$  foi considerado como critério de significância.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Controle de Qualidade

#### 5.1.1 Análises físico-químicas

Os resultados das análises de determinação de material estranho, determinação da perda por dessecação, determinação de cinzas totais, determinação de cinzas insolúveis em ácido e determinação do teor de extrativos são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados dos ensaios físico-químicos realizados para o controle de qualidade de cascas de *T. catigua*.

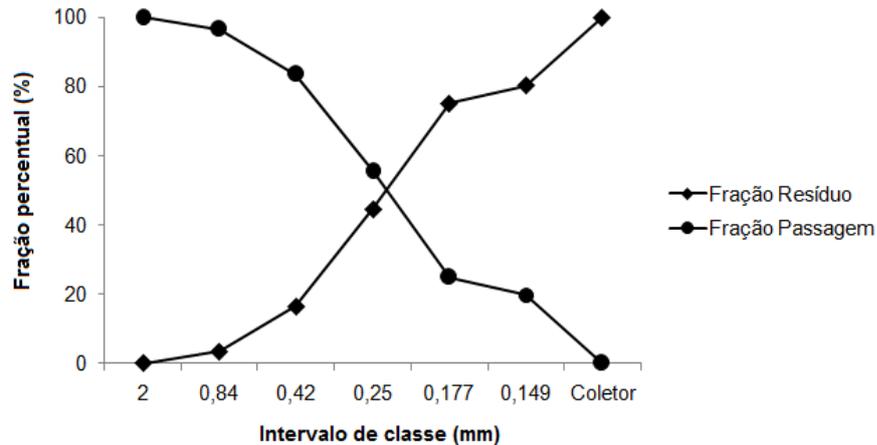
Ensaio	Resultados
Determinação de material estranho (%)	25,9
Determinação da perda por dessecação [ $\bar{x}\% \pm dp(CV\%)$ ]	11,61 $\pm$ 0,25 (2,17)
Determinação de cinzas totais [ $\bar{x}\% \pm dp(CV\%)$ ]	5,15 $\pm$ 0,07 (1,29)
Determinação de cinzas insolúveis em ácido	Não quantificáveis
Determinação do teor de extrativos [ $\bar{x}\%(m.v^{-1}) \pm dp(CV\%)$ ]	25,99 $\pm$ 0,87 (3,34)

A análise granulométrica do pó das cascas de *T. catigua* forneceu os resultados expressos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Análise granulométrica por tamisação das cascas de *T. catigua* moídas por moinho de martelos.

Abertura de malha M (mm)	Classe granulométrica CG (mm)	Intervalo de abertura de malha $\Delta m$ (mm)	Dimensão granulométrica média $\bar{m}$ (mm)	Fração retida percentual F (%)	Fração resíduo percentual R (%)	Fração passagem percentual P (%)
2,000	2,000 – 3,000	1,000	2,500	0,13	0,13	99,87
0,840	0,840 – 2,000	1,160	1,420	3,33	3,46	96,54
0,420	0,420 – 0,840	0,420	0,630	13,06	16,52	83,48
0,250	0,250 – 0,420	0,170	0,335	27,98	44,50	55,50
0,177	0,177 – 0,250	0,023	0,213	30,60	75,10	24,90
0,149	0,149 – 0,177	0,028	0,163	5,13	80,23	19,77
Coletor	0,000 – 0,149	0,149	0,074	19,77	100	0,00

A figura 8 representa as curvas características de retenção e passagem da droga rasurada através da análise granulométrica por tamisação, empregando-se os dados fornecidos pela Tabela 2. O diâmetro médio de partícula calculado a partir do ponto de intersecção das retas foi de 0,237 mm.



**Figura 8.** Curvas cumulativas de resíduo e passagem após a tamisação da matéria-prima vegetal.

### 5.1.2 Análises químicas quantitativas

Avaliou-se o teor de polifenóis totais (PT) e taninos totais (TT) das cascas, EB e FAE de *T. catigua*. Os resultados encontram-se na Tabela 3.

**Tabela 3.** Teor médio de polifenóis totais e taninos totais encontrados em cascas, EB e FAE de *T. catigua*.

Amostra	Polifenóis totais [ $\bar{x}\% \pm dp(CV\%)$ ]	Taninos totais [ $\bar{x}\% \pm dp(CV\%)$ ]
Cascas	9,54 $\pm$ 0,24 (2,50)	7,07 $\pm$ 0,07 (0,93)
EB	42,34 $\pm$ 0,27 (0,63)	31,42 $\pm$ 0,37 (1,16)
FAE	68,86 $\pm$ 1,79 (2,60)	49,72 $\pm$ 2,10 (4,17)

Com relação à capacidade antioxidante do EB e FAE frente ao radical DPPH, os resultados obtidos podem ser vistos na Tabela 4.

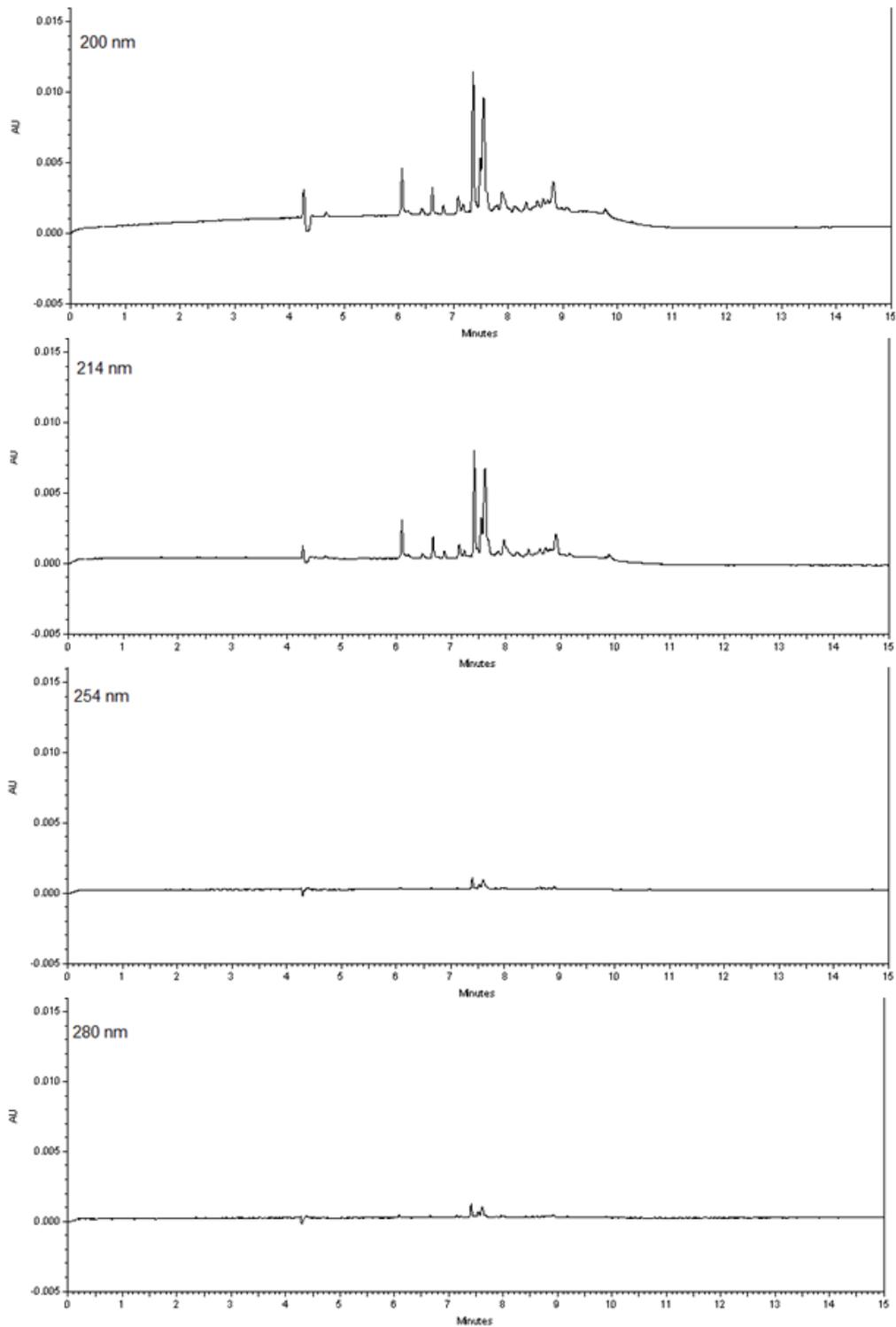
**Tabela 4.** Capacidade antioxidante média encontrada para o EB e FAE de *T. catigua* e substâncias de referência.

Amostra	IC <sub>50</sub> médio [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ (CV%)]
EB	6,72 $\pm$ 0,28 (4,17)
FAE	4,47 $\pm$ 0,07 (1,58)
Vitamina C	4,21 $\pm$ 0,15 (3,69)
Trolox	6,62 $\pm$ 0,07 (1,11)

## 5.2 Desenvolvimento de metodologia analítica por Eletroforese Capilar

### 5.2.1 Comprimento de onda ( $\lambda$ )

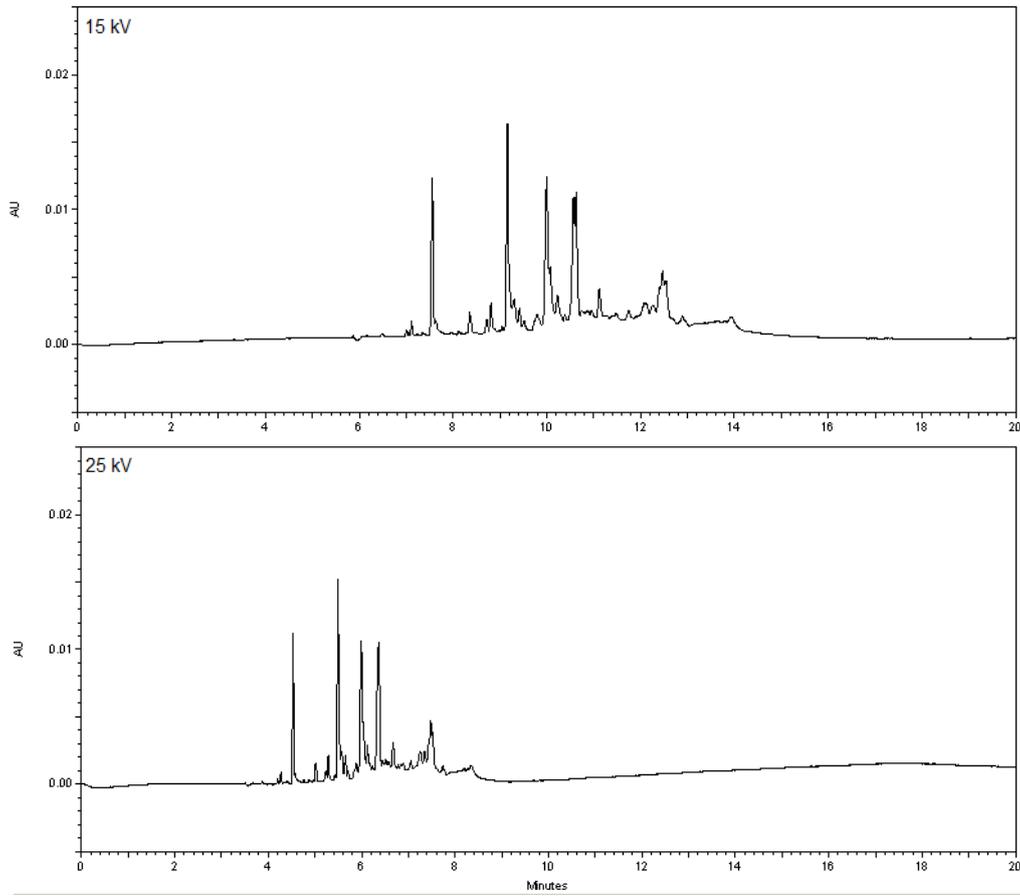
Quatro  $\lambda$  foram testados: 200, 214, 254 e 280 nm. Os eletroferogramas obtidos podem ser vistos na figura 9.



**Figura 9.** Eletroferogramas da FAE de *T. catigua* com detecção a 200, 214, 254 e 280 nm. Condições eletroforéticas: tampão borato  $50 \text{ mmol l}^{-1}$ ; pH 8,5; voltagem: 20 kV a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção: 5 s (0,5 psi); FAE:  $500 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ .

### 5.2.2 Voltagem

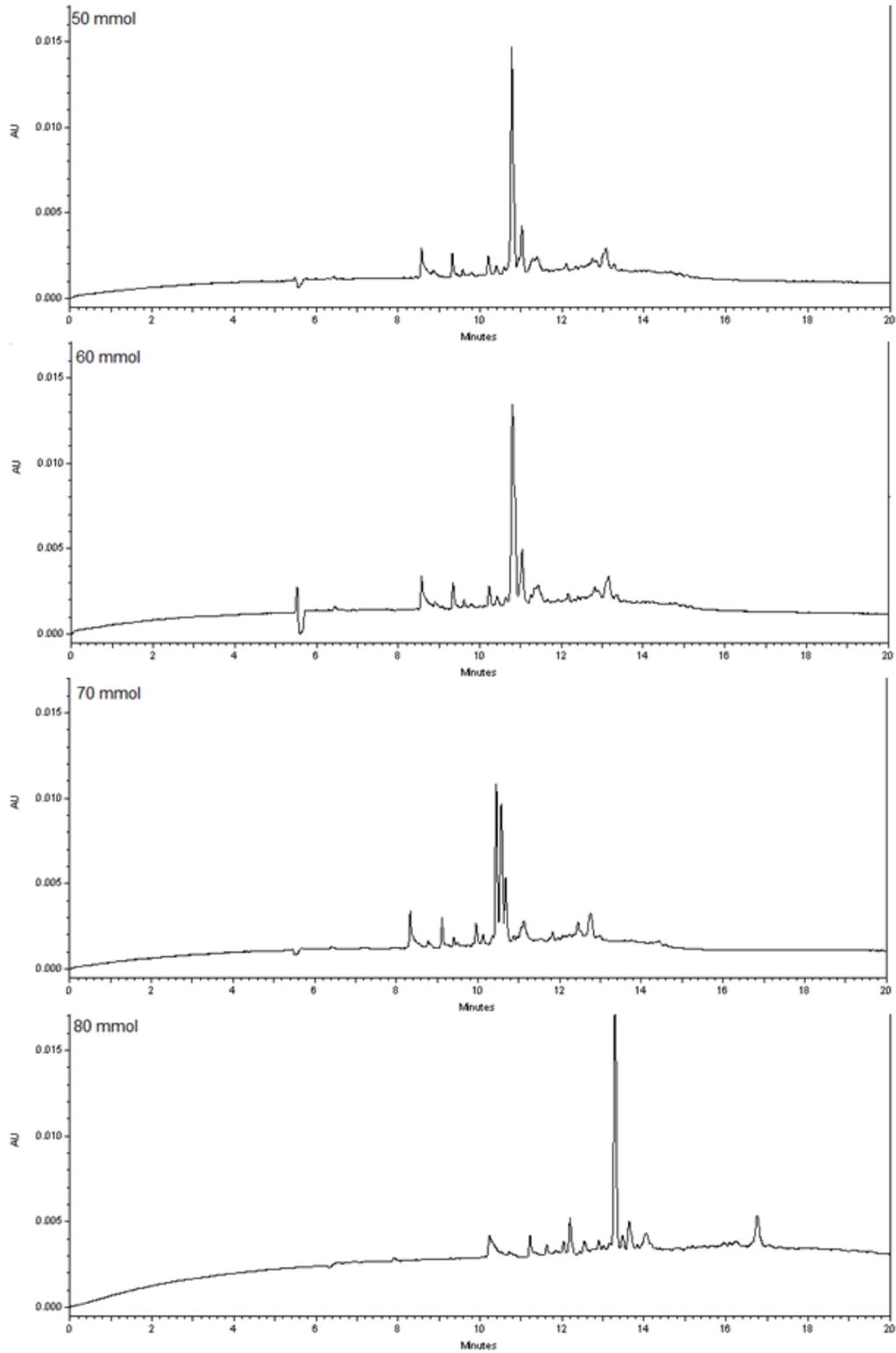
A figura 10 apresenta os eletroferogramas que avaliam o efeito de diferentes voltagens (15 kV e 25 kV) sobre amostras da FAE de *T. catigua*.



