



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS



**DESENVOLVIMENTO DE FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA COMPRIMIDO
CONTENDO EXTRATO SECO POR ASPERSÃO DE *TRICHILIA CATIGUA***

RENATA LONGHINI

Maringá
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA COMPRIMIDO
CONTENDO EXTRATO SECO POR ASPERSÃO DE *TRICHILIA CATIGUA***

Tese apresentada por **Renata Longhini**
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade
Estadual de Maringá como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

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

L854d Longhini, Renata
Desenvolvimento de forma farmacêutica sólida comprimido contendo extrato seco por aspersão de *Trichilia catigua* / Renata Longhini. -- Maringá, 2013.
131 f. : il. color., figs., tabs., quadro.
Orientador : Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.
Tese (doutorado em Farmácia) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.
1. *Trichilia catigua* (Catuaba) - Validação analítica. 2. *Trichilia catigua* (Catuaba) - Extrato seco. 3. *Trichilia catigua* (Catuaba) - Comprimido. 4. *Trichilia catigua* (Catuaba) - Perfil de dissolução. 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.615.321

ZSS-00893

RENATA LONGHINI

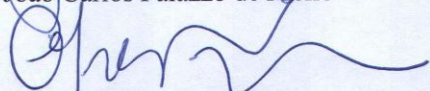
**DESENVOLVIMENTO DE FORMA FARMACÊUTICA SOLIDA
COMPRIMIDO CONTENDO EXTRATO SECO POR
ASPERSÃO DE *Trichilia catigua***

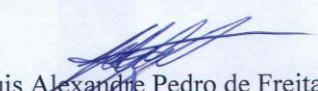
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

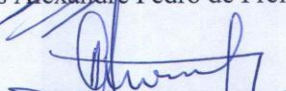
Aprovada em 28 de fevereiro de 2013

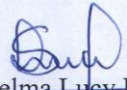
BANCA EXAMINADORA


Dr. João Carlos Palazzo de Mello


Dra. Gisely Cristiny Lopes


Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas


Dr. Pedro Rps Petrovick


Dra Selma Lucy Franco

Como águas profundas são os propósitos do coração do homem,
mas o homem de inteligência sabe descobrí-los.

Provérbios 20:5

AGRADECIMENTOS

Águas profundas são as palavras da boca do homem, e a fonte de sabedoria ribeiros transbordantes (Pv. 18:4). Ao meu orientador, Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, pela orientação profissional, apoio, responsabilidade, dedicação e constante incentivo dispensado na realização deste trabalho, além dos muitos outros trabalhos...correções, execuções, reforma...rs...mas sei que tudo cooperou na formação de meu caráter profissional e pessoal, aprendi muito, em muitas áreas. Obrigada por compartilhar estes anos comigo.

Onde não há conselho fracassam os projetos, mas com os muitos conselheiros, há bom êxito (Pv. 15:22). Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi, obrigada por sua dedicação, atenção e prontidão em ajudar sempre quando necessário, compartilho com você esta conquista. Aos demais mestres que sempre abriram as portas quando em dificuldades eram procurados, dando direção, orientação e apoio.

Ao Prof. Norberto Pepporine Lopes por toda atenção e disponibilidade, sempre abrindo as portas do seu laboratório para satisfazer indagações científicas. Aos técnicos José Carlos Tomaz e Jacqueline Mendonça pelo auxílio na realização dos experimentos e por tornarem as idas à Ribeirão Preto sempre agradáveis.

À Profa. Dra. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira pela parceria nos experimentos farmacológicos, seus resultados nos guiaram ao desenvolvimento e objetivo desta tese. Ao Prof. Benedito Prado Dias Filho por disponibilizar o equipamento de *spray-dring*. À Profa. Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso, por disponibilizar os equipamentos para caracterização e produção dos comprimidos. Aos professores do Laboratório de Química Farmacêutica por disponibilizarem os equipamentos para caracterização dos comprimidos. Vocês ajudaram a tornar este trabalho possível.

Aos meus amigos do Laboratório Palafito, minha família científica: Andressa Blainski, André Oliveira Fernandes da Silva, Ana Luiza Sereia, Audrey Alessandra Stinghen Garcia Lonni, Bruna Aparecida Alves Aguiar, Fabio Bahls Machado, Fernanda Giacomini Bueno, Gisely Cristiny Lopes, Leila Larisa Medeiros Marques, Letícia Maria Krzyzaniak, Lia Akina Ito, Maísa Almeida Leite, Maria Cristina DiCiaula, Sandra Cristina Giroto Pinto, Tânia Mara Antonelli Ushirobira, Traudi Klein e Vanessa Marquito Munhoz, os mais chegados e os mais distantes, obrigada pela companhia, pelas discussões e esclarecimentos durante todo o curso, pelos momentos de descontração e risadas, várias risadas, nunca faltando o incentivo naqueles momentos não muito felizes e, sobretudo, pelo compartilhar de vidas durante estes anos. À Traudi, em especial, pelos anos de parceria, a validação nos permitiu várias conversas e compartilhar de vida. À Ana Luiza, por dividir as dificuldades e os achados referentes a catuaba, trabalhar com você foi um prazer, espero manter a parceira. *Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um enorme prazer para mim dividir um planeta e uma época com você* (Carl Sagan). Vocês são brilhantes!!!

À todos os colegas do curso de Pós-Graduação, pelo convívio, auxílio e companheirismo no compartilhar científico e pessoal.

Agradeço aos meus professores e amigos da Universidade Estadual de Maringá, pelo constante incentivo em explorar novos caminhos. À Profa. Dra. Andréa Diniz que além de parceira de projeto é amiga e visionária, tenho aprendido muito com você. Aos demais professores que aceitaram o desafio em desvendar a catuaba, construir e participar disto com vocês tem sido uma honra, e um aprendizado incrível, envolvendo diversas áreas. Aos mais que técnicos, meus amigos, Cláudio Roberto Novello e Admir Arantes, estes anos de trabalho muitas vezes foram suavizados por curtas e longas conversas, seus conhecimentos vão além de técnicas e equipamentos, obrigada por tudo! À secretária Francisca Helena

Mesquita de Carvalho, a Helenitcha, sempre nos atendeu em seu divã, lá ela ouvia, aconselhava e resolvia, às vezes com bronca, mas sempre foi nossa mãezonal!

Obrigada aos membros da minha banca, por avaliarem com tanto carinho e seriedade minha tese, as discussões e sugestões agregam para estudos futuros. Ao Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick, pelo carinho e reencontro, sua presença foi importante, fechou um ciclo na minha vida, mas ficará marcado para sempre como meu pai-avô científico. À profa Dra. Selma Lucy Franco, pelo carinho em todo nosso convívio científico e pessoal, foi professora, orientadora e banca, não podíamos terminar esta fase de maneira melhor. À Dra. Gisely Cristiny Lopes, seu profissionalismo e competência me fazem querer buscar sempre o melhor, além de ser uma grande amiga, para todas as horas. Ao Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas, tão prontamente atendeu meu convite, seu conhecimento e simplicidade me fizeram admirá-lo, foi um prazer conhecê-lo.

Lembro ainda os amigos que aqui não mencionei aqueles fora do ambiente acadêmico, que não pouparam esforços, dedicação, palavras de incentivo, de ânimo, orações e a companhia, principalmente as que estiveram mais diretamente ligadas a mim, Cristiane, Heloísa, Lelandy e Rafaela. A eles, meu muito obrigado, que Deus possa recompensar a cada minuto todo o amor dispensado. *Quanto aos santos que há na terra, são eles os notáveis nos quais tenho todo o meu prazer* (Sl 16:3). Vocês são notáveis!!!

Gratidão também aos meus pais, Airton e Ivone, que com sabedoria e amor me ensinam: *Filho meu, guarda ao mandamento de teu pai e não abandones a instrução da tua mãe, ata-os perpetuamente em teu coração e pendura-os no teu pescoço. Quando caminhares isso te guiará; quando te deitares, te guardará; quando acordares, falará contigo. Porque o mandamento é uma lâmpada e a instrução uma luz e as repreensões da disciplina são o caminho da vida* (Pv. 6:20-23). Sustentaram minha vida com amor e orações, além da presença constante. Aos meus irmãos Alexandre, Marcelo e Maria Elisa, bem como cunhada Vanessa, e sobrinhos, Letícia, Alexandre Júnior, João Victor e Felipe, pessoas formidáveis, a existência de vocês são motivo de alegria para mim.