**Figura 10.** Eletroferogramas da FAE de *T. catigua* submetida a diferentes voltagens. Condições eletroforéticas: tampão borato  $80 \text{ mmol l}^{-1}$ ; pH 8,6; voltagem: 15 e 25 kV a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE:  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ .

### 5.2.3 Concentração do tampão

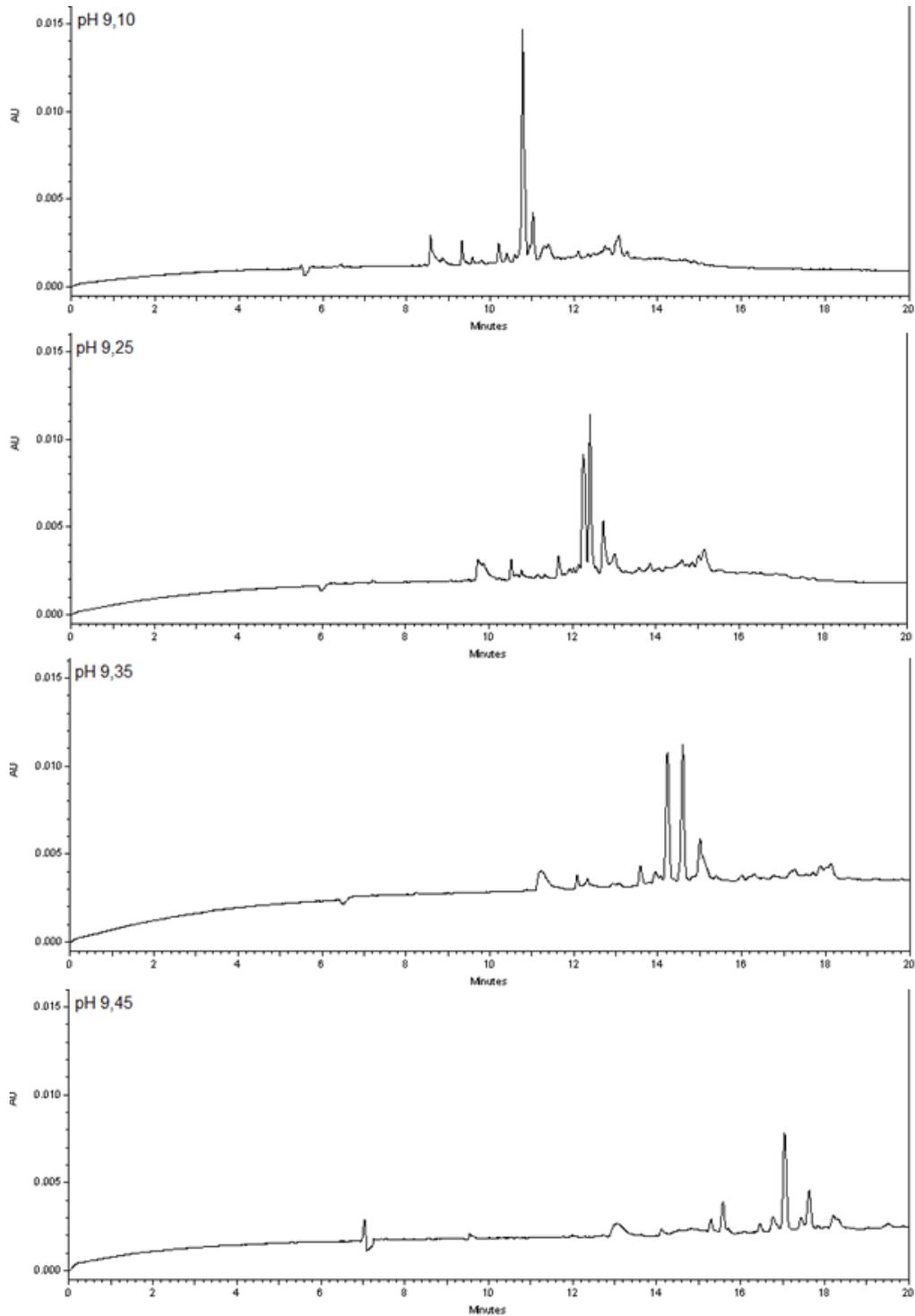
A figura 11 mostra o efeito de diferentes concentrações do tampão borato (50, 60, 70, e  $80 \text{ mmol l}^{-1}$ ) em amostras de FAE de *T. catigua*.



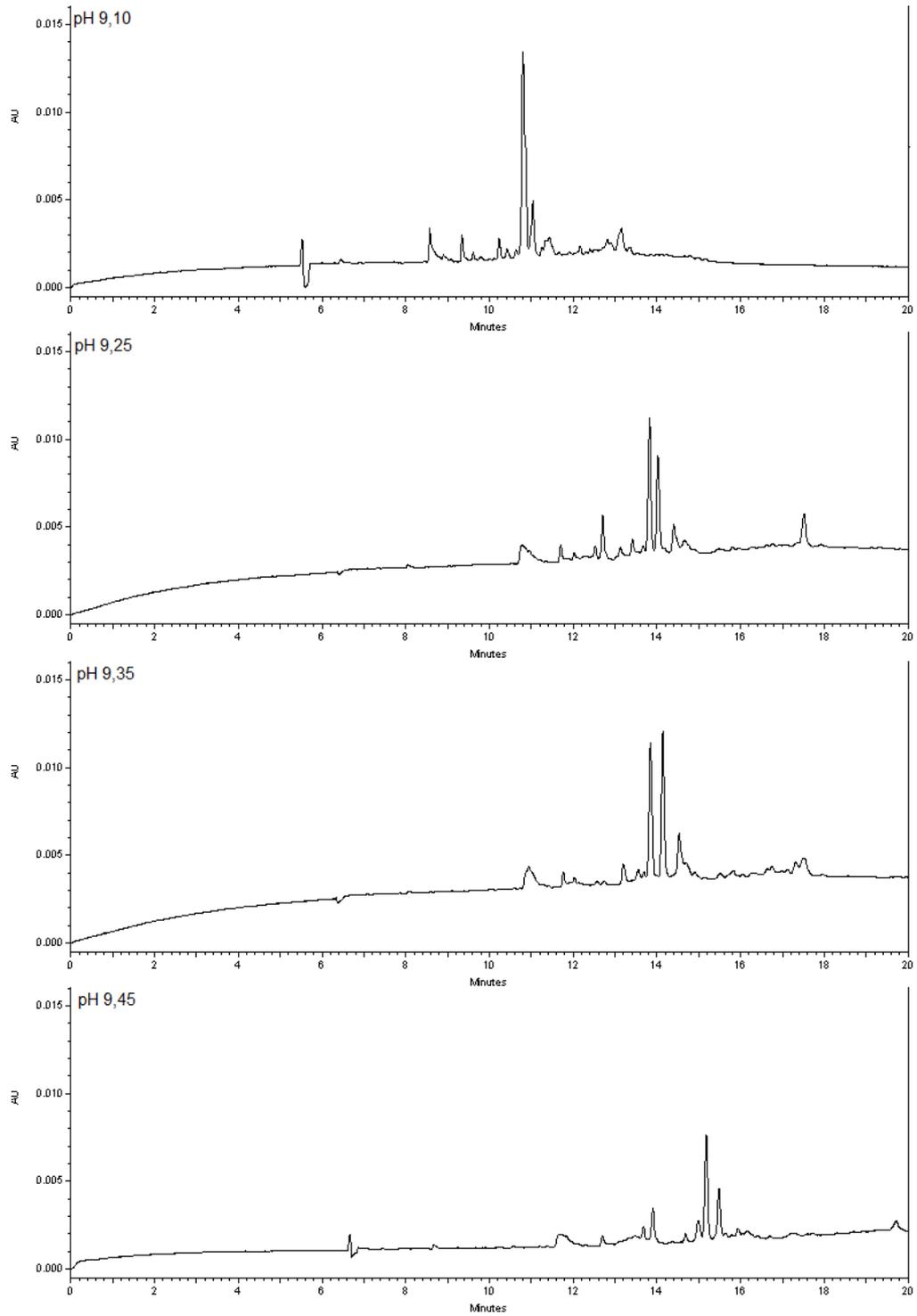
**Figura 11.** Eletroferogramas da FAE de *T. catigua* em diferentes concentrações da solução eletrolítica. Condições eletroforéticas: tampão borato 50, 60, 70, e 80 mmol l<sup>-1</sup>; pH 9,1; voltagem: 18 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 500 µg ml<sup>-1</sup>.

### 5.2.4 pH do tampão

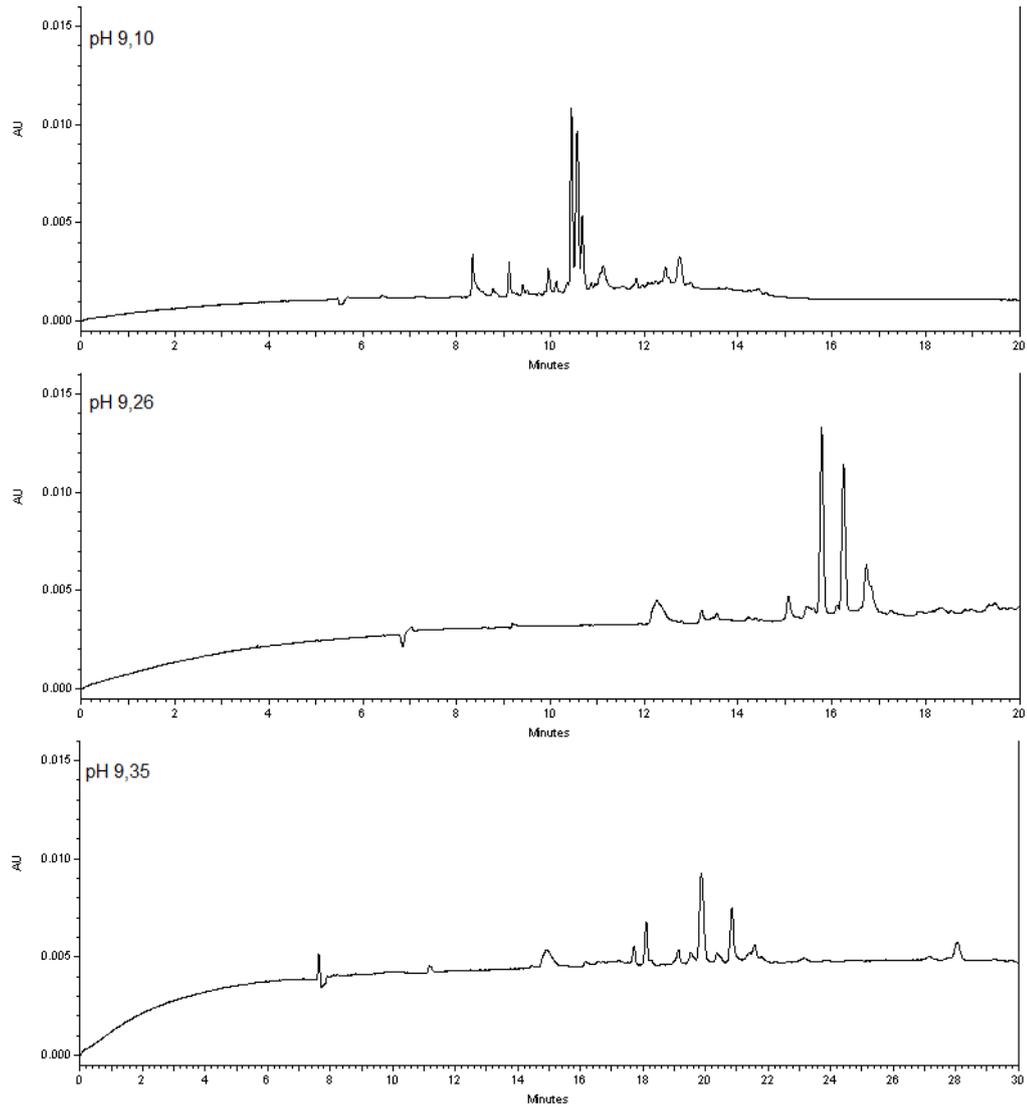
A influência do pH do tampão foi avaliada em soluções eletrolíticas na concentração de 50, 60, 70 e 80 mmol l<sup>-1</sup> e podem ser vistos nas figuras 12, 13, 14 e 15.



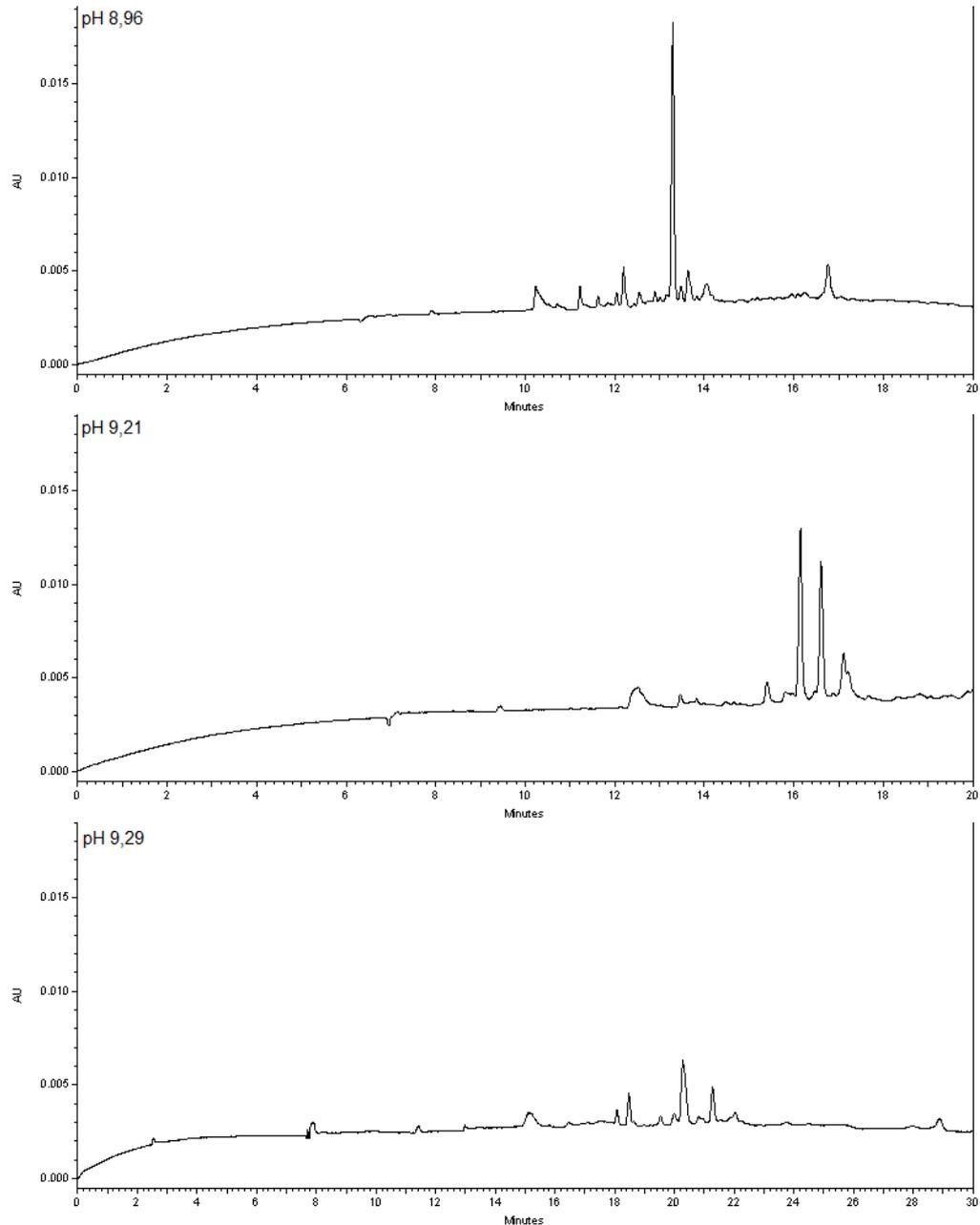
**Figura 12.** Eletroferogramas da FAE de *T. catigua* em diferentes pH da solução eletrolítica. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l<sup>-1</sup>; pH 9,10; 9,25; 9,35; 9,45; voltagem: 18 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 500 µg ml<sup>-1</sup>.



**Figura 13.** Eletroferogramas da FAE de *T. catigua* em diferentes pH da solução eletrolítica. Condições eletroforéticas: tampão borato 60 mmol l<sup>-1</sup>; pH 9,10; 9,25; 9,35; 9,45; voltagem: 18 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 500 µg ml<sup>-1</sup>.



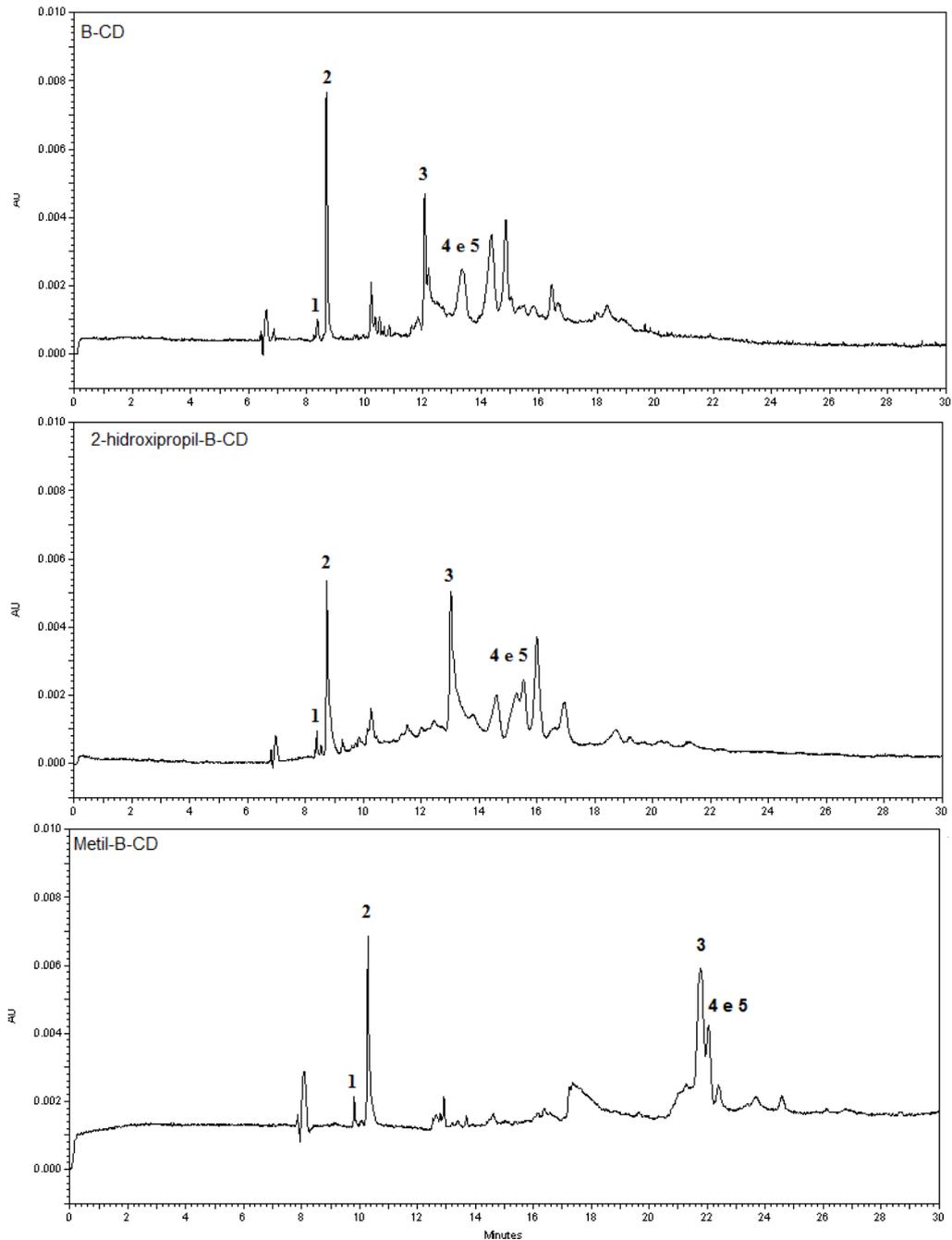
**Figura 14.** Eletroferogramas da FAE de *T. catigua* em diferentes pH da solução eletrolítica. Condições eletroforéticas: tampão borato  $70 \text{ mmol l}^{-1}$ ; pH 9,10; 9,26; 9,35; voltagem: 18 kV a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE:  $500 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ .



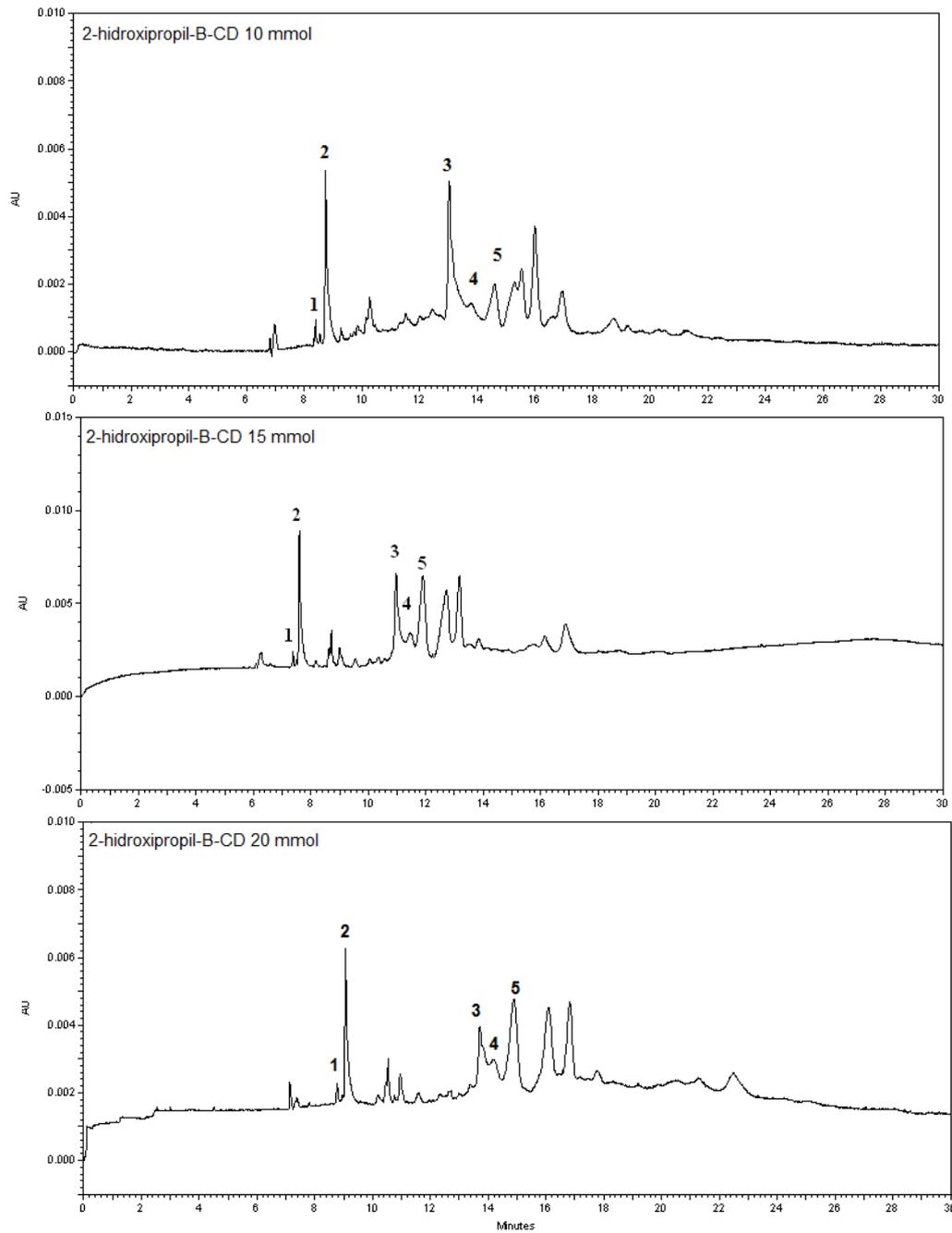
**Figura 15.** Eletroferogramas da FAE de *T. catigua* em diferentes pH da solução eletrolítica. Condições eletroforéticas: tampão borato  $80 \text{ mmol l}^{-1}$ ; pH 8,96; 9,21; 9,29; voltagem: 18 kV a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE:  $500 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ .

### 5.2.5 Tipo e concentração de seletor quiral

Três tipos de CD foram testadas:  $\beta$ -CD, metil- $\beta$ -CD e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -CD, nas concentrações de 10, 15 e  $20 \text{ mmol l}^{-1}$ . Os melhores resultados podem ser vistos nas figuras 16 e 17.



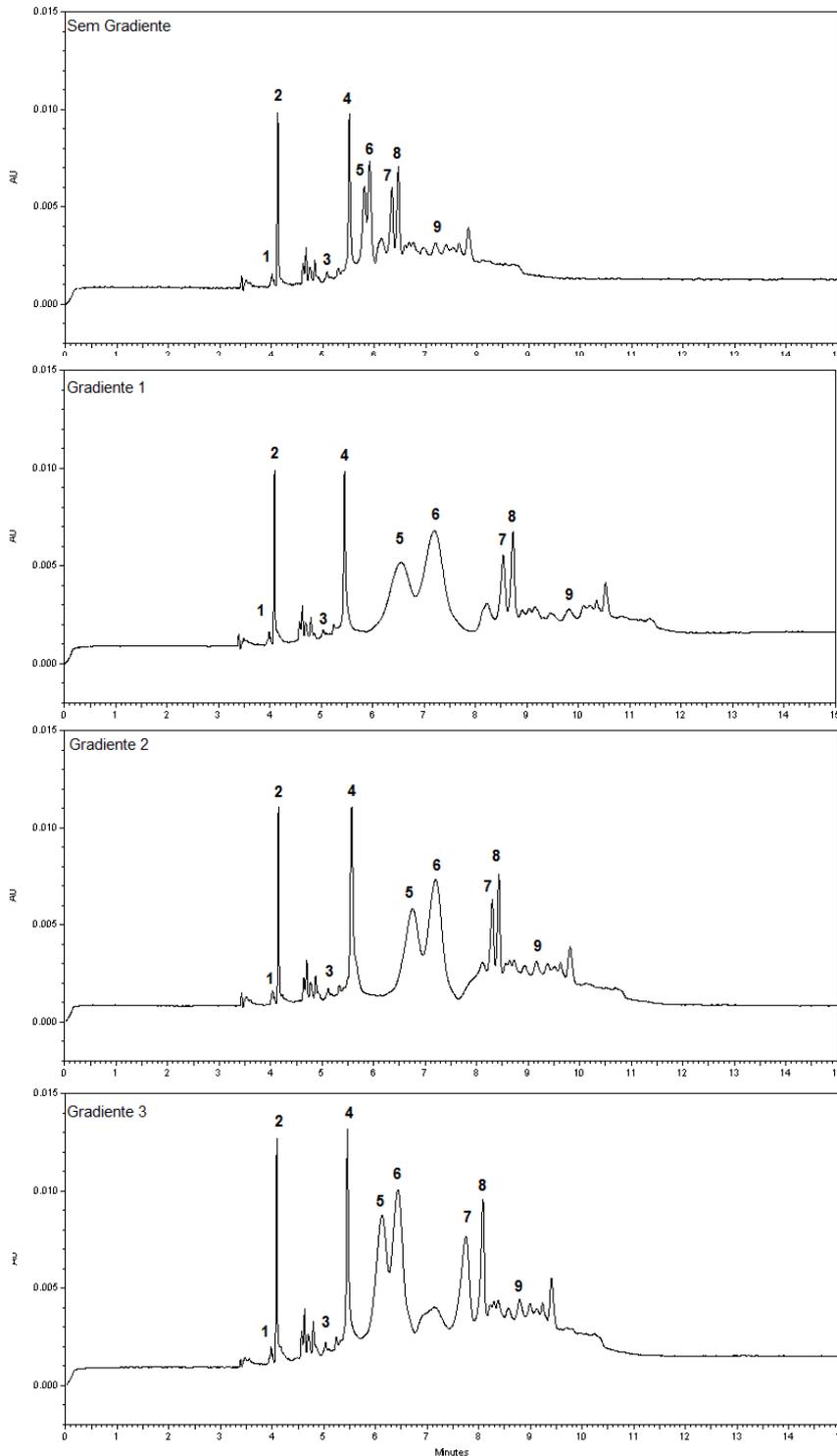
**Figura 16.** Eletroferogramas da FAE de *T. catigua* com diferentes tipos de  $\beta$ -CD na concentração  $10 \text{ mmol l}^{-1}$ . Picos: 1) catequina, 2) epicatequina, 3) procianidina B2, 4) cinchonaína Ia, 5) cinchonaína Ib. Condições eletroforéticas: tampão borato  $70 \text{ mmol l}^{-1}$ ; pH 9,26; voltagem: 20 kV a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção: 5 s ( $0,5 \text{ psi}$ ); detecção: 214 nm; FAE:  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ .



**Figura 17.** Eletroferogramas da FAE de *T. catigua* com diferentes concentrações de 2-hidroxi-propil-β-CD. Picos: 1) catequina, 2) epicatequina, 3) procianidina B2, 4) cinchonaína Ia, 5) cinchonaína Ib. Condições eletroforéticas: tampão borato 70 mmol l<sup>-1</sup>; pH 9,26; voltagem: 20 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 1 mg ml<sup>-1</sup>.

### 5.2.6 Gradiente de voltagem

Os gradientes de voltagem foram avaliados conforme esquema apresentado no Quadro 4 (pág. 49). Os eletroferogramas obtidos podem ser vistos na figura 18.



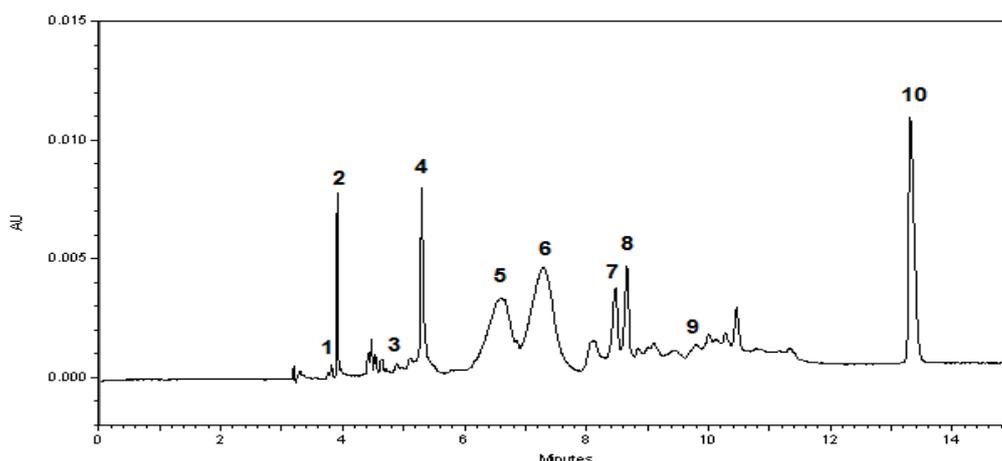
**Figura 18.** Eletroferogramas da FAE de *T. catigua* com diferentes gradientes de voltagem. Picos: 1) catequina, 2) epicatequina, 3) ácido clorogênico, 4) procianidina B2, 5) cinchonaína Ia, 6) cinchonaína Ib, 7) cinchonaína IIa, 8) cinchonaína IIb, 9) procianidina B1. Condições eletroforéticas: tampão borato  $80 \text{ mmol l}^{-1}$ ; pH 8,80; 2-hidroxiopropil- $\beta$ -CD  $10 \text{ mmol l}^{-1}$ ;  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE:  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ .

A Tabela 5 mostra os valores de tempo de migração ( $T_m$ ) e resolução ( $R_s$ ) das cinchonaínas Ia e Ib nos diferentes sistemas testados.