Ao meu marido amado, Junior, obrigada por seu companheirismo e amor. *Melhor é serem dois do que um, porque tem melhor paga do seu trabalho* (Ec 4:9). Você me conheceu estudante de doutorado, participou desde o início, compartilhou lutas, alegrias e realizações, contemplamos milagres na nossa vida pessoal e podemos declarar sem dúvida nenhuma: *com efeito, grandes coisas fez o Senhor por nós; por isto estamos alegres* (Sl 126:3).

Graças, porém, a Deus que em Cristo sempre nos conduz em triunfo, e, por meio de nós, manifesta em todo lugar a fragrância do seu conhecimento (2 Cor 2:14). A Ele seja o louvor, e a glória, e a sabedoria, e as ações de graça, e a honra, e o poder, e a força sejam ao nosso Deus pelos séculos dos séculos. Amém. (Ap 7:12)

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios Palafito (Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello), no Laboratório de Química Farmacêutica e Síntese, do Prof. Dr. Arildo José Braz de Oliveira, no Laboratório do Prof. Dr. Benedito Prado Dias Filho e da Profa. Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso, empregando também equipamentos do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (Comcap), da Universidade Estadual de Maringá e do Laboratório de Química Orgânica do Curso de Farmácia da USP – Ribeirão Preto (Prof. Dr. Norberto P. Lopes). Agradecimentos a CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	xii
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Quadros.....	xiv
Lista de Anexos.....	xv
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xvii
Resumo	xviii
Abstract	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
 CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
Propriedades biológicas e fitoquímica de algumas espécies conhecidas como Catuaba, com ênfase na espécie <i>Trichilia catigua</i>.....	8
Resumo	8
Abstract	8
1. Introdução	9
2. Algumas espécies confundidas como catuaba.....	11
3. Família Meliaceae.....	13
4. Gênero <i>Trichilia</i>	14
5. <i>Trichilia catigua</i>	16
6. Composição química e atividade biológica da <i>Trichilia catigua</i>	19
7. Toxicologia	31
8. Métodos analíticos e formas farmacêuticas.....	32
9. Desafios	37
10. Referências	38
 CAPÍTULO 2 – VALIDAÇÃO ANALÍTICA	47
Development and validation studies for determination of phenylpropanoid substituted flavan-3-ols in semipurified extract of <i>Trichilia catigua</i> by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection.....	48

Abstract	48
1. Introduction.....	49
2. Materials and methods	52
2.1 Chemicals and reagents.....	52
2.2. Preparation of standard stock solutions	52
2.3 Preparation of extract and analytical solution	52
2.4 Chromatographic system	53
2.5 Validation.....	53
2.5.1 Linearity.....	53
2.5.2 Limit of detection and quantification.....	54
2.5.3 Precision.....	54
2.5.4 Accuracy.....	54
2.5.5 Robustness	54
2.6 Stability	54
2.7 EAF extractive solution quantification	54
2.8 Statistical analysis	55
3. Results and Discussion	55
3.1 Selection of a suitable chromatographic system	55
3.2 Validation of the method	58
3.2.1 Linearity, LOQ and LOD	58
3.2.2 Precision	59
3.2.3 Accuracy	59
3.2.4 Robustness	59
3.3 Stability.....	59
3.4 Quantification of PB2 and EPC and identification of proanthocyanidins	60
4. Concluding remarks.....	61
5. References	62
 CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO DE EXTRATOS POR SPRAY DRIER E DE COMPRIMIDOS CONTENDO CATUABA	 65
PREPARATION OF TABLETS CONTAINING A SPRAY DRIED EXTRACT OF <i>Trichilia catigua</i> extract.....	66
Abstract	66

1. Introduction.....	66
2. Experimental	68
2.1 Materials.....	68
2.2 Preparation of <i>T catigua</i> semipurified extract.....	68
2.3 Preparation of <i>T. catigua</i> spray-dried extracts	68
2.4 Morphology by scanning electron microscopy	69
2.5 Particle size and size distributions	69
2.6 Moisture content of spray dried powders	70
2.7 Determination of bulk and tapped densities of the extracts.....	70
2.8 Determination of Hausner ratio and Carr's Index.....	70
2.9 Analysis of the angle of repose.....	70
2.10 In vitro antioxidant activity	70
2.11 Preparation of tablets by direct compression	71
2.12 Physical evaluation of tablets	72
2.13 Determination of the content of the EAF per tablet	72
2.14 Release profiles and kinetics of dissolution	72
2.15 Statistical analysis	73
3. Results and Discussion	73
4. Conclusion	85
5. References	86
 3. DISCUSSÃO GERAL	 89
4. CONCLUSÕES	93
5. REFERÊNCIAS.....	95
6. ANEXOS	99
7. BIOGRAFIA.....	130

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1	Mobile phases, column type, and flows tested in separation of EAF extractive solutions.....	55
Table 2.	Concentrations of different compounds present in EAF of <i>Trichilia catigua</i> in relation to the internal standard, gallic acid.....	61

CAPÍTULO 3

Table 1	Factors and levels for the 2x3 factorial design for preparation of <i>T. catigua</i> spray-dried extracts.....	69
Table 2.	Qualitative and quantitative composition of the formulation of tablets.....	71
Table 3.	Composition and characterization of all the batches obtained of dried extracts of barks semipurified extract of <i>Trichilia catigua</i>	76
Table 4.	Values of bulk density, tapped density, Carr's Index, Hausner ratio, and activity antioxidant for the spray dried extract.....	77
Table 5.	Specification and results of tests for quality control performed on the formulations.....	79
Table 6.	Values of release exponent for dried extract, tablets in dissolution medium water and in simulated gastric intestinal fluid.....	85

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figure 1	Folhas e inflorescências de <i>Trichilia catigua</i>	16
Figure 2.	Aspectos macroscópicos de cascas íntegras e moídas de <i>T. catigua</i>	17
Figure 3.	Substâncias isoladas de extratos de <i>T. catigua</i>	20

CAPÍTULO 2

Figure 1	Isolated compounds from <i>Trichilia catigua</i>	51
Figure 2.	Chromatogram of EAF fraction with PB2 (1; rt=16.5 min), mixture of catechin and chlorogenic acid (2; rt=20.9 min), cinchonain IIb (3; rt=23.6 min), cinchonain IIa (4; rt=26.6 min), epicatechin (5; rt=29.5 min), mixture of cinchonains Ia and Ib (6; rt=33.8 min). Chromatographic conditions system H, with flow of 0.4 mL/min (see Table 1).....	56
Figure 3.	Chromatogram of the enantiomeric separation of the semipurified fraction EAF and cinchonain Ia and Ib standards. Isocratic elution; Chiralcel OD-H.....	57

CAPÍTULO 3

Figure 1	General aspects of the tablets produced from Formulation A and B	79
Figure 2.	SEM of EAF, dried extract batch L10, dried extract batch L11, dried excipients batch L10 and dried excipients batch L11.....	81
Figure 3.	Release profiles of procyanidin B2 and epicatechin in dried extract containing EAF, water as dissolution medium.....	83
Figure 4.	Release profiles of procyanidin B2 and epicatechin in tablets containing EAF, water as dissolution medium.....	83
Figure 5.	Release profiles of procyanidin B2 and epicatechin in tablets containing EAF, simulated gastric intestinal fluid as dissolution medium.....	84

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1	Atividade biológica observada em espécies do gênero <i>Trichilia</i>	15
----------	--	----