**Tabela 5.** Tempo de migração e resolução das cinchonaínas Ia e Ib nos diferentes sistemas testados.

Substância	Gradiente 1		Gradiente 2		Gradiente 3	
	$T_m$	$R_s$	$T_m$	$R_s$	$T_m$	$R_s$
Cinchonaína Ia	6,55	3,03	6,75	3,55	6,13	2,39
Cinchonaína Ib	7,20	0,97	7,20	0,83	6,43	0,66

As condições eletroforéticas estabelecidas para validação da metodologia foram: tampão borato 80 mmol l<sup>-1</sup>; pH 8,80; 2-hidroxiopropil- $\beta$ -CD 10 mmol l<sup>-1</sup>; 30 kV por 5,7 min, 5 kV por 2 min e 30 kV por 7,3 min a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 1 mg ml<sup>-1</sup>. O perfil eletroforético definido com o padrão interno (ácido gálico) pode ser visto na figura 19.



**Figura 19.** Perfil eletroforético da FAE de *T. catigua*. Picos: 1) catequina, 2) epicatequina, 3) ácido clorogênico, 4) procianidina B2, 5) cinchonaína Ia, 6) cinchonaína Ib, 7) cinchonaína IIa, 8) cinchonaína IIb, 9) procianidina B1, 10) ácido gálico 120  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> (padrão interno).

### 5.2.7 Determinação dos parâmetros eletroforéticos

A velocidade do fluxo eletroosmótico ( $V_{EOF}$ ) determinada foi de 0,247 cm s<sup>-1</sup> e a mobilidade eletroosmótica ( $\mu_{EOF}$ ) foi de 4,96 10<sup>-4</sup> cm<sup>2</sup> V<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. A corrente elétrica aplicada foi de aproximadamente 35  $\mu$ A sob voltagem de 30 kV e 6  $\mu$ A sob voltagem de 5 kV.

A velocidade aparente de migração ( $V_{ap}$ ), a velocidade eletroforética ( $V_e$ ), a mobilidade eletroforética ( $\mu_e$ ) e a mobilidade total ( $\mu_{ap}$ ) das substâncias catequina, epicatequina, ácido clorogênico, PB2, cinchonaínas Ia, Ib, IIa e IIb, PB1 e ácido gálico encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6.** Parâmetros eletroforéticos do padrão interno e polifenóis da FAE de *T. catigua*.

Substância	$T_m$ (s)	$V_{ap}$ (cm s <sup>-1</sup> )	$V_e$ (cm s <sup>-1</sup> )	$\mu_e$ (cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$\mu_{ap}$ (cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Catequina	231,0	0,216	-0,031	-6,13 10 <sup>-5</sup>	4,34 10 <sup>-4</sup>
Epicatequina	237,6	0,210	-0,037	-7,33 10 <sup>-5</sup>	4,22 10 <sup>-4</sup>
Ácido clorogênico	295,2	0,169	-0,078	-1,56 10 <sup>-4</sup>	3,40 10 <sup>-4</sup>
PB2	330,6	0,151	-0,096	-1,92 10 <sup>-4</sup>	3,03 10 <sup>-4</sup>
Cinchonaína Ia	393,0	0,127	-0,120	-2,40 10 <sup>-4</sup>	2,55 10 <sup>-4</sup>
Cinchonaína Ib	432,0	0,116	-0,131	-2,63 10 <sup>-4</sup>	2,32 10 <sup>-4</sup>
Cinchonaína IIa	520,8	0,096	-0,151	-3,03 10 <sup>-4</sup>	1,93 10 <sup>-4</sup>
Cinchonaína IIb	532,2	0,094	-0,153	-3,07 10 <sup>-4</sup>	1,88 10 <sup>-4</sup>
PB1	595,8	0,084	-0,163	-3,27 10 <sup>-4</sup>	1,68 10 <sup>-4</sup>
Ácido gálico	811,8	0,062	-0,185	-3,72 10 <sup>-4</sup>	1,23 10 <sup>-4</sup>

### 5.3 Validação da metodologia analítica

#### 5.3.1 Especificidade e seletividade

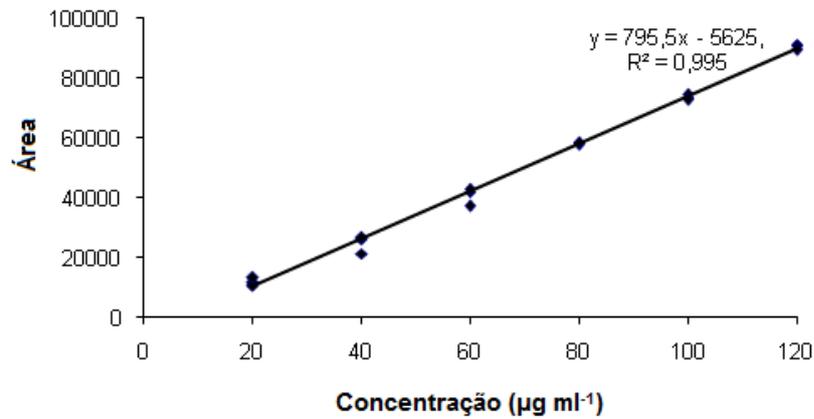
Na Tabela 7 encontram-se os valores dos parâmetros 1) Coeficiente de variação do tempo de retenção, 2) Coeficiente de variação da área, 3) Resolução, 4) Eficiência (Pratos Teóricos) e 5) Assimetria das substâncias catequina, epicatequina, PB2, cinchonaína Ia, cinchonaína Ib, cinchonaína IIa, cinchonaína IIb e ácido gálico (100 µg ml<sup>-1</sup>).

**Tabela 7.** Parâmetros avaliados para determinação de especificidade da metodologia desenvolvida.

Substância (n=5)	CV $T_r$ (%)	CV área (%)	$R_s$	$P_t$	Assimetria
Catequina	0,15	4,16	3,52	50949	0,00
Epicatequina	0,19	3,41	2,00	159545	0,00
PB2	0,26	2,50	2,60	100211	1,26
Cinchonaína Ia	1,31	1,74	3,03	1586	0,00
Cinchonaína Ib	1,30	4,25	0,97	1906	0,00
Cinchonaína IIa	0,24	3,82	1,36	49241	0,00
Cinchonaína IIb	0,24	3,99	1,34	77960	0,00
Ácido gálico	0,13	2,61	13,1	93532	1,78
<b>Referência (ICH)</b>	-	-	<b>&gt; 2</b>	<b>&gt; 2000</b>	<b>≤ 2</b>

#### 5.3.2 Linearidade

A curva de calibração obtida a partir da análise de seis concentrações (20, 40, 60, 80, 100 e 120 µg ml<sup>-1</sup>) do ácido gálico está representada na figura 20.



**Figura 20.** Representação da curva de calibração do ácido gálico, com coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e equação da reta.

O coeficiente de correlação ( $r$ ) obtido foi igual a 0,997. Os resultados da análise estatística do modelo e a falta de ajuste encontram-se na Tabela 8.

**Tabela 8.** Análise estatística do modelo e falta de ajuste na linearidade do ácido gálico.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	P-valor
Modelo	1	$1,33 \cdot 10^{10}$	$1,33 \cdot 10^{10}$	3301,663	$5,76 \cdot 10^{-20*}$
Resíduo	16	$6,44 \cdot 10^7$	$4,02 \cdot 10^6$		
Falta de ajuste	4	$2,19 \cdot 10^7$	$5,48 \cdot 10^6$	1,547	0,251
Erro puro	12	$4,25 \cdot 10^7$	$3,54 \cdot 10^6$		

Nota: \*p-valor significativo a 5%.

### 5.3.3 Precisão

Os resultados da precisão intra-corrída (repetibilidade) e inter-corrída (precisão intermediária) estão expressos na Tabela 9. Pela análise estatística (ANOVA), os resultados não apresentaram diferença significativa entre os dias para determinação do ácido gálico ( $p=0,86$ ,  $p>0,05$ ).

**Tabela 9.** Repetibilidade e precisão intermediária do ácido gálico.

Dia	Amostra	Concentração ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Repetibilidade $\bar{x}\% \pm dp[\text{CV}\%]$	Precisão intermediária $\bar{x}\% \pm dp[\text{CV}\%]$
1	1	123,85	121,98 $\pm$ 3,08 [2,53]	122,16 $\pm$ 3,44 [2,81]
	2	119,45		
	3	122,25		
	4	120,62		
	5	126,97		
	6	118,71		
2	1	120,20	122,34 $\pm$ 4,05 [3,31]	
	2	127,78		
	3	126,46		
	4	121,44		
	5	121,15		
	6	117,00		

### 5.3.4 Limite de detecção, limite de quantificação e intervalo de quantificação

O limite de detecção, limite de quantificação e intervalo de quantificação do ácido gálico definidos neste trabalho encontram-se na Tabela 10.

**Tabela 10.** Limite de detecção, limite de quantificação e intervalo de quantificação do ácido gálico.

Substância	Intercepto	Inclinação da reta	LD ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Intervalo ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
Ácido gálico	-4031,1	953,98	5,19	17,29	20 – 120
	-4228,0	784,78			
	-5746,3	663,13			
	-5935,9	754,74			
	-2643,7	764,90			
$\bar{x} \pm dp$	-4517,0 $\pm$ 1355,8	784,3 $\pm$ 105,74	-	-	-

### 5.3.5 Exatidão

Os resultados do ensaio de exatidão para o ácido gálico são apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Concentrações obtidas e exatidão do ácido gálico.

	Concentração teórica ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Concentração experimental ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Exatidão (%)
Concentração baixa	20	20,62	100,92
		19,98	
		19,95	
Concentração média	60	60,86	99,69
		59,79	
		58,79	
Concentração alta	120	120,20	100,78
		121,44	
		121,15	

### 5.3.6 Robustez

Análise de variância unilateral (one-way ANOVA) e teste de Tukey mostraram que a variação na concentração do tampão borato ( $80 \text{ mmol l}^{-1} \pm 4 \text{ mmol l}^{-1}$ ) alterou significativamente ( $p < 0,05$ ) as áreas e tempos de migração das substâncias catequina ( $p = 8 \cdot 10^{-6}$ ;  $p = 0,000$ ), epicatequina ( $p = 4,2 \cdot 10^{-5}$ ;  $p = 0,000$ ), PB2 ( $p = 3,54 \cdot 10^{-4}$ ;  $p = 0,000$ ), cinchonaína la ( $p = 4 \cdot 10^{-6}$ ;  $p = 3,04 \cdot 10^{-4}$ ), cinchonaína lb ( $p = 1,35 \cdot 10^{-3}$ ;  $p = 1,96 \cdot 10^{-4}$ ), cinchonaína Ila ( $p = 0,015$ ;  $p = 0,000$ ) e cinchonaína IIb ( $p = 3,73 \cdot 10^{-3}$ ;  $p = 0,000$ ), respectivamente.

Com relação às variações no pH do tampão borato ( $\text{pH } 8,8 \pm 0,1$ ), a análise estatística evidenciou que todas as substâncias sofreram alterações significativas nos respectivos tempos de migração ( $p = 0,000$ ;  $p < 0,05$ ). As substâncias catequina ( $p = 7,7 \cdot 10^{-5}$ ), cinchonaína lb ( $p = 1,3 \cdot 10^{-4}$ ), cinchonaína Ila ( $p = 7,0 \cdot 10^{-5}$ ) e cinchonaína IIb ( $p = 2,17 \cdot 10^{-4}$ ) tiveram suas áreas significativamente alteradas ( $p < 0,05$ ). Somente as áreas das substâncias epicatequina ( $p = 0,374$ ), PB2 ( $p = 0,147$ ) e cinchonaína la ( $p = 0,091$ ) sofreram alterações não significativas ( $p > 0,05$ ).

A variação no gradiente de voltagem de  $5 \pm 0,1 \text{ kV}$  alterou significativamente a área da substância cinchonaína lb ( $p = 0,003$ ;  $p < 0,05$ ), mas não alterou a área da substância cinchonaína la ( $p = 0,062$ ;  $p > 0,05$ ) e os tempos de migração das substâncias cinchonaína la e cinchonina lb ( $p = 0,338$ ;  $p = 0,791$ , respectivamente).

A variação no gradiente de voltagem de  $30 \text{ kV}$  para  $29 \text{ kV}$  alterou significativamente os tempos de migração de todas as substâncias avaliadas ( $p = 0,000$ ;  $p < 0,05$ ). As áreas das substâncias catequina ( $p = 0,021$ ) e cinchonaína IIb ( $p = 0,006$ ) sofreram alterações significativas ( $p < 0,05$ ). As áreas das substâncias epicatequina ( $p = 0,786$ ), PB2 ( $0,506$ ) e cinchonaína Ila ( $0,072$ ) sofreram alterações não significativas ( $p > 0,05$ ).

## 5.4 Estabilidade da solução amostra e da solução do padrão interno

Com relação ao tempo de migração das substâncias monitoradas (catequina, epicatequina, PB2, cinchonaína la, cinchonaína lb, cinchonaína Ila, cinchonaína IIb e ácido gálico), tanto a solução amostra quanto a solução do padrão interno, mantidas em condições ambiente e sob refrigeração, apresentaram alterações significativas ( $p < 0,05$ ) após 24 h de preparo da solução.

Com relação às áreas, as substâncias catequina, PB2, cinchonaína la, cinchonaína lb, cinchonaína Ila e ácido gálico apresentaram alterações significativas ( $p < 0,05$ ) nas condições avaliadas. Somente as áreas da epicatequina ( $p = 0,096$ ) mantida sob refrigeração e da cinchonaína IIb ( $p = 0,058$ ) mantida em temperatura ambiente não apresentaram alterações significativas ( $p > 0,05$ ) durante o período avaliado (72h).

### 5.5 Recuperação do procedimento de preparo da amostra e quantificação de polifenóis da FAE de *T. catigua*

Os dados avaliados para cálculo da recuperação do procedimento de preparo da amostra estão apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Recuperação do procedimento de preparo da amostra.

Concentração ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Área não extraída $\bar{x}\% \pm dp[\text{CV}\%]$	Área extraída $\bar{x}\% \pm dp[\text{CV}\%]$	Recuperação (%)
20	15703 $\pm$ 387,74 [2,47]	14294,5 $\pm$ 129,4 [0,91]	91,03
60	51360 $\pm$ 709,52 [1,38]	45284,5 $\pm$ 1392,29 [3,07]	88,17
120	111157,5 $\pm$ 4589,05 [4,13]	103398 $\pm$ 2620,00 [2,53]	93,01
<b>Recuperação média (%)</b>			90,74

A quantificação das substâncias catequina, epicatequina, PB2, cinchonaína IIa e cinchonaína IIb expressas em equivalentes de ácido gálico, encontra-se na Tabela 13.

**Tabela 13.** Quantificação de polifenóis da FAE de *T. catigua* expressos em equivalentes de ácido gálico.

Substância	Área extraída $\bar{x}\% \pm dp[\text{CV}\%]$	Área não extraída estimada $\bar{x}\% \pm dp[\text{CV}\%]$	Concentração ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
Catequina	1452,25 $\pm$ 60,43 [4,16]	1600,45 $\pm$ 66,60 [4,16]	9,08 $\pm$ 0,08 [0,92]
Epicatequina	13542,80 $\pm$ 461,30 [3,41]	14924,84 $\pm$ 508,38 [3,41]	25,83 $\pm$ 0,64 [2,47]
PB2	29563,00 $\pm$ 738,92 [2,50]	32579,90 $\pm$ 814,32 [2,50]	48,03 $\pm$ 1,02 [2,13]
Cinchonaína IIa	15710,00 $\pm$ 600,18 [3,82]	17313,20 $\pm$ 661,43 [3,82]	28,83 $\pm$ 0,83 [2,88]
Cinchonaína IIb	15410,67 $\pm$ 614,82 [3,99]	16983,32 $\pm$ 677,56 [3,99]	28,42 $\pm$ 0,85 [3,00]

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Controle de Qualidade

Entende-se por qualidade o conjunto de especificações que permite a total adequabilidade de determinado produto ao fim a que se destina (FARIAS, 2007; SONAGLIO et al., 2007; YUNES; CECHINEL FILHO, 2012). Com relação às drogas vegetais, o controle de qualidade apresenta algumas dificuldades devido à complexidade química e variabilidade na composição, contudo é essencial para assegurar a qualidade tanto da matéria-prima quanto do produto final e evitar problemas à saúde que vão desde efeitos nocivos à ineficácia terapêutica (CONSOLARO et al., 1999; DELAPORTE et al., 2001; NETTO et al., 2006; CARVALHO et al., 2007; FARIAS, 2007; SONAGLIO et al., 2007; YUNES; CECHINEL FILHO, 2012). Para tanto, deve-se utilizar metodologia descrita em farmacopeias (preferencialmente brasileira), outros compêndios oficiais e monografias complementares como as elaboradas pela Organização Mundial de Saúde (NETTO et al., 2006; CARVALHO et al., 2007; FARIAS, 2007; SONAGLIO et al., 2007).