LISTA DE ANEXOS

Tabela A1.	Perda por dessecação das cascas de <i>Trichilia catigua</i>	100
Tabela A2.	Determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais das cascas de <i>Trichilia catigua</i>	102
Tabela A3.	Determinação do teor de extrativos das cascas de <i>Trichilia catigua</i>	103
Tabela A4.	Determinação dos teores de cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido e cinzas sulfatadas das cascas de <i>Trichilia catigua</i>	104
Tabela B1.	Ensaio de identificação e perda por dessecação dos adjuvantes tecnológicos.....	108
Tabela C1.	Determinação do conteúdo de polifenóis totais e taninos totais do extrato bruto e da fração acetato de etila.....	109
Tabela C2.	Capacidade antioxidante de diferentes extratos brutos e frações acetato de etila de <i>Trichilia catigua</i> demonstrada pela redução do DPPH•.....	110
Tabela D1.	Atividade antioxidante da solução metanólica de fração acetato de etila obtida das cascas de <i>Trichilia catigua</i> submetida ao teste de estabilidade à temperatura ambiente.....	112
Figura D1.	Aspecto das soluções de cinchonina lá nos tempos zero, 7 e 14 dias, expostas à temperatura ambiente.....	113
Figura D2.	Cromatograma obtido para a amostra de FAE em 425 nm de uma amostra recém preparada e uma amostra com 7 dias de preparo.....	113
Figura D3.	Espectro de ultravioleta obtido para a amostra de FAE recém preparada para os picos com tempo de retenção em 19,6 e 20,7 min, respectivamente.....	114
Figura D4.	Espectro de massas obtido para a amostra de FAE recém preparada para o pico em 19,6 e 20,7 min, respectivamente.....	115
Figura E1.	Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L1 de <i>T. catigua</i>	117
Figura E2.	Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L2 de <i>T. catigua</i>	117
Figura E3.	Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L3 de <i>T. catigua</i>	118

Figura E4.	Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L4 de <i>T. catigua</i>	118
Figura E5.	Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L5 de <i>T. catigua</i>	119
Figura E6.	Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L6 de <i>T. catigua</i>	119
Figura E7.	Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L7 de <i>T. catigua</i>	120
Figura E8.	Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L8 de <i>T. catigua</i>	120
Figura E9.	Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L9 de <i>T. catigua</i>	121
Figura E10.	Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L10 de <i>T. catigua</i>	121
Figura E11.	Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L11 de <i>T. catigua</i>	122
Figura F1.	Fotomicrografia dos extratos secos obtidos por aspersão, referentes ao Capítulo 3.....	123
Figura G1.	Descoramento do radical ABTS ^{•+} quando adicionado de diferentes concentrações de Trolox.....	127
Tabela G1.	Capacidade antioxidante em plasma da fração acetato de etila, imipramina e solução salina após 14 dias de tratamento via oral por gavagem.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2-azinobil (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
CSD	Dióxido de silício coloidal
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
FAE ou EAF	Fração acetato de etila
EPC	Epicatequina
IC ₅₀	Concentração
LACT	Lactose
MALT	Maltodextrina
PB2	Procianidina B2

RESUMO

O interesse nas plantas medicinais bem como o conhecimento de suas atividades biológicas continua crescente e promissora. Mesmo com o avanço da terapêutica tradicional, o apelo ao natural e a busca de alternativas terapêuticas é notório, por isto as plantas medicinais continuam em foco. Os produtos naturais ainda representam uma fonte valiosa para a produção de novos compostos químicos. Entre as drogas vegetais da biodiversidade brasileira, a *Trichilia catigua* A. Juss., conhecida popularmente como catuaba, tem sido amplamente utilizada pela população, como tônico para o tratamento de fadiga, estresse, impotência sexual e déficits de memória. Estudos comprovaram atividades como antibacteriana, tripanocida, antiinflamatória, antidepressiva e para memória, e ainda possui capacidade antioxidante superior à vitamina C e Trolox. Relata-se que os componentes químicos responsáveis pela maioria destas atividades são os compostos fenólicos, principalmente taninos, os quais são encontrados em abundância nas cascas desta planta. Para avaliar a qualidade dos extratos obtidos foi desenvolvido um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de procianidina B2 (PB2), epicatequina (EPC), cinchonâinas Ia, Ib, IIa e IIb, catequina e ácido clorogênico em fração acetato de etila (FAE) obtida das cascas de *T. catigua*. O método consiste de um sistema gradiente de eluição tendo como fase móvel metanol:acetonitrila (75:25, v/v) e água, ambos acidificado com 0,05% de ácido trifluoroacético, variando-se a proporção da fase orgânica de 30 a 40% em 36 min, reestabelecendo o sistema. A coluna utilizada foi a Luna PFP(2), com fluxo de 0,4 mL/min e 280 nm. O processo de validação demonstrou que o método foi linear, preciso, exato, robusto e estável, sendo útil para o controle de qualidade de *T. catigua*, bem como do produto acabado. A fim de melhorar as características tecnológicas de FAE foram desenvolvidos 11 extratos secos por aspersão, contendo 70% de FAE e 30% de uma mistura binária de adjuvantes de secagem, sendo eles: dióxido de silício coloidal (CSD), maltodextrina (MALT) e lactose (LACT), em diferentes proporções entre si. Os melhores extratos foram os lotes L10 (CSD:LACT, 50:50) e L11 (CSD:LACT, 75:25), destinados a produção de comprimidos por compressão direta, os quais foram caracterizados quanto ao seu aspecto visual, dureza, friabilidade, desintegração, dissolução e doseamento, estando dentro das especificações farmacopeicas. A dissolução e o perfil de liberação foram avaliados, variou conforme o meio de dissolução. Os comprimidos demonstraram ser adequados para produção.

Palavras-chave: *Trichilia catigua*, validação analítica, extrato seco por aspersão, comprimidos, perfil de dissolução.

ABSTRACT

The interest in medicinal plants and the knowledge of their biological activities continues rising and promising. Even with the advancement of traditional therapy, the appeal to nature and the search for alternative therapies is evident, therefore medicinal plants remain in focus. Natural products still represent a valuable source for production of new chemical compounds. Among the herbal drugs Brazilian biodiversity, the *Trichilia catigua* A. Juss., Popularly known as catuaba, has been widely used by the population as a tonic for the treatment of fatigue, stress, impotence and memory deficits. Studies confirmed activity as antibacteria, trypanocidal, anti-inflammatory, antidepressant and memory, and also have antioxidant than vitamin C and trolox. It is reported that the chemical constituents responsible for most of these activities are phenolic compounds, mainly tannins, which are found in abundance in the bark of this plant. To evaluate the quality of extracts was developed a method by high performance liquid chromatography (HPLC) for quantification of procyanidin B2 (PB2), epicatechin (EPC), cinchonins Ia, Ib, IIa and IIb, catechin and chlorogenic acid in acetate fraction acetate (MEF) obtained from the bark of *T. catigua*. The method consists of a gradient elution system with as mobile phase methanol: acetonitrile (75:25, v/v) and water, both acidified with 0.05% trifluoroacetic acid, varying the proportion of the organic phase of 30 to 40% in 36 min, reestablishing the system. The column used was a Luna PFP (2), with a flow of 0.4 mL / min and at 280 nm. The validation process demonstrated that the method was linear, precise, accurate, robust and stable, and is useful for quality control *T. catigua* and the finished product. In order to improve the technological characteristics of FAE, 11 spray-drying extracts were developed, containing 70% of the FAE and 30% of a binary mixture of adjuvants drying: colloidal silicon dioxide (CSD), maltodextrin (MALT) and lactose (LACT), in different ratios between them. The best extracts were batches L10 (CSD:LACT, 50:50) and L11 (CSD:LACT, 75:25) for the production of tablets by direct compression, were characterized according to their visual appearance, hardness, friability, disintegration, dissolution and content, results are in agreement with pharmacopoeial specifications. The dissolution and release profile were evaluated, the dissolution media was varied. The tablets proved to be suitable for production.

Keywords: *Trichilia catigua*, analytical validation, spray dried extract, tablets, dissolution profile.

A transformação de uma planta em medicamento deve visar a preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de utilização, além de valorizar o seu potencial terapêutico (BRASIL, 2000).

Algumas das vantagens de se investir em fitoterápicos e, que justificam seu uso, são os efeitos sinérgicos, associação de mecanismos por substâncias agindo em alvos moleculares diferentes e muitas vezes fornecem substâncias protótipo para o projeto de fármacos mais eficientes em determinados alvos moleculares (YUNES et al., 2001).

A fundamentação científica necessária para o desenvolvimento de um fitoterápico o diferencia das plantas medicinais e das preparações utilizadas na medicina popular (SONAGLIO et al., 2010), assim atribui-se a estas plantas e preparações um valor tecnológico.

Há diversas fases de desenvolvimento para que um medicamento exista e seja adequado ao uso. Dentre elas, podemos citar a fase de pré-formulação e formulação. Na pré-formulação procura-se avaliar todas as características físicas, físico-químicas, químicas e tecnologias que permitam conhecer o comportamento do ativo em seus ambientes circundantes: atmosfera, formulação e meios biológicos. Estas informações guiam os estudos de estabilidade, o desenvolvimento de ensaios cromatográficos, a escolha de adjuvantes, morfologia, tamanho de partículas, propriedades de fluxo e a própria etapa de formulação (WELLS, 2005). O mesmo pensamento pode ser aplicado ao desenvolvimento de fitoterápicos, onde se avalia, principalmente, a estabilidade, metodologia analítica e propriedades tecnológicas para a formulação que se deseja.

O sucesso de uma formulação farmacêutica depende não apenas da qualidade da substância ativa e do processo de produção, mas também da cuidadosa seleção de adjuvantes que serão adicionados para facilitar a administração, adequar às condições da via de administração, viabilizar a produção de forma farmacêutica, promover biodisponibilidade adequada, proteger o fármaco de degradação, manter suas características químicas, físicas e estado microbiológico (PIFFERI et al., 1999; WELLS, 2005; PETROVICK, 2005).

Considerando que a produção de fitoterápicos segue as mesmas etapas de processamento de um medicamento sintético, pode-se lançar mão dos mesmos recursos usados para os sintéticos, não esquecendo que medicamentos fitoterápicos podem conter, como componente ativo, extratos secos, que devem ter características tecnológicas adequadas, como, por exemplo, fluxo e compressibilidade, para que consigam fluir para a câmara de compressão.

O primeiro passo que deve ser pensado na produção de um medicamento fitoterápico na forma farmacêutica comprimido é a obtenção do extrato seco a partir da

matéria-prima vegetal. Uma técnica que tem se demonstrado interessante é a secagem por aspersão ou nebulização, também conhecida pela denominação em inglês *spray-drying*.

Os produtos secos por aspersão são facilmente reconhecíveis, possuindo, normalmente, aparência uniforme. Algumas partículas apresentam características de esferas ocas, algumas vezes com um pequeno orifício, resultante do processo de secagem (AULTON, 2005). O pó aspergido pelo *spray-dryer* é particularmente apreciado como de livre fluxo, esta propriedade é devido a forma esférica da partícula (REMILI et al., 1994).

Dentre as formas farmacêuticas sólidas, os comprimidos representam a forma farmacêutica de maior frequência de uso na terapêutica medicamentosa, constituindo boa parte de todos os produtos constantes na RENAME (BRASIL, 2002).

Após obtenção de extrato seco, o passo seguinte compreende a compressão propriamente dita. A compressão direta consiste no modo mais simples de reduzir tempo e custos e minimiza as operações envolvidas no tratamento prévio da mistura de material particulado antes da compressão. Contudo, os adjuvantes adequados a compressão direta, como materiais de enchimento e aglutinantes especiais, costumam ser mais caros que os tradicionais. Como desvantagens desta técnica podem citar o uso de partículas relativamente grandes, para obter material particulado com fluidez e densidade bruta aceitável, devendo possuir uma compactabilidade alta (ALDERBORN, 2005).

Um dos problemas frequentes na produção de comprimidos contendo extratos vegetais advém das suas deficientes propriedades reológicas e elevada sensibilidade à umidade. A adição de adjuvantes farmacêuticos minimiza, mas não supre, totalmente, estas deficiências (COUTO, 2000).

Na área de tecnologia da compressão de extratos secos vegetais, estudos de compressibilidade e fluidez têm sido aplicados com frequência para o melhor entendimento dos fenômenos relacionados à compactação destes produtos frente às variáveis ligadas à formulação, desde a própria tecnologia de obtenção de extratos, até a influência dos adjuvantes e métodos de compressão (PLAIZIER-VERCAMMEN et al., 1991; GONZÁLEZ ORTEGA; SCHIMIDT, 1995; SOARES et al., 2003; DE SOUZA et al., 2005).

Com a finalidade de aplicar os recursos tecnológicos no desenvolvimento de um medicamento fitoterápico na forma de comprimido escolheu-se a *Trichila catigua*, como a planta de estudo por ser reconhecida na medicina popular no tratamento de fadiga, estresse, impotência sexual e déficits de memória (PIZZOLATTI et al., 2002a). Além disto, a literatura científica descree atividades como: relaxamento prolongado e sustentado em corpos cavernosos (ANTUNES et al., 2001), reversão da fibrilação ventricular (PONTIERI et al., 2007), antiinflamatória pela inibição da fosfolipase A₂ (PLA₂) (BARBOSA et al., 2004), antidepressiva (CAMPOS et al., 2005; CHASSOT et al., 2011; BONASSOLI et al., 2012), antioxidante (TANG et al., 2007; RESENDE, 2007; CHASSOT et al., 2011), bacteriostática

(PIZZOLATTI et al., 2002) e tripanocida (PIZZOLATTI et al., 2003), constituindo, portanto, uma planta com amplo potencial terapêutico.

Pretendeu-se viabilizar uma formulação sólida oriunda de uma fração semipurificada de *T. catigua*, objeto deste estudo.

Assim, o presente trabalho representa uma contribuição ao desenvolvimento de uma forma farmacêutica sólida contendo alto teor de extrato seco vegetal obtido por *spray-drying*, partindo de um produto seco por liofilização originado da extração seletiva das cascas de *T. catigua* com posterior fracionamento, conforme definido por Resende (2007). O objetivo experimental é torná-lo viável como matéria-prima farmacêutica, com maior valor tecnológico agregado. Para isto, foram contempladas as atividades de caracterização deste produto seco, relacionando-se a etapa de pré-formulação na fase de desenvolvimento farmacêutico, definição da composição de produtos intermediários e caracterização do produto final.

2.1 Objetivo geral

Este trabalho visou obter extrato seco por aspersão das cascas de *Trichilia catigua* com características tecnológicas adequadas para o subsequente desenvolvimento de forma farmacêutica comprimido, avaliando sua qualidade e a manutenção da atividade antioxidante *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a qualidade da matéria-prima vegetal: cascas de *T. catigua*.

Desenvolver e validar metodologia analítica por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Preparar e caracterizar produto seco por aspersão, a partir de uma fração semipurificada de *Trichilia catigua*, e avaliar as características tecnológicas destes extratos e da fração liofilizada.

Verificar se há manutenção da atividade antioxidante *in vitro* do extrato seco por aspersão.

Desenvolver e produzir caracterizar forma farmacêutica comprimido contendo alto teor de extrato seco obtido por aspersão.

Dessa forma a tese foi organizada em três capítulos na forma de artigo, a saber:

- Capítulo 1. Revisão Bibliográfica: “Propriedades biológicas e fitoquímica de algumas espécies conhecidas como Catuaba, com ênfase na espécie *Trichilia catigua*”.
- Capítulo 2. Validação analítica: “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”, publicado no periódico *Journal of Separation Science*.
- Capítulo 3. Desenvolvimento de extratos por *spray drier* e de comprimidos contendo catuaba: “Preparation of tablets containing a spray dried extract of *Trichilia catigua*”.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo consiste em uma revisão bibliográfica da *Trichilia catigua*, bem como seu gênero e espécies confundidas como catuaba, abordando aspectos químicos, farmacológicos e toxicológicos. Será submetido à publicação.