Neste estudo, o controle de qualidade foi realizado empregando-se metodologias físico-químicas e quantitativas.

O primeiro procedimento realizado para controle físico-químico das cascas de *T. catigua* foi a determinação de material estranho à droga. Este ensaio é um meio simples de verificar as condições gerais da matéria-prima adquirida, principalmente em relação à identidade e pureza (FARIAS, 2007). A inspeção realizada considerou a coloração, consistência, indícios de deterioração e presença de contaminantes como fungos, insetos, outros materiais como partes da planta senão o farmacógeno (no caso, as cascas), e impurezas de origem mineral (pedras, areia ou terra) (FARIAS, 2007; FARMACOPEIA, 2010). Cerca de 26% do material recebido foi descartado. Boa parte do material desprezado (aproximadamente 95% da percentagem determinada) constituiu-se de droga vegetal com indícios, ainda que mínimos, de contaminação microbiológica (supostamente fungos). Este valor está muito acima dos 2% estipulados pela Farmacopeia Brasileira (2010), o que indica que a droga vegetal recebida não foi adequadamente processada, em termos de colheita, secagem e armazenamento.

Para evitar nova contaminação do material, repetiu-se a etapa de secagem da droga, submetendo-a a estufa por 24 h, a 40 °C. Cerca de 18 kg do material seco foram, então, moídos, obtendo-se um rendimento de 95,37% no processo. O pó obtido foi adequadamente armazenado em sacos de tecido e estocado em local limpo, seco e protegido da luz e de insetos. Amostras do pó foram submetidas aos demais ensaios para controle de qualidade.

A perda por dessecação é um parâmetro importante para avaliar a eficiência do processo de secagem (MELLO; PETROVICK, 2000; AUDI et al., 2001) e garantir a estabilidade química e microbiológica da droga durante o período de armazenamento, pois inibe enzimas e evita reações de hidrólise e crescimento de microrganismos (FARIAS, 2007; FARMACOPEIA, 1988). A Farmacopeia Brasileira (1988) estabelece o limite de umidade entre a faixa de 8 a 14%. Sonaglio e colaboradores (2007) sugerem que o teor de umidade deve ser menor que 12%. O valor médio obtido neste estudo foi de 11,61%, mostrando que as cascas moídas de *T. catigua* apresentam as condições ideais de umidade. Silva (2005) observou uma umidade de 11,11%, Lagos (2006) de 10,64% e Resende (2007) de 9,93% para as cascas de *T. catigua*.

A determinação de cinzas totais inclui a quantidade de cinzas fisiológicas (derivadas do tecido vegetal) e cinzas não-fisiológicas (areia e terra, por exemplo) inerentes à droga (DELAPORTE et al., 2001; FARMACOPEIA, 2010). O teor médio obtido foi de 5,15%. Já as cinzas insolúveis em ácido (composta por sílica e outros constituintes silicosos), apresentaram-se abaixo do limite detectável pela técnica. Lagos (2006) observou nas cascas de *T. catigua* um teor de cinzas totais e insolúveis em ácido ligeiramente maior (7,52% e 1,11%; respectivamente).

Na análise granulométrica do pó obtido, obteve-se partículas com diâmetro médio de 0,237 mm, consideravelmente menor que o diâmetro médio de 0,56 mm obtido por Resende (2007), empregando o mesmo moinho. Outra diferença observada foi quanto ao teor de extrativos utilizando água como veículo extrator. Neste estudo, o teor de extrativos foi de 25,99% (m v<sup>-1</sup>), enquanto Resende (2007) relatou um teor de 19,16%, utilizando metodologia idêntica.

Com relação às análises quantitativas, a Tabela 14 mostra que os teores de polifenóis totais e taninos encontrados em cascas, EB e FAE de *T. catigua* neste estudo foram menores que os encontrados por Resende (2007), em EB e FAE preparados no PALAFITO, por metodologia idêntica.

**Tabela 14.** Comparação entre o teor médio de polifenóis totais e taninos totais encontrados em cascas, EB e FAE de *T. catigua*.

Amostra	Polifenóis totais	Polifenóis totais (RESENDE, 2007)	Taninos	Taninos (RESENDE, 2007)
Cascas	9,54% ± 0,24	10,51% ± 0,17	7,07% ± 0,07	6,96% ± 0,11
EB	42,34% ± 0,27	48,96% ± 1,28	31,42% ± 0,37	38,89% ± 1,14
FAE	68,86% ± 1,79	90,98% ± 0,29	49,72% ± 2,10	69,36% ± 0,49

Lonni e colaboradores (2012) avaliaram o teor de polifenóis totais em quinze tipos de extratos produzidos com cascas de *T. catigua* e mostraram que o melhor veículo para

extração de polifenóis totais é aquele formado pela mistura quaternária dos solventes: água, metanol, acetona e etanol (em proporções iguais), resultando em um teor de polifenóis totais próximo a 50,8%. O extrato acetona: água (1:1 v v<sup>-1</sup>) apresentou um teor próximo a 44%. Brighente e colaboradores (2007) determinaram o teor de polifenóis totais (expressos como ácido gálico) no extrato hidroalcoólico de cascas de *T. catigua*. O valor encontrado foi de 486,07 mg de ácido gálico por grama de extrato seco.

De forma semelhante, pode-se observar diferenças quanto a capacidade antioxidante do EB e FAE frente ao DPPH. Neste trabalho, o IC<sub>50</sub> médio (µg ml<sup>-1</sup>) encontrado para o EB e FAE foram maiores que os encontrados em EB e FAE obtidos por metodologia idêntica, no PALAFITO em estudos anteriores (ALBRECHT et al., 2007; RESENDE, 2007), como pode ser visto na Tabela 15.

**Tabela 15.** Comparação entre a capacidade antioxidante média encontrada no EB e FAE de *T. catigua*.

Amostra	IC <sub>50</sub> médio (µg ml <sup>-1</sup> )	IC <sub>50</sub> médio (µg ml <sup>-1</sup> ) (ALBRECHT et al., 2007)	IC <sub>50</sub> médio (µg ml <sup>-1</sup> ) (RESENDE, 2007)
EB	6,72 ± 0,28	5,48 ± 0,04	5,49 ± 0,18
FAE	4,47 ± 0,07	3,79 ± 0,06	3,85 ± 0,09

Lonni e colaboradores (2012) observaram IC<sub>50</sub>=5,6 µg ml<sup>-1</sup> para extrato hidroacetônico (1:1, v v<sup>-1</sup>) de *T. catigua*. Contudo, a melhor capacidade antioxidante foi obtida por Brighente e colaboradores (2007), que relataram um IC<sub>50</sub>=2,1 µg ml<sup>-1</sup> para o extrato hidroalcoólico de *T. catigua*.

Em conjunto, as diferenças observadas tanto nos ensaios físico-químicos como nos ensaios quantitativos são comuns e podem estar associadas a variações na metodologia (ex.: temperatura, agitação, pH), equipamentos, solventes e reagentes e, principalmente, no material vegetal como: local de origem, composição do solo, condições de cultivo, disponibilidade hídrica e de nutrientes, intensidade e quantidade de incidência luminosa, variações sazonais, climáticas, genéticas e circadianas, idade e estágio de desenvolvimento, teor de umidade, tamanho de partícula e período e condições de armazenamento (MELLO; PETROVICK, 2000; AUDI et al., 2001; DELAPORTE et al., 2001; CARDOSO, 2002; SILVA, 2005; LAGOS, 2006; FARIAS, 2007; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; RESENDE, 2007; SONAGLIO et al., 2007; YUNES; CECHINEL FILHO, 2012).

## 6.2 Desenvolvimento de metodologia analítica por Eletroforese Capilar

A definição de um perfil eletroforético constitui uma estratégia adequada para o controle de qualidade de matérias-primas vegetais, já que permite a quantificação de várias

substâncias que podem estar sinergicamente associadas com a atividade biológica, além de ser útil para a avaliação de autenticidade e identificação de adulterantes (SONAGLIO et al., 2007; YUNES; CECHINEL FILHO, 2012).

O desenvolvimento de um método analítico para produtos vegetais é extremamente complexo (YUNES; CECHINEL FILHO, 2012) e requer a otimização de muitas variáveis experimentais. Neste trabalho, o modo de eletroforese escolhido foi por zona (ECZ) e a seletividade, velocidade da separação e resolução entre os picos foram ajustados por variações no  $\lambda$  de leitura, voltagem, concentração e pH do tampão de corrida, tipo e concentração de CDs e gradiente de voltagem.

### **6.2.1 Comprimento de onda ( $\lambda$ )**

Com relação ao  $\lambda$  de leitura, há relatos de metodologias desenvolvidas por EC para análise de polifenóis em extratos e frações vegetais que utilizam  $\lambda$  de 210 nm (CHEUNG; ZHANG, 2008), 214 nm (ITO, 2011), 230 nm (CHEN et al., 2011), 254 nm (LI et al., 2010) e 280 nm (PERES et al., 2009; ITO, 2011) para leitura. Quanto aos métodos desenvolvidos especificamente para a análise de *T. catigua*, encontram-se estudos que utilizaram  $\lambda$  de 361 nm e 388 nm em métodos espectrofotométricos (ROLIM et al., 2005; BABY et al., 2006; ROLIM et al., 2006), e de 280 nm em métodos por CLAE (BELTRAME et al., 2006; LAGOS, 2006; LONGHINI et al., no prelo, 2013). Lonni e colaboradores (2012) monitoraram três  $\lambda$  por CLAE: 210, 254 e 280 nm e concluíram que a detecção a 210 nm apresentava maior número de sinais.

Neste trabalho, observou-se que as leituras realizadas a 200 e 214 nm (Figura 9, pág. 56) apresentaram melhor espectro de absorção. Contudo, o ruído da linha de base foi maior nas leituras realizadas a 200 nm. Logo, optou-se por fixar o  $\lambda$  em 214 nm para as leituras posteriores.

### **6.2.2 Voltagem**

A voltagem determina a força do campo elétrico aplicado e afeta a velocidade de migração dos analitos e o fluxo eletrosmótico (FEO) (CHU et al., 2008). Usualmente, os métodos desenvolvidos para quantificação de metabólitos secundários em matrizes complexas ou vegetais aplicam voltagens entre 15 e 25 kV (GUTERRES, 2005; CHEUNG; ZHANG, 2008; CHU et al., 2008; PERES et al., 2009; LI et al., 2010; CHEN et al., 2011; ROVIO et al., 2011; ITO, 2011), por isso, sistemas aplicando essas voltagens foram avaliados.

Na figura 10 (pág. 57) pode-se observar que o incremento da voltagem aumentou o FEO e diminuiu o tempo de migração dos analitos, resultando em análises mais rápidas. Em geral, tanto a resolução quanto a eficiência aumentam com a aplicação de altas voltagens

(TAGLIARO et al., 1998). Isto pode sugerir que o ideal seja utilizar a maior voltagem possível, contudo, o aumento da voltagem deve ser feito com cautela já que altas voltagens podem levar ao efeito Joule, conhecido por provocar alargamento dos picos, perda de reprodutibilidade, degradação ou desnaturação de substâncias termolábeis, falha no processo de separação e formação de bolhas no tampão que instabilizam o sistema (BAKER, 1995; TAGLIARO et al., 1998).

Em um primeiro momento, optou-se por utilizar uma voltagem intermediária (18 kV) para avaliar a influência da concentração e pH do tampão, bem como tipo e concentração do seletor quirál. Esta voltagem foi definida arbitrariamente e utilizada durante o desenvolvimento com o objetivo de evitar o efeito Joule, sem, contudo, aumentar consideravelmente o tempo de análise.

### **6.2.3 Concentração do tampão**

A força iônica do tampão influencia o FEO, a mobilidade dos analitos e, indiretamente, a viscosidade do meio. Quando a temperatura do capilar está controlada, o aumento da concentração do tampão aumenta a viscosidade, diminui o potencial zeta e o FEO e leva à obtenção de picos mais nítidos, porém com maior tempo de análise (WEINBERGER, 1993; BAKER, 1995; CHEUNG; ZHANG, 2008).

Na literatura é possível encontrar estudos que utilizam tampão borato nas concentrações de 10 a 150 mmol l<sup>-1</sup> (GUTERRES, 2005; CHEUNG; ZHANG, 2008; CHU et al., 2008; PERES et al., 2009; ITO, 2011). O ideal é que a concentração do tampão esteja na faixa de 10 a 100 mmol l<sup>-1</sup> (BAKER, 1995), pois concentrações muito altas favorecem o efeito Joule (CHU et al., 2008). Neste trabalho, avaliaram-se as concentrações de 50 a 80 mmol l<sup>-1</sup>.

A figura 11 (pág. 58) mostra que o aumento no tempo de análise foi mais evidente com a concentração de 80 mmol l<sup>-1</sup>. Em relação à separação entre os picos, a concentração de 70 mmol l<sup>-1</sup> apresentou melhor resultado, já que permitiu o desdobramento do pico majoritário, o que não foi observado nas outras concentrações.

### **6.2.4 pH do tampão**

Outro parâmetro que afeta significativamente o FEO é o pH do tampão. Com o aumento do pH, mais grupos silanóis da parede do capilar são ionizados, o que aumenta o potencial zeta e o FEO (WEINBERGER, 1993; BAKER, 1995; GUTERRES, 2005; ITO, 2011). Em geral, utiliza-se o tampão borato na faixa de pH que vai de 8,0 a 9,4 (GUTERRES, 2005; CHEUNG; ZHANG, 2008; CHU et al., 2008; ITO, 2011).

Neste estudo foram testadas pequenas variações no pH no intervalo de 8,96 a 9,45, dependendo da concentração molar do tampão utilizada. Como não havia seletor quiral na solução, a separação dos enantiômeros não foi considerada.

As figuras 12, 13, 14 e 15 (pág. 59-62), mostram que, ao contrário do esperado, com o aumento do pH ocorreu uma diminuição do FEO. Este fenômeno também foi observado em experimentos realizados por Guterres (2005), Cheung e Zhang (2008) e Chu e colaboradores (2008). Cheung e Zhang (2008) relataram que o aumento nos tempos de migração das substâncias ácido *p*-cumárico, rutina e quercetina pode ter ocorrido em função da dissociação do grupo hidroxil dessas moléculas. Chu e colaboradores (2008) afirmaram que as substâncias catequina, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido cafeico, rutina, ácido protocatéquico, ácido gálico e *o*-diidroxibenzeno podem formar complexos negativamente carregados em soluções alcalinas de tampão borato.

Neste trabalho, supomos que o aumento nos tempos de migração dos solutos observado ocorreu porque o pH alcalino do tampão favoreceu diferentes graus de dissociação dos polifenóis presentes na FAE de *T. catigua* o que corroborou para uma maior interação entre os analitos carregados negativamente e a camada dupla difusa de cátions na parede do capilar. Além disso, a mobilidade eletroforética das substâncias pode ter sido reduzida por uma maior força de atração dos solutos pelo ânodo, em função da razão massa-carga dos solutos (TAGLIARO et al., 1998; MELLO, ITO, 2011). Isto permitiu uma melhor separação das substâncias, além de resultar em um maior tempo de análise.

Em corridas onde os parâmetros força iônica (70 e 80 mmol l<sup>-1</sup>) e pH (9,35 e 9,29, respectivamente) apresentaram os valores mais elevados, foi necessário aumentar o tempo de análise para 30 min. Como já havia-se selecionado o tampão borato na concentração 70 mmol l<sup>-1</sup> na etapa anterior, decidiu-se pelo pH 9,26, já que o perfil obtido nestas condições apresentou melhor separação aparente dos picos (Figura 14, pág. 61). Para o ensaio seguinte, optou-se por aumentar a voltagem para 20 kV para reduzir o tempo morto de aproximadamente 12 min.