**Propriedades biológicas e fitoquímica de algumas espécies conhecidas como
Catuaba, com ênfase na espécie *Trichilia catigua***

LONGHINI, R.; LONNI, A.A.S.G.; SEREIA, A.L.; MELLO, J.C.P.[§]

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil

[§] Autor para correspondência: Avenida Colombo, 5790, BR 87020-900, Maringá, PR, Brasil; Fone: +55-44-3261-4816; Fax: +55-44-3261-4999; E-mail: mello@uem.br

RESUMO

As plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial. Estima-se que, cerca de 25 a 30% de todas os fármacos avaliados como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais. Pesquisas realizadas na indústria farmacêutica demonstraram que para doenças complexas, os produtos naturais ainda representam uma fonte valiosa para a produção de novos compostos químicos, já que eles possuem estruturas privilegiadas. Entre as drogas vegetais da biodiversidade brasileira, a catuaba é empregada popularmente como tônico para tratamento de fadiga, estresse, impotência sexual, déficits de memória. Estudo demonstram atividades antibacteriana, tripanocida, antioxidante, antiarrítmica, antidepressiva, melhora da memória, antiinflamatória e ainda como fitocosmético no tratamento da celulite e como preventivo do envelhecimento cutâneo. As plantas brasileiras conhecidas e utilizadas como catuaba, são representadas por mais de 20 espécies diferentes, contudo, a planta encontrada mais comumente no Brasil como catuaba é a espécie vegetal *Trichilia catigua*. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é apresentar uma revisão de *T. catigua*, com ênfase nas atividades biológicas, propriedades químicas, desenvolvimento analítico e formulações relatadas na literatura, a fim de proporcionar um olhar abrangente e uma visão mais detalhada, visando um medicamento fitoterápico e/ou fitocosmético, assim como perspectivas futuras para sua exploração comercial e direções para estudos futuros.

ABSTRACT

Medicinal plants play an important role in human health care. It is estimated that about 25 to 30% of all drugs are evaluated as therapeutic agents derived from natural products. Research in the pharmaceutical industry demonstrated that for complex diseases, natural products still represent a valuable source for production of new chemical compounds, since they possess privileged structures. Among the Brazilian biodiversity, the catuaba is popularly used as a tonic to treat fatigue, stress, impotence, memory deficits. The studies show activities antibacterial, trypanocidal, antioxidant, antiarrhythmic, antidepressant, improved of memory, anti-inflammatory and as phytocosmetic in cellulite treatment and as a anti aging. The Brazilian plants known and used as Catuaba, are represented by more than 20 different species, however, the plant most commonly found in Brazil as Catuaba is the species *Trichilia catigua*. Thus, the aim of this paper is to present a review of *T. catigua*, with emphasis on biological activities, chemical, analytical development and formulations in order to provide a broader and deeper insight, seeking a herbal medicine and / or phytocosmetic as well as future prospects for commercial exploitation and directions for future studies.

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade tem por definição a variedade e variabilidade existente entre organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais eles ocorrem. É uma associação de vários componentes e uma das suas principais características é sua distribuição relativamente desigual dos seus componentes no espaço geográfico (GUERRA & NODARI, 2010).

Os fitofármacos e os fitoterápicos são componentes da biodiversidade provenientes dos recursos genéticos vegetais, representam produtos de importância econômica (GUERRA & NODARI, 2010). Atualmente, as plantas medicinais representam um papel importante na saúde mundial. Estima-se que 25 a 30% de todos os fármacos são derivados de produtos naturais (CAMPOS et al., 2005; VEIGA-JUNIOR & MELLO, 2008).

A transformação de uma planta em medicamento deve visar a preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de utilização, além de valorizar o seu potencial terapêutico (BRASIL, 2000).

A fundamentação científica necessária para o desenvolvimento de um fitoterápico o diferencia das plantas medicinais e das preparações utilizadas na medicina popular (SONAGLIO et al., 2010), assim atribui-se a estas plantas e preparações um valor tecnológico agregado.

O medicamento fitoterápico ainda constitui um mercado promissor e a indicação do uso de fitomedicamento na medicina humana visa aumentar a opção terapêutica. Assim, com os fitomedicamentos registrados têm-se as indicações terapêuticas definidas, e a segurança de um medicamento padronizado e com eficácia garantida (KLEIN et al., 2009).

Na área cosmética, a incorporação de extratos vegetais ou ativos naturais isolados em produtos cosméticos tem sido cada vez mais motivada por pesquisadores e formuladores da área, considerando o aumento da expectativa de tempo de vida e a busca da qualidade de vida durante o processo de envelhecimento (IBGE, 2008). Porém, é preciso cautela e um estudo minucioso da eficácia e segurança de cosméticos contendo extratos vegetais para a obtenção de produtos de qualidade aliado ao comprometimento com o desenvolvimento sustentável (FRANQUILINO, 2006).

Com o aumento de expectativa de vida e o consequente envelhecimento da população, as doenças crônico-degenerativas têm figurado como a maior causa de mortalidade e incapacidade no mundo, sendo responsável por 59% dos 56,5 milhões de óbitos anuais. São os chamados agravos não-transmissíveis, que incluem doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, câncer e doenças respiratórias (OPAS, 2009). O reconhecimento de como a interação dietética com os medicamentos fitoterápicos é capaz de modificar a expressão genética de um indivíduo, estimular seu desenvolvimento físico e

mental, aumentar seu bem-estar e diminuir a susceptibilidade frente às doenças crônicas e outras comorbidades tem grandes implicações sociais, especialmente em caso de patologias crônicas (KRAFT, 2006). Ressalta-se que o consumo de medicamentos fitoterápicos para tais finalidades tem crescido tanto que tornou relevante e motivou a obrigatoriedade legal do profissional nutricionista nesta atividade (RDC ANVISA 402, 2007).

Para o desenvolvimento tecnológico de um produto fitoterápico são necessários estudos prévios em diversas áreas do conhecimento, envolvendo conhecimentos botânicos, agrônômicos, químicos, das atividades biológicas, desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológico (SONAGLIO et al., 2010). Isto representa anos de estudos antes que este medicamento chegue até o consumidor.

A flora brasileira constitui em um grande arsenal de plantas, com imenso potencial para produção de fitoterápicos. Dentre elas pode-se destacar a catuaba, amplamente distribuída pelo território brasileiro e que têm seu uso popular consagrado, como tônico para tratamento de fadiga, estresse, impotência sexual e déficits de memória (PIZZOLATTI et al., 2002a).

As plantas conhecidas por catuaba pertencem a diferentes gêneros e famílias, respectivamente, como: *Anemopaegma* (Bignoniaceae), *Erythroxylum* (Erythroxylaceae), *Phyllanthus* (Euphorbiaceae), *Microphilis* (Sapotaceae), *Secundatia* (Apocynaceae), *Tetragastria* (Burseraceae), *Ilex* (Aquifoliaceae), *Trichilia* (Meliaceae) e espécies de Myrtaceae (CORRÊA, 1931; DUCKE, 1966).

Das plantas brasileiras conhecidas e utilizadas como catuaba, há citação de 22 espécies pertencentes à família Meliaceae, sendo: *Trichilia catigua* A. Juss., *T. clausenii* C. DC., *T. dregeana* Sond., *T. ramalhoi* Rizzini, *T. emetica* Vahl, *T. hirta* L., *T. glabra* L., *T. casareti* C. DC., *T. elegans* subsp. *elegans*, *T. lepidota* subsp. *schumanniana* (Harms) T.D. Penn., *T. pallens* C. DC., *T. pallida* Sw., *T. pseudostipularis* (A. Juss.) C. DC., *T. silvatica* C. DC., além de *Eriotheca candolleana* (K. Schum.) A. Robyns (Malvaceae), *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stelfeld & J.F. Souza (Bignoniaceae), *Tommadenia violaceae* (Vell.) Miers (Apocynaceae), *Tetragastris catuaba* Soares da Cunha (Burseraceae), *Secundatia floribunda* A. DC. (Apocynaceae), *Pouteria* sect. *Micropholis* (Griseb.) Baehini (Sapotaceae), *Phyllanthus nobilis* (L. f.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae), e duas espécies da família Erythroxylaceae, *Erythroxylum catuaba* da Silva ex Hamet e *Erythroxylum vacciniifolium* Mart. (PEREIRA, 1982; LAGOS et al., 2006; LORENZI, 2008; PATRÍCIO & CERVI, 2005).

Devido a esta grande variedade fica difícil uma padronização de qual é a espécie verdadeiramente utilizada em que possui a finalidade a que se destina. A confusão vem de longa data, o primeiro relato é de 1906, A.J. da Silva estudou as cascas da catuaba da Bahia e a identificou botanicamente como sendo *Erythroxylum catuaba* A.J. da Silva, da família Erythroxylaceae. No entanto, anos mais tarde, através de avaliações botânicas

confirmou-se que esta espécie não existia e a planta em estudo tinha características da família Meliaceae. Já na primeira edição da Farmacopeia Brasileira (1926) incluíram-se características das raízes *Anemopaegma arvenses* (Vell.) Stellf., pertencente à família Bignoniaceae, comercializada como catuaba na região sul do Brasil, assim, esta espécie estabeleceu-se como oficial. A dificuldade de obtenção das raízes de *A. arvenses* e a busca de alternativas mais baratas e com maior potencial de efetividade terapêutica levou ao surgimento de diversas amostras comercializadas como catuaba, envolvendo mais de 10 espécies de diferentes famílias em várias regiões do país (MARQUES, 1998).

Ressalta-se que a droga catuaba atualmente comercializada corresponde majoritariamente às cascas do caule de *Trichilia catigua* A. Juss., cuja identificação e caracterização farmacognóstica foi realizada e publicada por Marques em 1998. No entanto, passados mais de 14 anos desse esclarecimento, continuam sendo fornecidos lotes de catuaba (cascas) com o nome botânico de *A. arvense*, espécie inscrita na Farmacopeia e que corresponde a raízes esbranquiçadas e não às cascas. Neste caso, fica clara a influência da conveniência que representa uma droga constar da farmacopeia, tratando-se de uma distorção que precisa gradativamente ser combatida e modificada. De fato, a correta identificação da espécie e a existência de estudos que comprovem sua eficácia deveriam valer mais do que a simples inclusão no compêndio oficial, ainda mais em se tratando da 1ª edição publicada em 1926 (MARQUES, 1998).

Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão das espécies conhecidas popularmente como catuaba, porém dando ênfase a espécie *T. catigua*, nas suas propriedades biológicas e químicas, limitações e desafios envolvidos na produção tecnológica de *T. catigua*.

2. ALGUMAS ESPÉCIES UTILIZADAS COMO CATUABA

***Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld & J.F. Souza**

Pertence à família Bignoniaceae, é um arbusto perene, decíduo, ereto, pouco ramificado e com xilopódio desenvolvido de cor clara, com hastes pubescentes, de 30-40 cm de altura, nativo dos cerrados do Brasil Central. Folhas compostas trifolioladas, com folíolos rígidos-coriáceas, de cor mais clara na face inferior, de 10-20 cm de comprimento. Flores grandes, campanuladas, brancas ou amareladas, solitárias, dispostas nas axilas do ápice do caule. Os frutos são cápsulas deiscentes, achatadas, de cor cinza, com poucas sementes membranáceas esbranquiçadas (LORENZI e MATOS, 2002).

A espécie é empregada para fins medicinais em todas as regiões de cerrado, sendo particularmente popular por sua “ação afrodisíaca”. Com as raízes preparado um tônico poderoso e energético estimulante do sistema nervoso. Usada também contra insônia,

neurastenia, nervosismo, hipocondria, falta de memória e para convalescença de doenças graves. As cascas do caule e do xilopódio são empregadas nos quadros de astenia, ansiedade, bronquite crônica e asma brônquica na forma de chá. As raízes são usadas nas preparações afrodisíacas, indicadas contra impotência sexual (LORENZI e MATOS, 2002).

O alcaloide ioimbina tem sido atribuído a esta planta (MARQUES, 1998). Tabanca e colaboradores (2007) isolaram desta espécie a catuabina A, cinchonaína Ia, IIa e candelina A1, as quais apresentaram atividade oxidante. Os autores ainda avaliaram frente as atividades antiinflamatória, antimalárica, e antimicrobiana, além da citotoxicidade, mas nenhuma apresentou atividade significativa, bem como não apresentou toxicidade às células avaliadas.

O uso não regulamentado de *A. arvense* por um longo período causou o desaparecimento desta planta dos mercados e outras plantas, conhecidas regionalmente como catuaba, foram comercializadas em seu lugar. A espécie comercialmente usada hoje é a *T. catigua* (DAOLIO et al., 2008).

***Erythroxylum vacciniifolium* Mart.**

Arbusto ou arvoreta de 3 a 5 m de altura. Pertence a família Erythroxylaceae. Sua copa é rala e as folhagens são semidecíduas. Folhas simples, membranáceas, de 5-7 cm de comprimento. Flores de cor amarelo-alaranjada, reunidas em inflorescências terminais e axilares. Frutos do tipo drupa, de forma ovalada e cor amarelo-escura. É nativa das regiões Nordeste e Planalto Central, estendendo-se até o Pará e Maranhão (LORENZI & MATOS, 2002).

Usada popularmente como estimulante, prática introduzida pelos índios tupis. As cascas são utilizadas na forma de chá ou decocto, ao qual são atribuídas propriedades estimulantes do sistema nervoso central e comprovadas pelos levantamentos etnofarmacológicos. Assim, o decocto de sua casca é empregado contra impotência sexual, bem como para outros tipos de problemas nervosos, como agitação, neurastenia, nervosismo, memória fraca, insônia, hipocondria e fraqueza sexual. Seu uso é contínuo, mesmo com sua eficácia e segurança do uso não tendo sido comprovadas cientificamente (LORENZI & MATOS, 2002).

Os principais constituintes encontrados em seus extratos incluem substâncias das classes dos alcaloides, taninos, substâncias amargas, óleos aromáticos, resina, graxa, fitoesteróis e ciclolignanas (LORENZI & MATOS, 2002). Zanolari e colaboradores (2003a,b) isolaram oito alcaloides tropânicos das cascas de *E. vacciniifolium*, são eles: catuabina D, 7 β -hidroxicatuabina D, catuabina E, 7 β -hidroxicatuabina E, 7 β -acetilcatuabina E, catuabina F, 7 β -hidroxicatuabina F e catuabina G. O mesmo grupo, porém em outro artigo, investigou o conteúdo de alcaloides. Teve por objetivo a obtenção preliminar da estrutura através de

análise *online*, o extrato alcaloídico foi analisado por HPLC acoplado com DAD, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear. A interpretação dos dados de espectroscopia *online* obtida destes extratos levou a elucidação estrutural de seis novos alcaloides e a identificação parcial de 18 outros potencialmente originais dando a direção do mesmo esqueleto tropano esterificado nas posições 3 e 6 pelo ácido 1-metil-1H-pirrol-2 carboxílico e/ou ácido 4-hidróxi-3,5-dimetoxibenzóico (ZONALARI et al., 2003b). Já em 2005, o grupo obteve nove novos alcaloides tropânicos substituídos, elucidado como trapanodiol ou triol alcaloide esterificado por um ácido carboxílico 1-metil-1H-pirrol-2. Um dos compostos isolados foi identificado como um alcaloide tropano N-óxido (ZANOLARI et al., 2005).

***Erythroxylum catuaba* da Silva ex Hamet**

No Brasil a catuaba tem sido tradicionalmente usada como estimulante do Sistema Nervoso Central com propriedades afrodisíacas. Esta propriedade da catuaba é referida a *E. catuaba*, uma entidade botânica pouco definida, faltando descrição das propriedades e tipo de espécime. A identidade botanicamente correta pode ser *E. vacciniifolium* (Erythroxylaceae), *Anemopaegma mirandum* (Bignoniaceae), *Trichilia catigua* (Meliaceae) ou outras (ADAMS et al., 2007).

Uma descrição detalhada da família Erythroxylaceae abrangendo histórico, habitat, sinonímia, formas farmacêuticas, aplicações, observações clínicas e composição química estão bem descritas e revisadas por Silva (2004a, 2004b e 2005).

3. FAMÍLIA MELIACEAE

A família Meliaceae possui distribuição pantropical, incluindo cerca de 50 gêneros e 600 espécies de distribuição predominantemente nos trópicos de todo o mundo. O gênero *Trichilia* possui cerca de 200 espécies distribuídas pela América tropical e África. No Brasil ocorrem seis gêneros e cerca de 100 espécies (JOLY, 2002; SOUZA & LORENZI, 2005).