#### **6.2.5 Tipo e concentração de seletor quiral**

As CDs, naturais ou derivadas, são as substâncias preferencialmente utilizadas para separação de enantiômeros por EC (ALTRIA, 1999; WIND et al., 2000; EECKHAUT; MICHOTTE, 2010). Caracteristicamente, possuem uma cavidade hidrofóbica opticamente ativa e uma superfície externa hidrofílica. A aplicação na separação de compostos quirais resulta da capacidade da CD formar complexos de inclusão com vários tipos de substâncias (WEINBERGER, 1993; BAKER, 1995).

Atualmente, existem vários tipos de CDs quimicamente modificadas disponíveis com as vantagens de possuir maior capacidade de resolução e alta solubilidade (ALTRIA, 1999;

EECKHAUT; MICHOTTE, 2010). Entretanto, a seleção do tipo e concentração ideal de CD é uma tarefa complexa, trabalhosa e demorada. Isto porque, até o momento, não existem informações teóricas suficientes para prever o comportamento de cada tipo de CD em determinada amostra. Desta forma, a seleção é baseada em pesquisas de tentativa e erro (AHUJA; JMIDAR, 2008).

Na literatura é possível encontrar diversos exemplos de aplicação de CDs em separações quirais por EC (WIND et al., 2000; ZHU; VIGH, 2000; EVANS; STALCUP, 2003; AHUJA; JMIDAR, 2008; CHEUNG; ZHANG, 2008; EECKHAUT; MICHOTTE, 2010; ITO, 2011). Porém, estudos com extratos vegetais ainda são escassos.

Neste trabalho, três tipos de CD foram testadas:  $\beta$ -CD, metil- $\beta$ -CD e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -CD, nas concentrações de 10, 15 e 20 mmol l<sup>-1</sup>.

A figura 16 (pág. 63) mostra que as CD derivadas apresentaram seletividade diferente da CD não derivada ( $\beta$ -CD). Os três tipos de CD testados separaram, eficientemente, a catequina e a epicatequina. Porém, apenas a 2-hidroxiopropil- $\beta$ -CD separou, parcialmente, as cinchonaínas Ia e Ib.

Provavelmente, a melhor capacidade de separação dos enantiômeros apresentada pela 2-hidroxiopropil- $\beta$ -CD deve-se a mecanismos complexos relacionados à inclusão hidrofóbica, pontes de hidrogênio e interações estereoseletivas (TAGLIARO et al., 1998; AHUJA; JMIDAR, 2008). A presença de um centro quiral adicional (CHEN et al., 2010), bem como a hidroxila e o maior tamanho da cadeia substituinte da 2-hidroxiopropil- $\beta$ -CD (Figura 7, pág. 49) podem ter favorecido diferentes graus de interações entre as cinchonaínas e a CD, uma vez que estas apresentam muitas hidroxilas ionizáveis e conformações espaciais diferentes, contribuindo para a separação enantiomérica.

Diferente do que foi observado por Zhu e Vigh (2000), a seletividade da separação não melhorou significativamente com o aumento na concentração da CD (Figura 17, pág. 64). Isto pode ter ocorrido, entre outros motivos, pela saturação da capacidade da CD formar complexos de inclusão com substâncias presentes na amostra.

Para melhorar a resolução entre os picos da cinchonaína Ia e cinchonaína Ib, diminuir o tempo morto e o tempo de corrida foram realizados novos ensaios. Parâmetros como: voltagem, força iônica e pH do tampão foram reavaliados. Nenhuma condição testada foi capaz de separar adequadamente os picos da cinchonaína Ia e Ib, contudo, as condições eletroforéticas tampão borato 80 mmol l<sup>-1</sup>, pH 8,80, 2-hidroxiopropil- $\beta$ -CD 10 mmol l<sup>-1</sup> e voltagem de 30 kV apresentaram-se mais adequadas para a continuação dos estudos.

### **6.2.6 Gradiente de voltagem**

Apesar de ser muito útil para diminuir o tempo de análise e melhorar o poder de resolução, existem poucos relatos de estudos que aplicam o gradiente de voltagem (LOOKHART; BEAN, 1995; SUMITA et al., 1999; OH et al., 2010).

Neste trabalho, esta estratégia foi utilizada para melhorar a resolução dos picos de cinchonaína Ia e cinchonaína Ib sem tornar a análise demasiadamente longa e sem alterar a resolução dos demais picos. Como mostra a figura 18 (pág. 65), o gradiente de voltagem consistiu, basicamente, em aplicar uma voltagem relativamente menor apenas por tempo suficiente para a eluição dos picos das cinchonaínas Ia e Ib (2 min). Isto permitiu um espalhamento das zonas dessas substâncias, que foi percebido pelo detector. Sob altas voltagens, essas zonas são muito estreitas e co-eluem (BAKER, 1995; GUTERRES, 2005).

Para a avaliação do melhor gradiente de voltagem, o principal parâmetro considerado foi a resolução. A tabela 5 (pág. 66) mostra que a resolução da cinchonaína Ia foi satisfatória nos três sistemas avaliados ( $R_s > 2,0$ ) (ICH, 2005). Quanto a cinchonaína Ib, a melhor resolução obtida ( $R_s = 0,97$ ) foi com o gradiente 1.

Logo, as condições eletroforéticas estabelecidas para submeter a metodologia ao processo de validação foram: tampão borato 80 mmol l<sup>-1</sup>; pH 8,80; 2-hidroxiopropil- $\beta$ -CD 10 mmol l<sup>-1</sup>; 30 kV por 5,7 min, 5 kV por 2 min e 30 kV por 7,3 min a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAE: 1 mg ml<sup>-1</sup> (Figura 19, pág. 66).

### **6.2.7 Determinação dos parâmetros eletroforéticos**

A tabela 6 (pág. 67) mostra os resultados da velocidade aparente de migração ( $V_{ap}$ ), a velocidade eletroforética ( $V_e$ ), a mobilidade eletroforética ( $\mu_e$ ) e a mobilidade total ( $\mu_{ap}$ ) das substâncias catequina, epicatequina, ácido clorogênico, PB2, cinchonaínas Ia, Ib, IIa e IIb, PB1 e ácido gálico. Os resultados obtidos são compatíveis com os valores tipicamente observados em outros sistemas eletroforéticos (WEINBERGER, 1993; BAKER, 1995).

Observa-se, ainda, que à medida que o tempo de migração das substâncias aumenta, as velocidades de migração e as mobilidades eletroforéticas diminuem. Isso acontece porque compostos que interagem em maior grau com as CD ou que apresentem maior densidade de carga negativa, migram com uma velocidade menor apresentando maiores tempos de migração e menores mobilidades eletroforéticas (ITO, 2011).

## **6.3 Validação da metodologia analítica**

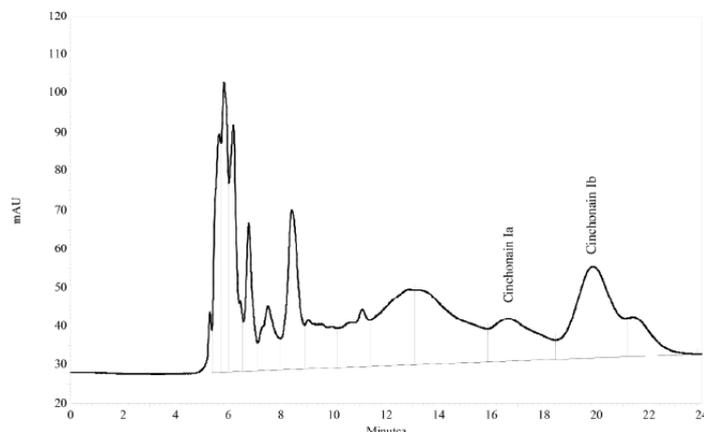
A validação é um requisito indispensável para publicação de novas metodologias que objetivam o controle de qualidade (YUNES; CECHINEL FILHO, 2012). Para isto, as

exigências analíticas devem considerar diversos fatores, como especificidade, linearidade, exatidão, precisão, LD, LQ, robustez e estabilidade (BRASIL, 2003; ICH, 2005; SONAGLIO et al., 2007).

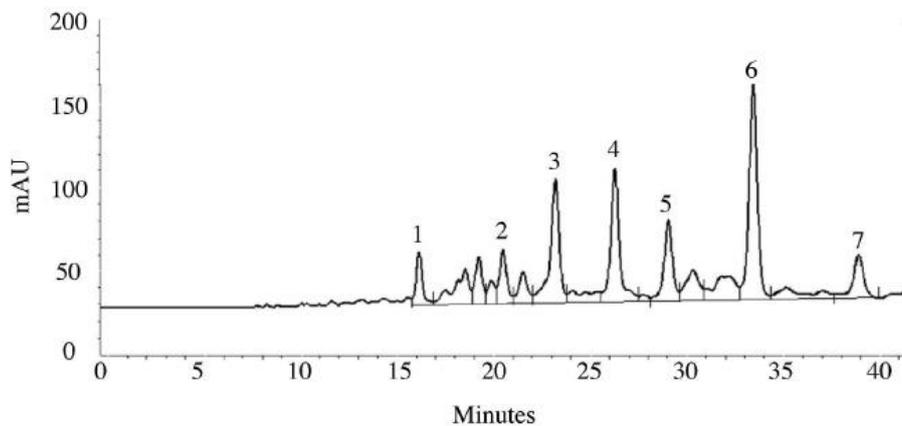
### 6.3.1 Especificidade e seletividade

A avaliação da especificidade considerou os parâmetros apresentados na tabela 7 (pág. 67). Com relação à resolução, as cinchonaínas Ib, IIa e IIb apresentaram valores abaixo do preconizado pelo ICH (2005). Ademais, o número de pratos teóricos das cinchonaínas Ia e Ib também estavam abaixo do limite estabelecido.

Apesar da inadaqueabilidade de alguns parâmetros referente às cinchonaínas, a metodologia desenvolvida não pode ser desprezada, pois, até o momento, é a única metodologia descrita capaz de identificar as quatro cinchonaínas isoladamente com um curto tempo de análise (15 min). Longhini e colaboradores (no prelo, 2013) demonstraram a dificuldade de separar os enantiômeros das cinchonaínas Ia e Ib por CLAE, utilizando uma coluna de separação quiral (Figura 21) e validaram uma metodologia que quantificou a mistura desses enantiômeros em uma corrida analítica de 40 min (Figura 22).



**Figura 21.** Separação enantiomérica das cinchonaínas Ia e Ib da FAE de *Trichilia catigua* por CLAE com coluna quiral. **Fonte:** LONGHINI et al., no prelo, 2013.



**Figura 22.** Cromatograma da FAE de *T. catigua*. Picos: 1) PB2, 2) mistura de catequina e ácido clorogênico, 3) cinchonina IIb, 4) cinchonina IIa, 5) epicatequina, 6) mistura de cinchoninas Ia e Ib, 7) substância não identificada. **Fonte:** LONGHINI et al., no prelo, 2013.

Considerando as vantagens apresentadas pela metodologia desenvolvida por EC, o ideal seria determinar a seletividade dos picos cromatográficos por outros métodos, como por exemplo, utilizando um detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas (YUNES; CECHINEL FILHO, 2012).

### 6.3.2 Linearidade e intervalo de quantificação

Como observado na figura 20 (pág. 68), a curva de calibração foi linear no intervalo de 20 a 120  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e apresentou boa correlação linear entre a área do pico (y) e a concentração (x). O coeficiente de correlação (r) obtido foi igual a 0,997 e encontra-se dentro dos limites preconizados pela ANVISA e ICH (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A equação linear definida foi  $y = 795,5x - 5625$  ( $n=3$ ,  $r^2=0,995$ ).

Para avaliar se o modelo de regressão linear simples era adequado para este conjunto de dados, realizou-se o teste de ANOVA e o teste da falta de ajuste. Os resultados apresentados na tabela 8 (pág. 68) indicam que o modelo de regressão linear simples é adequado e não possui falta de ajuste ( $p\text{-valor}=0,251$ ,  $p>0,05$ ).

### 6.3.3 Precisão

A precisão intra-corrída (repetibilidade) e inter-corrída (precisão intermediária) foram avaliadas pela determinação de seis amostras de ácido gálico na concentração de 120  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Tabela 9, pág. 69). A repetibilidade apresentou CV na faixa de 2,53% a 3,31%. Na análise da precisão intermediária, considerando os dias distintos, o CV foi de 2,81%. Esses resultados foram confirmados por ANOVA e são considerados satisfatórios, estando em acordo com o preconizado pela legislação vigente (BRASIL, 2004; ICH, 2005). Logo, pode-se afirmar que o método é preciso.

### **6.3.4 Limite de detecção e limite de quantificação**

O LD definido para o ácido gálico foi de  $5,19 \mu\text{g ml}^{-1}$ , enquanto o limite de quantificação foi de  $17,29 \mu\text{g ml}^{-1}$  (Tabela 10, pág. 69). Esses valores indicam que o método analítico possui boa sensibilidade.

### **6.3.5 Exatidão**

A tabela 11 (pág. 69) mostra que a exatidão observada em três níveis de concentração do ácido gálico ficou na faixa de 99,69% – 100,92%. Esses resultados foram considerados satisfatórios, e estão em acordo com o preconizado pela legislação vigente (BRASIL, 2004; ICH, 2005). Logo, pode-se afirmar que o método é exato.

### **6.3.6 Robustez**

Análise de variância unilateral (one-way ANOVA) e teste de Tukey mostraram que variações na concentração do tampão ( $80 \text{ mmol l}^{-1} \pm 4 \text{ mmol l}^{-1}$ ), pH do tampão ( $\text{pH } 8,8 \pm 0,1$ ), e no gradiente de voltagem ( $5 \text{ kV} \pm 0,1 \text{ kV}$ ;  $30 \text{ kV} - 1 \text{ kV}$ ) alteraram significativamente ( $p < 0,05$ ) as áreas e/ou tempos de migração da maioria das substâncias observadas.

Desta forma, para garantir a reprodutibilidade da metodologia é fundamental que as condições analíticas sejam rigorosamente controladas, principalmente com relação aos parâmetros que foram avaliados neste estudo.

## **6.4 Estabilidade da solução amostra e da solução do padrão interno**

Diferente do observado por Longhini e colaboradores (no prelo, 2013), a estabilidade da solução amostra e da solução do padrão interno foi relativamente baixa, sendo que todas as substâncias monitoradas, sob temperatura ambiente ou em refrigeração, apresentaram alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) nas áreas e tempos de migração em menos de 72 h.

Esta instabilidade química pode ser em função da formação de pontes de hidrogênio, quebra de ligações e outras interações por substâncias reativas que estão naturalmente presentes na *T. catigua* (LONGHINI et al., no prelo, 2013).

Desta forma, recomenda-se preparar as soluções de trabalho diariamente e não estocá-las por um período superior a 24 h, mesmo sob condições de refrigeração. Guterres (2005) orienta que a solução tampão também deve ser preparada o mais próximo possível do início das análises e conservada sob refrigeração por poucos dias.

### **6.5 Recuperação do procedimento de preparo da amostra e quantificação de polifenóis da FAE de *T. catigua***

Uma das maiores dificuldades encontradas na área analítica dos produtos naturais é a obtenção de padrões de referência com grau de pureza adequado e em quantidade suficiente. Alto custo aliado à baixa disponibilidade são fatores que dificultam a obtenção desses padrões.

Em casos em que o padrão de referência inexistente comercialmente, um trabalho árduo de isolamento e purificação deve ser realizado com o objetivo de produzir esse padrão no próprio laboratório.

Neste estudo, os padrões das cinchonainas Ia, Ib, IIa e IIb, PB2 e PB1, isolados por Resende (2007), foram utilizados apenas para identificação dos picos. A quantificação dos polifenóis da FAE foi realizada em função da curva de calibração determinada para o padrão interno ácido gálico, já que este padrão está disponível comercialmente, a um preço acessível.

Como o preparo da amostra envolve uma etapa de extração por fase sólida, avaliou-se a recuperação desse procedimento para estimar a porcentagem de amostra que ficou retida no cartucho C18. Os resultados apresentados na tabela 12 (pág. 71) orientaram a extrapolação das áreas das substâncias: catequina, epicatequina, PB2, cinchonainas IIa e cinchonaina IIb. As concentrações foram definidas com base na equação da reta do ácido gálico (Tabela 13, pág. 71). As áreas das cinchonainas Ia e Ib não foram consideradas pois foram obtidas sob outras condições de voltagem. Para que se consiga quantificar as cinchonainas Ia e Ib, outra curva de calibração do ácido gálico submetido a voltagem de 5 kV deverá ser elaborada.

## 7 CONCLUSÃO

No controle de qualidade, a comparação com resultados obtidos por outros pesquisadores pode ser útil para a avaliação da qualidade de espécies vegetais que não possuem monografia atualizada na Farmacopeia Brasileira ou outros Compêndios Oficiais, como é o caso da *T. catigua*. As análises físico-químicas e quantitativas (teor de polifenóis totais, taninos totais e capacidade antioxidante) realizadas mostraram que as cascas de *T. catigua* obtidas estavam aptas para o uso e apresentavam resultados próximos a outros estudos. As diferenças observadas são aceitáveis e podem estar relacionadas a variações na metodologia, equipamentos, solventes e reagentes e, principalmente, no material vegetal.

Quanto ao desenvolvimento analítico, empregou-se o modo de eletroforese capilar de zona (ECZ) para separação dos marcadores químicos da FAE. As variáveis  $\lambda$ , voltagem, concentração e pH do tampão borato e concentração e tipo de CDs foram avaliadas. Embora pouco comum, o estabelecimento do gradiente de voltagem, associado ao uso da 2-hidroxiopropil- $\beta$ -CD como seletor quiral, foi fundamental para obtenção de um eletroferograma com resolução adequada para identificação de nove substâncias, sendo: catequina, epicatequina, PB1, PB2, cinchonaínas Ia, Ib, IIa e IIb e ácido clorogênico.

Quando comparado a metodologias por CLAE, o método desenvolvido apresentou melhor poder de resolução e um tempo consideravelmente menor para a análise do mesmo grupo de substâncias (15 min EC *versus* 40 min CLAE).

O processo de validação comprovou que o método é simples, rápido, seletivo, linear, preciso e exato. As análises de robustez e estabilidade ressaltam a importância de manter os parâmetros analíticos bem controlados e preparar diariamente as soluções de trabalho.

Os resultados demonstram que o método pode ser utilizado na rotina laboratorial para o controle de qualidade e quantificação de polifenóis da FAE e produtos derivados.

Este método é o primeiro que emprega a tecnologia da EC para análise de polifenóis em fração semipurificada de *T. catigua*. Tal fato não foi descrito na literatura, até o presente momento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUJA, S.; JIMIDAR, M. H. *Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis*. Oxford: Elsevier, 2008. 529 p. (Series Separation Science and Technology).
- AKHTAR, Y.; YEOUNG, Y. R.; ISMAN, M. B. Comparative bioactivity of selected extracts from Meliaceae and some commercial botanical insecticides against two noctuid caterpillars, *Trichoplusia ni* and *Pseudaletia unipuncta*. *Phytochemistry Reviews*, v. 7, p. 77-88, 2008.
- ALBRECHT, I.; ITO, L. A.; RESENDE, F. O.; MELLO, J. C. P. Avaliação da atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas de cascas de *Trichilia catigua* A. Juss. por DPPH. In: CONGRESSO DE FARMÁCIA DE MARINGÁ, 1, 2006, Maringá. *Arquivos do Mudi*. Maringá, 2007. p. 159.
- ALTRIA, K. V. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 856, p. 443-463, 1999.
- AMARO, N. B. *Avaliação do potencial de extratos vegetais de Trichilia pallida (Swartz, 178) (Sapindales: Meliaceae) e Sesamum indicum (Linnaeus, 1753) (Lamiales: Pedaliaceae) na prospecção de acaricidas botânicos para controle de Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)*. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2007.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGUADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidante activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, v. 84, p. 551-562, 2004.
- ANTUNES, E.; GORDO, W. M.; OLIVEIRA, J. F.; TEIXEIRA, C. E.; HYSLOP, S.; NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama® and its constituents. *Phytotherapy Research*, v. 15, p. 416-421, 2001.
- AUDI, E. A.; CAMPOS, E. J. V.; RUFINO, M.; CORTEZ, D. G.; BERSANI-AMADO, C. A.; SOAREZ, L. A. L.; PRETROVICK, P. R.; MELLO, J. C. P. *Petiveria alliacea* L.: plant drug quality control, hidroalcoholic extract standardization and pharmacological assay of lyophilized extract. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 20, n. 3, p. 225-232, 2001.
- BABY, A. R.; MACIEL, C. P.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. UV spectrophotometric determination of bioflavonoids from a semisolid pharmaceutical dosage form containing *Trichilia catigua* Adr. Juss and *Ptychopetalum olacoides* Bentham standardized extract: analytical method validation and statistical procedures. *The Journal of AOAC International*, v. 89, n. 6, p. 1532-1537, 2006.
- BAKER, D. R. *Capillary Electrophoresis*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995. 244 p.

- BARBOSA, N. R.; FISCHMANN, L.; TALIB, L. L.; GATTAZ, W. F. Inhibition of platelet phospholipase A<sub>2</sub> activity by catuaba extract suggests antiinflammatory properties. *Phytotherapy Research*, v. 18, p. 942-944, 2004.
- BELTRAME, F. L.; CASS, Q. B.; RODRIGUES FILHO, E.; BARROS, F.; CORTEZ, D. A. G. Análisis de productos fitoterapéuticos comerciales de “Catuaba” por LC-UV-MS. *Notícias técnicas del laboratorio*, v. 3, p. 14-16, 2004.
- BELTRAME, F. L.; RODRIGUES FILHO, E.; BARROS, F. A. P.; CORTEZ, D. A. G.; CASS, Q. B. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as Catuaba. *Journal of Chromatography A*, v. 1119, p. 257-263, 2006.
- BENENCIA, F.; COULOMBIE, F. C. Immunomodulatory activities of *Trichilia glabra* leaf aqueous extracts. *Phytotherapy Research*, v. 12, p. 167-171, 1998.
- BOGORNI, P. C.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. *Neotropical Entomology*, v. 32, n. 4, p. 665-669, 2003.
- BOGORNI, P. C.; VENDRAMIM, J. D. Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. *Neotropical Entomology*, v. 34, n. 2, p. 311-317, 2005.
- BRASIL. ANVISA/MS. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Brasília. 2003. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.html](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.html)>. Data de acesso: 01 ago. 2011.
- BRAY, D. H.; WARHUST, D. C.; CONNOLLY, J. D.; O'NEILL, M. J.; PHILLIPSON, J. D. Plants as sources of antimalarial drugs. Part 7. Activity of some species of meliaceae plants and their constituent limonoids. *Phytotherapy Research*, v. 4, n. 1, p. 29-35, 1990.
- BRIGHENTE, I. M. C.; DIAS, M.; VERDI, L. G.; PIZZOLATTI, M. G. Antioxidante activity and total phenolic content of some brazilian species. *Pharmaceutical Biology*, v. 45, n. 2, p. 156-161, 2007.
- CALA, A. C. *Avaliação da atividade de Artemisia annua L., Melia azedarach L. e Trichilia clausenii C. sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos*. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2010.
- CALA, A. C.; CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; MATOS, A. P.; BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; SOUZA, F. A.; OLIVEIRA, G. P. In vitro anthelmintic effect of *Melia azedarach* L. and *Trichilia clausenii* C. against sheep gastrointestinal nematodes. *Experimental Parasitology*, v. 130, p. 98-102, 2012.

- CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A. Herbal medicine Catuama induces endothelium-dependent and -independent vasorelaxant action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. *Phytotherapy Research*, v. 11, p. 32-38, 1997.
- CAMPOS, M. M.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; BORTOLANZA, L. B.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Pharmacological and neurochemical evidence for antidepressant-like effects of the herbal product Catuama. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 78, p. 757-764, 2004.
- CAMPOS, M. M.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Antidepressant-like effects of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract: evidence for dopaminergic-mediated mechanisms. *Psychopharmacology*, v. 182, p. 45-53, 2005.
- CARDOSO, M.L.C. *Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de Heteropteris aphrodisiaca O. Mach.* 2002, 114 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2002.
- CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. *T&C Amazônia*, n. 11, p. 26-32, 2007.
- CASS, Q. B; DEGANI, A. L. G. *Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação.* São Carlos: Editora da UFSCar, 2010. 77 p. (Série Apontamentos).
- CHASE, M. W.; MORTON, C. M.; KALLUNKI, J. A. Phylogenetic relationships of Rutaceae: a cladistic analysis of the subfamilies using evidence from rbcL and atpB sequence variation. *American Journal of Botany*, v. 86, n. 8, p. 1191-1199, 1999.
- CHASSOT, J. M.; LONGHINI, R.; GAZARINI, L.; MELLO, J. C. P.; OLIVEIRA, R. M. W. Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137, p. 1143-1148, 2011.
- CHEN, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, L.; CHEN, G. Separation of dipeptides with two chiral centers using 2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD modified MEKC. *Electroporesis*, v. 31, p. 1493-1497, 2010.
- CHEN, J.; ZHU, H.; CHU, V. M.; JANG, Y. S.; SON, J. Y.; KIM, Y. H.; SON, C. G.; SEOL, I. C.; KANG, J. S. Quality control of a herbal medicinal preparation using high-performance liquid chromatographic and capillary electrophoretic methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 55, p. 206-210, 2011.
- CHEUNG, H.; ZHANG, Q. Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in *Prunella vulgaris* L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers. *Journal of Chromatography A*, v. 1213, p. 231-238, 2008.

- CHU, Q.; LIN, M.; YU, X.; YE, J. Study on extraction efficiency of natural antioxidant in coffee by capillary electrophoresis with amperometric detection. *European Food Research and Technology*, v. 226, p. 1373-1378, 2008.
- CONSOLARO, M. E. L.; MARQUES, L. C.; MELLO, J. C. P. Análisis farmacognóstico de *Centella asiática* (L.) Urban: aspectos botânicos, físico-químicos y enfoque químico preliminar. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 18, n. 2, p. 115-120, 1999.
- CRONQUIST, A. Class Magnoliopsida. In: \_\_\_\_\_ (Org.). *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press, 1981. p. 17-849.
- DAOLIO, C.; BELTRAME, F. L.; FERREIRA, A. G.; CASS, Q. B.; CORTEZ, D. A. G.; FERREIRA, M. M. C. Classification of commercial catuaba samples by NMR, HPLC and chemometrics. *Phytochemical Analysis*, v. 19, p. 218-228, 2008.
- DELAPORTE R. H.; SÁNCHEZ, G. M.; CUÉLLAR, A. C.; MELLO, J. C. P. Control de calidad y actividad antiinflamatória de lãs drogas vegetales *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze y *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold.. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 20, n. 1, p. 39-46, 2001.
- DEUTSCHES ARZNEIBUCH. 9. ed., Stuttgart: Wissenschaftliche, 1986.
- DUCKE, A. A catuaba na botânica sistemática, científica e pseudo-científica, *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 47, n. 5, p. 267-272, 1966.
- EECKHAUT, A. V.; MICHOTTE, Y. *Chiral separations by capillary electrophoresis*. Boca Raton: CRC Press, 2010. 526 p. (Chromatographic Science Series).
- EVANS, C. E.; STALCUP, A. M. Comprehensive strategy for chiral separations using Sulfated Cyclodextrins in Capillary Electrophoresis. *Chirality*, v. 15, p. 709-723, 2003.
- FANG, X.; DI, Y.; GENG, Z.; TAN, C.; GUO, J.; NING, J.; HAO, X. Trichiliton A, a novel limonoid from *Trichilia connaroides*. *European Journal of Organic Chemistry*, p. 1381-1387, 2010.
- FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 263-288.
- FARMACOPEIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2010.
- FARMACOPEIA Europeia. 4 ed. França: EDQM, 2002.
- FICKER, C. E.; ARNASON, J. T.; VINDAS, P. S.; ALVAREZ, L. P.; AKPAGANA, K.; GBÉASSOR, M.; DE SOUZA, C.; SMITH, M. L. Inhibition of human pathogenic fungi by ethnobotanically selected plant extracts. *Mycoses*, v. 46, p. 29-37, 2003.
- FIGUEIREDO, E. R. *Estudo fitoquímico e avaliação biológica dos extratos de Trichilia casarettii e Trichilia silvatica (Meliaceae)*. 2010. 167 f. Tese (Doutorado em Produção

- Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, 2010.
- GLASL, H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung. 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. *Deutsche Apotheker Zeitung*, v. 123, p. 1979-1983, 1983.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GOMES, M. L. M. *Morfometria testicular de ratos wistar adultos tratados com infusão aquosa de catuaba (Trichilia catigua A. Juss. Meliaceae)*. 2007. 49 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.
- GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 3, p. 227-238, 2007.
- GOUVÊA, C. F.; DORNELAS, M. C.; RODRIGUEZ, A. P. M. Floral development in the tribe Cedreleae (Meliaceae, Sub-family Swietenioideae): *Cedrela* and *Toona*. *Annals of Botany*, v. 101, p. 39-48, 2008.
- GUTERRES, S. B. *Estudo dos extratos dos frutos de Sapindus saponaria enriquecidos em saponinas e outros glicosídeos e sua aplicação em eletroforese capilar*. 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2005.
- HANTOS, S. M.; TRIPATHY, S.; ALIBHAI, N.; DURST, T. Synthesis of trichiliasterones A and B – 16-ketosteroids isolated from *Trichilia hirta* and *Trichilia americana*. *Journal of Chemistry*, v. 79, p. 1747-1753, 2001.
- HEEGAARD, N. H. H.; NILSSON, S.; GUZMAN, N. A. Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments. *Journal of Chromatography B*, v. 715, p. 29-54, 1998.
- HELMAN, J. *Farmacotecnia teorica y practica*. 3. ed. Mexico: Continental, 1982, v.4, p.1147-1187.
- HU, B.; MARTIN, L. M. Capillary electrophoresis of peptides and proteins. In: MILLNER, P. A. (Ed.). *High resolution chromatography: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 1999. p. 77-116. (The Practical Approach Series).
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). *Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*, nov. 2005. Disponível em: <[www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)>. Data de acesso: 12 set. 2011.
- ITO, L. A. *Desenvolvimento de metodologia analítica por eletroforese capilar para isolar, identificar e quantificar cafeína e flavan-3-ol em extrato de Paullinia cupana var. sorbilis*

- (Mart.) Ducke – Sapindaceae. 2011. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2011.
- JOLY, A. B. Divisão Angiospermae (Anthrophyta). In: \_\_\_\_\_. (Org.). *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. 2ª edição. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1975. p. 219-739.
- KAWAMURA, Y.; TAKAHASHI, M.; ARIMURA, G.; ISAYAMA, T.; IRIFUNE, K.; GOSHIMA, N.; MORIKAWA, H. Determination of levels of  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NH}_4^+$  ions in leaves of various plants by capillary electrophoresis. *Plant and Cell Physiology*, v. 37, n. 6, p. 878-880, 1996.
- KLETTER, C.; GLASL, S.; PRESSER, A.; WERNER, I.; REZNICEK, G.; NARANTUYA, S.; CELLEK, S.; HASLINGER, E.; JURENITSCH, J. Morphological, chemical and functional analysis of catuaba preparations. *Planta Medicinal*, v. 70, p. 993-1000, 2004.
- KOLACZKOWSKI, M.; KOLACZKOWSKA, A.; SRODA, K.; RAMALHETE, C.; MICHALAK, K.; MULHOVO, S.; FERREIRA, M. J. U. Substrates and modulators of the multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans* in antifungal extracts of medicinal plants. *Mycoses*, v. 53, p. 305-310, 2009.
- KRIEF, S.; MARTIN, M. T.; GRELLIER, P.; KASENENE, J.; SÉVENET, T. Novel antimalarial compounds isolated in a survey of self-medicative behavior of wild Chimpanzees in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 8, p. 3196-3199, 2004.
- KRIEF, S.; HUFFMAN, M. A.; VENET, T. S.; HLADIK, C.; GRELLIER, P.; LOISEAU, P. M.; WRANGHAM, R. W. Bioactive properties of plant species ingested by Chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in the Kibale National Park, Uganda. *American Journal of Primatology*, v. 68, p. 51-71, 2006.
- LAGOS, J. B. *Estudo comparativo da composição química das folhas e cascas da Trichilia catigua A. Juss., Meliaceae*. 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.
- LAGOS, J. B.; MIGUEL, O. G.; DUARTE, M. R. Caracteres anatômicos de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 2, p. 185-190, 2007.
- LAWRENCE, G. H. M. Embryophyta Siphnogama. In: \_\_\_\_\_. (Org.). *Taxonomy of vascular plants*. New York: The Macmillan Company, 1951. p. 354-732.
- LI, Z.; HUANG, D.; TANG, Z.; DENG, C. Microwave-assisted extraction followed by CE for determination of catechin and epicatechin in green tea. *Journal of Separation Science*, v. 33, p. 1079-1084, 2010.
- LIMA, P. F.; RAMOS, F. N.; ZUCCHI, M. I.; PRIOLLI, R. H. G.; COLOMBO, C. A.; SOLFERINI, V. N. Development and characterization of microsatellite markers from *Guarea Guidonia* (Meliaceae), a tree species from different habitats within the Brazilian Atlantic forest. *Conservation Genetics Resources*, v. 1, p. 171-173, 2009.