São arbustos ou árvores, às vezes de grande porte, com folhas alternas compostas (pinada ou bipinadas), em geral grandes, de crescimento apical, sem estípulas, raramente com pontuações translúcidas (algumas *Trichilia*), às vezes com pulvinos na base. Flores pequenas em inflorescências paniculadas terminais ou nas axilas superiores, bissexuadas ou unissexuadas (plantas monóicas, dióicas ou poligâmicas), cíclicas, diclamídeas, de simetria radial. Sépalas e pétalas livres. Estames em número duplo ao das pétalas em geral com filetes alargados soldados em um tubo, com as anteras fixas na porção superior interna, disco nectarífero geralmente presente, gineceu gamocarpelar. Ovário súparo, com 4 a 5 carpelos e outros tantos lóculos, cada qual com 1 ou 2 óvulos. Fruto em geral seco,

capsular loculicida ou baciforme. Sementes frequentemente com arilo ou aladas (JOLY, 2002; SOUZA & LORENZI, 2005).

Como exemplos brasileiros comuns destacam-se os gêneros *Cedrela*, popular cedro, *Carapa*, *Trichilia* e *Guarea*, as quais são também árvores comuns da mata tropical, em geral conhecidas indistintamente como canjeranas, de madeira de boa qualidade (JOLY, 2002).

Plantas pertencentes à família Meliaceae têm sido muito utilizadas na medicina popular. Foram reportadas nesta família, atividades antiviral, anti-helmíntica, antiinflamatória e antirreumática. As propriedades antiinflamatória e antirreumática de alguns membros desta família, como *Azadirachta indica* A. Juss., *Melia azedarach* L. e *Cedrela tubiflora* Bertoni foram explicadas devido à sua ação na resposta imune (BENENCIA et al., 2000).

4. GÊNERO *Trichilia*

O gênero *Trichilia* foi descrito por Browne em 1756, compreende 70 espécies distribuídas na América Tropical, África e região Indo-Malasica, das quais aproximadamente 43 espécies ocorrem no Brasil (PENNINGTON et al., 1981). Pertencente à família Meliaceae é um dos gêneros que possui o maior número de espécies na família e também o que apresenta mais características anatômicas da família Meliaceae, sendo os limonoides os principais metabólitos secundários isolados. Foram isolados deste gênero, triterpenos (cicloartanos e damaranso), fitoesteroides, esteroides pregnanos, cumarinas, lignanas, γ -lactonas, sesquiterpenos, aminoácidos (BELTRAME, 2005) e taninos (BURKILL, 1997).

As plantas brasileiras conhecidas e utilizadas como catuaba, do gênero *Trichilia* são representadas por 14 espécies, sendo: *T. catigua* A. Juss., *T. clausenii* C. DC., *T. dregeana* Sond., *T. ramalhoi* Rizzini, *T. emetica* Vahl, *T. hirta* L., *T. glabra* L., *T. casareti* C. DC., *T. elegans* subsp. *elegans*, *T. lepidota* subsp. *schumanniana* (Harms) T.D. Penn., *T. pallens* C. DC., *T. pallida* Sw., *T. pseudostipularis* (A. Juss.) C. DC., *T. silvatica* C. DC. (PEREIRA, 1982; PATRÍCIO & CERVI, 2005; LAGOS et al., 2007; LORENZI, 2008).

No Paraná, foi relatada a ocorrência de nove espécies (PATRÍCIO & CERVI, 2005): *T. casareti* C. DC., *T. clausenii* C. DC., *T. elegans* subsp. *elegans*, *T. lepidota* subsp. *schumanniana* (Harms) T.D. Penn., *T. pallens* C. DC., *T. pallida* Sw., *T. catigua* A. Juss., *T. pseudostipularis* (A. Juss.) C. DC. e *T. silvatica* C. DC. (PATRÍCIO & CERVI, 2005). Estas espécies de *Trichilia* ocorrentes no Estado do Paraná foram submetidas ao estudo taxonômico, compreendendo descrições, ilustrações, mapas de distribuição geográfica, chave dicotômica, informações sobre a floração e comentários sobre cada táxon (PATRÍCIO & CERVI, 2005).

Várias espécies de *Trichilia* têm sido empregadas na medicina popular no tratamento de várias doenças como desordens hepáticas, e como purgativas, antiepiléptico, antipirético, antimalárico, tônico físico e mental, afrodisíacos e estimulantes sexuais (PIZZOLATTI et al.,

2002a). Alguns dos estudos que comprovam essas atividades encontram-se resumidos no Quadro 1.

Considerando a fitoquímica do gênero *Trichilia*, diversos metabólitos secundários derivados principalmente da rota biossintética dos terpenos foram isolados. Diversas classes de terpenoides foram descritas, dentre elas, 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). Também se relatou a presença de esteroides (MATOS, 2006; NEBO, 2008; CALA, 2010; FIGUEIREDO, 2010), cumarinas (MATOS, 2006; MATOS et al., 2009).

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

Espécie	Atividade Biológica	Referência
<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.	ALMEIDA et al., 2009; FIGUEIREDO, 2010
<i>T. clausenii</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 et al., 2010; CALA, 2010; CALA et al., 2012
<i>T. dregeana</i>	Atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e atividade inibitória sobre as enzimas ciclooxigenase-1 e acetilcolinesterase.	ELDEEN et al., 2005
<i>T. elegans</i>	Atividade inseticida sobre larvas e pupas da lagarta <i>S. frugiperda</i> . Efeitos inibitórios em vários componentes do sistema imune	MATOS et al., 2006 MATOS et al., 2009 NORES et al. 1997
<i>T. emetica</i>	Atividade inibitória da biossíntese de ciclooxigenase e prostaglandina e atividade antifúngica sobre cepas de <i>Candida glabrata</i> . Atividade schistosomicida sobre <i>Schistosoma haematobium</i> . Atividade tripanocida sobre <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> . Atividade antioxidante por inibição da peroxidação lipídica <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	MCGAW et al., 1997 KOLACZKOWSKI et al., 2009 SPARG et al., 2000 KAMANZI ATINDEHOU et al., 2004 GERMANÒ et al., 2006
<i>T. glabra</i>	Atividade anticomplementar e imunomodulatória <i>in vitro</i> . Antiinflamatório	BENENCIA; COULOMBIÉ, 1998; BENENCIA et al., 1995; BENENCIA et al., 2000
<i>T. pallens</i>	Atividade inseticida sobre lagartas e larvas de <i>S. frugiperda</i> .	BOGORNÍ; 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.	BOGORNÍ; 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. ramalhoi</i>	Atividade tripanocida	AMBROZIN et al., 2004
<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.	ALMEIDA et al., 2009; FIGUEIREDO, 2010

5. *Trichilia catigua*

A espécie *T. catigua* (Figura 1) é encontrada em florestas semidecíduais e em parte da Mata Atlântica, vasta distribuição na América do Sul e Central (KLEIN, 1984). É também conhecida como catiguá, catiguá vermelho, catuama, pau-ervilha e catuaba-do-norte (GARCEZ, 1997). Constitui-se numa árvore de até 10 m de altura, sendo que os ramos novos pubescentes tornam-se glabros com a idade e de coloração acinzentada. As folhas são compostas por 5 a 7 folíolos, são curto-pediceladas, oblongo-elípticas, ápice acuminado, irregularmente agudos na base, de até 7 cm de comprimento. As flores podem apresentar coloração branco-amarelada e o fruto é constituído de uma cápsula estreito-oblonga, com pêlos longos rijos e amarelados com aproximadamente 2 cm de comprimento, avermelhado e com apenas uma semente, aparecendo de dezembro a janeiro. A época de floração é de setembro a outubro, entretanto, a cápsula pode permanecer na árvore por 5 a 6 meses antes de florescer (SOUZA et al., 2001; LAGOS et al., 2007).



Figura 1. Folhas e inflorescências de *Trichilia catigua*. **Fonte:** Cláudio Roberto Novello, 2009.

A macroscopia das cascas de *T. catigua* (Figura 2) apresenta superfície externa de cor acinzentada, variando de tons claros e escuros, com aspecto grosseiramente granuloso;

apresenta lenticelas circulares pequenas e fendas longitudinais curtas e superficiais; a superfície externa é avermelhada, com fibras finamente estriadas longitudinalmente; a fratura é externamente granulosa e internamente fibrosa, o odor não é característico e o sabor é fortemente amargo (MARQUES, 1998).