- LINHARDT, R. J.; TOIDA, T. Ultra-high resolution separation comes of age. *Science*, v. 298, p. 1441-1442, 2002.
- LONGHINI, R.; KLEIN, T.; SILVA JUNIOR, W. V.; RODRIGUES, J.; LOPES, N. P.; MELLO, J. C. P. Development and validation studies for determination of phenylpropanoid substituted flavan-3-ols in semipurified extract of *Trichilia catigua* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of Separation Science*. No prelo, 2013.
- LONNI, A. A. S. G.; LONGHINI, R.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Analytica Chimica Acta*, v. 719, p. 57-60, 2012.
- LOOKHART, G.; BEAN, S. A fast method for wheat cultivar differentiation using capillary zone electrophoresis. *Cereal Chemistry*, v. 72, n. 1, p. 42-47, 1995.
- LUNTE, S. M.; MARTIN, R. S.; LUNTE, C. E. Capillary Electrophoresis / Electrochemistry. In: BRAJTER-TOTH, A.; CHAMBERS, J. Q. (Ed.). *Electroanalytical methods for biological materials*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002. p. 461-490.
- MACKINNON, S.; DURST T.; ARNASON, J. T.; ANGERHOFER, C.; PEZZUTO, J.; SANCHEZ-VINDAS, P. E.; POVEDA, L. J.; GBEASSOR, M. Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and gedunin derivatives. *Journal of natural products*, v. 60, n. 4, p. 336-341, 1997.
- MARQUES, L. C. Contribuição ao esclarecimento da identidade botânica da droga vegetal Catuaba. *Revista Racine*, v. 8, n. 43, p. 8-11, 1998.
- MARTINELLI, F. R. *Cinchonaínas – método cromatográfico e produção de padrões para controle de qualidade de extratos polares de catuaba (Trichilia catigua Adr. Juss.)*. 2010. 139 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2010.
- MATOS, A. P. *Busca de compostos inseticidas: estudo de espécies do gênero Trichilia (Meliaceae)*. 2006. 194 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2006.
- MATOS, A. P.; NEBO, L.; CALEGARI, E. R.; BATISTA-PEREIRA, L. G.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA FILHO, P.; RODRIGUES, R. R. Atividade biológica de extratos orgânicos de *Trichilia* spp. (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial. *BioAssay*, p. 1-7, 2006.
- MATOS, A. P.; NEBO, L.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua* (Meliaceae). *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1553-1556, 2009.

- MCGAW, L. J.; JÄGER, A. K.; VAN STADEN, J. Prostaglandin synthesis inhibitory activity in Zulu, Xhosa and Sotho medicinal plants. *Phytotherapy Research*, v. 11, p. 113-117, 1997.
- MELLO, J. C. P.; ITO, L. A. Aplicação da eletroforese capilar na análise de produtos naturais. In: SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. (Org.). *Revisões em processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais*. Ouro Preto: Editora UFOP, 2011. p. 209-242.
- MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelpinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, v. 41, n. 3, p. 807-812, 1996.
- MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (*Asteraceae*) hydroalcoholic extracts. *Acta Farmaceutica Boanaerense*, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.
- MELO, J. G.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Native medicinal plants commercialized in Brazil – priorities for conservation. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 156, p. 567-580, 2009.
- MING, L. C.; CORREA JUNIOR, C. Geographic distribution and associated environments characterization of *Trichilia catigua* A. Juss. – Meliaceae in Santa Catarina State – Brazil. *Acta Horticulturae*, v. 569, p. 91-94, 2002.
- NAYAK, B. S.; KANHAI, J.; MILNE, D. M.; SWANSTON, W. H.; MAYERS, S.; EVERSLEY, M.; RAO, A. V. C. Investigation of the wound healing activity of *Carapa guianensis* L. (Meliaceae) bark extract in rats using excision, incision, and dead space wound models. *Journal of Medicinal Food*, v. 13, n. 5, p. 1141-1146, 2010.
- NEBO, L. *Atividade inseticida de espécies de Trichilia frente à lagarta-do-cartucho do milho Spodoptera frugiperda*. 2008. 180 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2008.
- NETTO, E. M.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; BALBINO, E. E.; CARVALHO, A. C. B. Comentários sobre o registro de fitoterápicos. *Revista Fitos*, v. 1, n. 3, p. 9-17, 2006.
- NUNES, E. C.; BENSON, E. E.; OLTRAMARI, A. C.; ARAUJO, P. S.; MOSER, J. R.; VIANA, A. M. *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, v. 12, p. 837-848, 2003.
- OH, D.; CHEONG, I. C.; LEE, H. G.; EO, S. K.; KANG, S. H. Fast microchip electrophoresis using field strength gradients for single nucleotide polymorphism identification of cattle breeds. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v. 31, n. 7, p. 1902-1906, 2010.
- OMAR, S.; ZHANG, J.; MACKINNON, S.; LEAMAN, D.; DURST, T.; PHILOGENE, B. J.; ARNASON, J. T.; SANCHEZ-VINDAS, P. E.; POVEDA, L.; TAMEZ, P. A.; PEZZUTO, J. M. Traditionally-used antimalarials from the Meliaceae. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 3, n. 2, p. 133-139, 2003.

- PAIVA, E. A. S.; LEMOS-FILHO, J. P.; OLIVEIRA, D. M. T. Imbibition of *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) seeds: the role of stomata. *Annals of Botany*, v. 98, p. 213-217, 2006.
- PASTORE, J. A. Meliaceae. In: MELO, M. M. R. F.; BARROS, F.; CHIEA, S. A. C.; KIRIZAWA, M.; JUNG-MENDAÇOLLI, S. L.; WANDERLEY, M. G. L. (Ed.). *Flora fanerogâmica da Ilha do Cardoso*. São Paulo: Instituto de Botânica, 1997. p. 57-67.
- PATRÍCIO, P. C.; CERVI, A. C. O gênero *Trichilia* P. Browne (Meliaceae) no estado do Paraná, Brasil. *Acta Biológica Paranaense*, v. 34, p. 27-71, 2005.
- PAULI, G. F. qNMR – a versatile concept for the validation of natural product reference compounds. *Phytochemical Analysis*, v. 12, p. 28-42, 2001.
- PENNINGTON, T. D. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Meliaceae. *Flora Neotrópica*, v. 28, p. 1-470, 1981.
- PERES, R. G.; MICKE, G. A.; TAVARES, M. F. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Multivariate optimization, validation and application of capillary electrophoresis for simultaneous determination of polyphenols and phenolic acids in Brazilian wines. *Journal of Separation Science*, v. 32, p. 3822-3828, 2009.
- PINTO, J. M. A.; SOUZA, E. A.; OLIVEIRA, D. F. Use of plant extracts in the control of common bean anthracnose. *Crop Protection*, v. 29, p. 838-842, 2010.
- PIZZOLATTI, M. G.; KOGA, A. H.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic rain forest plant species. *Phytomedicine*, Muenchen, v. 9, p. 422-426, 2002.
- PONTIERI, V.; SCALABRINI NETO, A.; CAMARGO, A. F. F.; KOIKE, M. K.; VELASCO, I. T. The herbal drug Catuama reverts and prevents ventricular fibrillation in the isolated rabbit heart. *Journal of Electrocardiology*, v. 40, p. 534.e1-534.e8, 2007.
- QUINTÃO, N. L. M.; FERREIRA, J.; BEIRITH, A.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Evaluation of the effects of the herbal product Catuama in inflammatory and neuropathic models of nociception in rats. *Phytomedicine*, v. 15, p. 245-252, 2008.
- RAMÍREZ, M. C.; TOSCANO, R. A.; ARNASON, J.; OMAR, S.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C. M.; MATA, R. Structure, conformation and absolute configuration of new antifeedant dolabellanes from *Trichilia trifolia*. *Tetrahedron*, v. 56, p. 5085-5091, 2000.
- RESENDE, F. O. *Trichilia catigua: avaliação farmacognóstica, fitoquímica e biológica in vitro*. 2007. 167 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2007.
- RESENDE, F. O.; RODRIGUES-FILHO, E.; LUFTMANN, H.; PETEREIT, F.; MELLO, J. C. P. Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their *in vitro* antioxidative activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 2087-2093, 2011.

- RODRIGUES, E.; CARLINI, E. L. A. A importância dos levantamentos etnofarmacológicos no desenvolvimento de fitomedicamentos. *Revista Racine*, n. 70, p. 30-35, 2002.
- RODRIGUES, V. F. *Constituintes químicos de Trichilia quadrijuga (Meliaceae)*. 2009. 338 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, 2009.
- RODRIGUES, V. F.; CARMO, H. M.; OLIVEIRA, R. R.; FILHO, R. B.; MATHIAS, L.; VIEIRA, I. J. C. Isoelation of terpenoids from *Trichilia quadrijuga* (Meliaceae) by droplet counter-current chromatography. *Chromatographia*, v. 70, p. 1191-1195, 2009.
- RODRIGUEZ, B. Complete assignments of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of 15 limonoids. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 41, p. 206-212, 2003.
- ROLIM, A.; MACIEL, C. P.; KANEKO, T. M., CONSIGLIERI, V. O.; SALGADO-SANTOS, I. M.; VELASCO, M. V. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss. (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) commercial extract. *The Journal of AOAC International*, v. 88, n. 4, p. 1015-1019, 2005.
- ROLIM, A.; OISHI, T.; MACIEL, C. P.; ZAGUE, V.; PINTO, C. A.; KANEKO, T. M., CONSIGLIERI, V. O.; VELASCO, M. V. Total flavonoids quantification from O/W emulsion with extract of brazilian plants. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 308, n. 1, p. 107-114, 2006.
- ROVIO, S.; SIRÉN, K.; SIRÉN, H. Application of capillary electrophoresis to determine metal cations, anions, organic acids and carbohydrates in some Pinot Noir red wines. *Food Chemistry*, v. 124, p. 1194-1200, 2011.
- ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of Chromatography A*, v. 1158, p. 111-125, 2007.
- SAKURAGUI, C. M.; STEFANO, M. V.; CALAZANS, L. S. B. Meliaceae. *Lista de Espécies da Flora do Brasil*, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000162>>. Data de acesso: 09 jan. 2013.
- SHI, Z. Y.; CHEN, Y. L.; FENG, G.; LIU, R. J.; CHRISTIE, P.; LI, X. L. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the Meliaceae on Hainan island, China. *Mycorrhiza*, v. 16, p. 81-87, 2006.
- SILVA, A. J. Estudo botânico e químico da catuaba (Erythroxylaceae Catuaba do Norte): PARTE I – Histórico, habitat, sinonímia e botânica da catuaba. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 14, n. 1, p. 67-77, 2004a.
- SILVA, A. J. Estudo botânico e químico da catuaba (Erythroxylaceae Catuaba do Norte): PARTE II – Histórico, habitat, sinonímia e botânica da catuaba. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 14, n. 2, p. 145-151, 2004b.

- SILVA, A. J. Estudo botânico e químico da catuaba (Erythroxylaceae Catuaba do Norte): PARTE III – Estudo químico da catuaba. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 1, p. 77-81, 2005.
- SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 289-325.
- SOUZA, P. R. T. *Terpenos isolados de Trichilia casaretti e Trichilia silvatica (Meliaceae)*. 2008. 133 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Jequié, 2008.
- SPANEMBERG, J. C.; CHERUBINI, K.; FIGUEIREDO, M. A. Z.; GOMES, A. P. N.; CAMPOS, M. M.; SALUM, F.G. Effect of an herbal compound for treatment of burning mouth syndrome: randomized, controlled, double-blind clinical trial. *Oral medicine*, v. 113, n. 3, p. 373-377, 2012.
- SUMITA, C.; TSUHAKO, M.; BABA, Y. Simultaneous analysis of genes by capillary electrophoresis with a laser-induced fluorescence detector using a stepwise field strength gradient. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 47, n.1, p. 111-113, 1999.
- TAGLIARO, F.; MANETTO, G.; CRIVELLENTI, F.; SMITH, F. P. A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Science International*, v. 92, p. 75-88, 1998.
- TANG, W.; HIOKI, H.; HARADA, K.; KUBO, M.; FUKUYAMA, Y. Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 2010-2013, 2007.
- THE PLANT LIST. Version 1. 2010. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/browse/A/Meliaceae/>>. Data de acesso: 09 jan. 2013.
- TIAN, J.; QIN, W. Quick and sensitive determination of flavonoids by capillary electrophoresis-potential gradient detection. *Analytical Sciences*, v. 25, p. 1119-1123, 2009.
- TISSOT, A. C. *Testes de repelência com nova metodologia em Aedes aegypti Linnaeus, 1762 (Culicidae, Diptera) e determinação química do óleo essencial de Trichilia pallida (Meliaceae)*. 2008. 100 f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.
- VALMORBIDA, J. *Propagação da espécie Trichilia catigua A. Juss (Catigua)*. 2007. 110 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, 2007.

- VAZ, Z. R.; MATA, L. V.; CALIXTO, J. B. Analgesic effect of the herbal medicine Catuama in thermal and chemical models of nociception in mice. *Phytotherapy Research*, v. 11, p. 101-106, 1997.
- VIANA, A. F.; MACIEL, I. S.; MOTTA, E. M.; LEAL, P. C.; PIANOWSKI, L.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive activity of *Trichilia catigua* hydroalcoholic extract: new evidence on its dopaminergic effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 1-8, 2011.
- WANG, J. *Analytical Electrochemistry*. 2ª edição. New York: Wiley-VCH, 2000. 209p.
- WANG, J.; CHEN, D.; CHEN, Z.; FAN, G.; WU, Y. Fast separation and determination of coumarins in *Fructus cnidii* extracts by CEC using poly(butyl-methacrylate-co-ethylene dimethacrylate-co-[2-(methacryloyloxy) ethyl] trimethylammonium chloride) monolithic columns. *Journal of Separation Science*, v. 33, p. 1099-1108, 2010.
- WEINBERGER, R. *Practical Capillary Electrophoresis*. San Diego: Academic Press, Inc., 1993. 312p.
- WHEELER, D. A.; ISMAN, M. B. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 81, p. 9-16, 2001.
- WIND, M.; HOFFMANN, P.; WAGNER, H.; THORMANN, W. Chiral capillary electrophoresis as predictor for separation of drug enantiomers in continuous flow zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 895, p. 51-65, 2000.
- YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia*. 3ª edição. Itajaí: Editora da Universidade do Vale do Itajaí, 2012. 384 p.
- ZHANG, H.; WU, S.; SHEN, Y.; MA, Y.; WU, D.; QI, S.; LUO, X. A pentanortriterpenoid with a novel carbon skeleton and a new pregnane from *Trichilia connaroides*. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 81, p. 253-257, 2003.
- ZHU, W.; VIGH, W. Enantiomer separations by nonaqueous capillary electrophoresis using octakis(2,3-diacetyl-6-sulfato)- $\gamma$ -cyclodextrin. *Journal of Chromatography A*, v. 892, p. 499-507, 2000.