Figura 2. Aspectos macroscópicos de cascas íntegras e moídas de *T. catigua*. **Fonte:** Renata Longhini, 2011.

Marques (1998) também descreveu as características microscópicas desta planta e verificou a presença de súber espesso, com cerca de 30-40 camadas de células, seguidas de 2-3 camadas de células pétreas formando uma faixa descontínua. As regiões corticais e floemáticas são extensas, apresentando inúmeros feixes de fibras esclerenquimáticas alongados e distribuídos transversalmente. Na região floemática, os feixes encontram-se entremeados por raios medulares de 1-2 células de largura. No pó da droga o autor conseguiu visualizar fibras com bainhas cristalíferas, cristais prismáticos de oxalato de cálcio e grãos de amido simples.

A madeira da *T. catigua* é vermelha, compacta, sólida, flexível, bastante resistente às intempéries, adequada para obras externas, marcenaria, carroçaria, torno, carpintaria e excelente lenha. Sua casca é fina, lisa, amarga e adstringente, servindo para curtume e dando aos couros cor amarela muito apreciada, é possível obter uma coloração que vai do amarelo-laranja intenso até o vermelho e o violeta (CORRÊA, 1984). Lorenzi (2008) descreve a madeira da *T. catigua* como sendo leve (densidade 0,43 g/cm³). É também empregada como miolo de portas e painéis, forros, brinquedos, entre outras. A árvore é bastante ornamental, principalmente pela copa estreita de folhagem delicada; presta-se admiravelmente para o paisagismo, principalmente para a arborização de praças e

avenidas. Como planta de rápido crescimento, é útil no plantio de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 2008).

Castellani e colaboradores (2006) estudaram a produção de óleo volátil obtido de folhas e galhos de *T. catigua* em função da época de colheita e verificaram que os maiores rendimentos foram observados no inverno, sendo de 0,21% o teor de óleo volátil encontrado nas folhas e de 0,16%, nos galhos. As amostras foram colhidas na Mata da Silvicultura, um fragmento de Mata Atlântica secundária, localizada no Campus da Universidade Federal de Viçosa (MG). A composição química dos óleos voláteis nas diferentes épocas do ano não foi determinada, assim fica em aberto para estudos futuros.

Lagos e colaboradores (2007) investigaram os caracteres anatômicos de folha e casca de caule da *T. catigua*, com finalidades de aplicação farmacognóstica. Amostras dessecadas do vegetal foram reidratadas, seccionadas à mão livre e coradas. No limbo do folíolo, as células epidérmicas de ambas as faces exibem contorno poligonal a levemente ondulado em vista frontal. Estômatos anomocíticos ocorrem exclusivamente na superfície abaxial. Tricomas tectores simples, uni ou pluricelulares e unisseriados, longos e eretos estão presentes. O mesófilo é dorsiventral. A nervura principal é biconvexa e percorrida por um feixe vascular colateral, em arranjo cêntrico e envolto por bainha esclerenquimática completa. Células secretoras ovaladas e drusas de oxalato de cálcio distribuem-se na folha. Na casca do caule, podem ser distinguidos a periderme, consistindo de súber, felogênio e várias camadas de feloderme, o córtex multiestratificado contendo drusas, e o floema. Este compreende elementos crivados, células pétreas, fibras e células obliteradas, em meio a numerosas células parenquimáticas. As fibras agrupam-se em pequenas faixas e contêm vários prismas de oxalato de cálcio. Os autores concluem que estes dados estruturais de *T. catigua* são compatíveis com a família Meliaceae e contribuem para o conhecimento dessa espécie, pouco investigada sob o ponto de vista morfológico.

Já as plântulas e tirodendros de *T. catigua*, *T. elegans* e *T. pallida* foram estudadas morfológica e anatomicamente por Mourão e colaboradores (2002), visando compreender o ciclo de vida e processos de germinação e crescimento das espécies. As plântulas foram obtidas de sementes coletadas no Horto Florestal de Maringá, Estado do Paraná, Brasil. As plântulas de *T. catigua* e *T. elegans* são fanerocotiledonares e as de *T. pallida* são eriptocotiledonares e fanerocotiledonares. Os cotilédones são espessos, com epiderme glabra em *T. catigua* e *T. elegans* e pilosa em *T. pallida*: o mesófilo é parenquimático. A raiz é axial e tetraarca.

Beltrame (2005) procedeu a análise microscópica, avaliando as características anatômicas de amostras comerciais adquiridas como catuaba. Usou como material vegetal padrão cascas e pó de *T. catigua* e rizomas de *Anemopaegma arvense*. Das sete amostras analisadas, seis amostras foram compatíveis com as características anatômicas do padrão

de *T. catigua*, e uma amostra analisada não conferiu com nenhuma das duas e ainda apresentou impurezas (presença de areia).

6. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA *Trichilia catigua*

Marques (1998) realizou uma triagem fitoquímica a partir do extrato bruto de *T. catigua* e observou a presença de esteroides, taninos condensados e hidrolisáveis e saponinas. A semi-quantificação do grupo de saponinas demonstrou índice de espuma de 250. Mais tarde, Lagos (2006) determinou o perfil fitoquímico preliminar de cascas e folhas de *T. catigua*. O extrato aquoso das folhas apresentou reação positiva para heterosídeos antociânicos e taninos, tanto hidrolisáveis como condensados; para o extrato aquoso das cascas os mesmos grupos químicos foram identificados, além do grupo das saponinas. Já o resultado do perfil fitoquímico do extrato hidroalcoólico das cascas e folhas foi igual sendo observada a presença de flavonoides e esteroides demonstrando a similaridade da composição das duas partes da planta nesse extrato.

O extrato e frações semipurificadas de *T. catigua* é composto de taninos (BURKILL, 1997; BRAZ et al., 2012), ciclolignanas, alcaloides, sesquiterpenos e flavonoides (BELTRAME, 2005; BRAZ et al., 2012). Estudos químicos indicaram ainda a presença de ômega-fenil alcanos, ácidos ômega-fenil alcanóicos, ômega-fenil-gama-lactonas, alquil- γ -lactonas, alcenil- γ -lactonas e ácidos graxos variando a cadeia de C14 a C26, além de β -sitosterol, estigmasterol, campesterol (PIZZOLATTI et al., 2004) e uma mistura de flavalignanas isoladas das cascas (PIZZOLATTI et al., 2002a).

Estudos demonstraram que substâncias contidas no extrato bruto de cascas de *T. catigua*, assim, como de suas frações contêm taninos condensados, como catequina (**3**), epicatequina, procianidinas (BELTRAME, 2005), catiguanina A e B (TANG, 2007), e também as flavalignanas: cinchonaína Ia (PIZZOLATTI et al., 2002a) e Ib (BELTRAME et al., 2006), IIa, IIb e apocinina E (RESENDE et al., 2007). Ressalta-se que Resende e colaboradores isolaram as substâncias cinchonaínas IIa e IIb e apocinina E pela primeira vez no gênero *Trichilia* (RESENDE et al., 2007; RESENDE et al., 2011).

Algumas substâncias químicas já foram isoladas e elucidadas da espécie de *T. catigua* (Figura 3). Entre eles podem ser citadas: epicatequina (**1**), procianidinas B₂ [epicatequina-(4 β →8)-epicatequina] (**2**), B₄ [catequina-(4 α →8)-epicatequina] (**3**) e C₁ [epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina] (**4**), cinchonaínas IIa (**5**) e IIb (**6**), (LAGOS, 2006; RESENDE, 2007; RESENDE et al., 2011), cinchonaínas Ia (**7**), Ib (**8**), Ic (**9**) e Id (**10**) (PIZZOLATTI et al., 2002; BELTRAME, 2005; TANG et al., 2007; MARTINELLI, 2010); catiguanina A (**11**) e B (**12**) (TANG et al., 2007), cumarinas e triterpenos (BELTRAME, 2005), ácido clorogênico (**13**), catequina (**14**), esteroides beta sitosterol (**15**) e estigmasterol (**16**) (LAGOS, 2006).

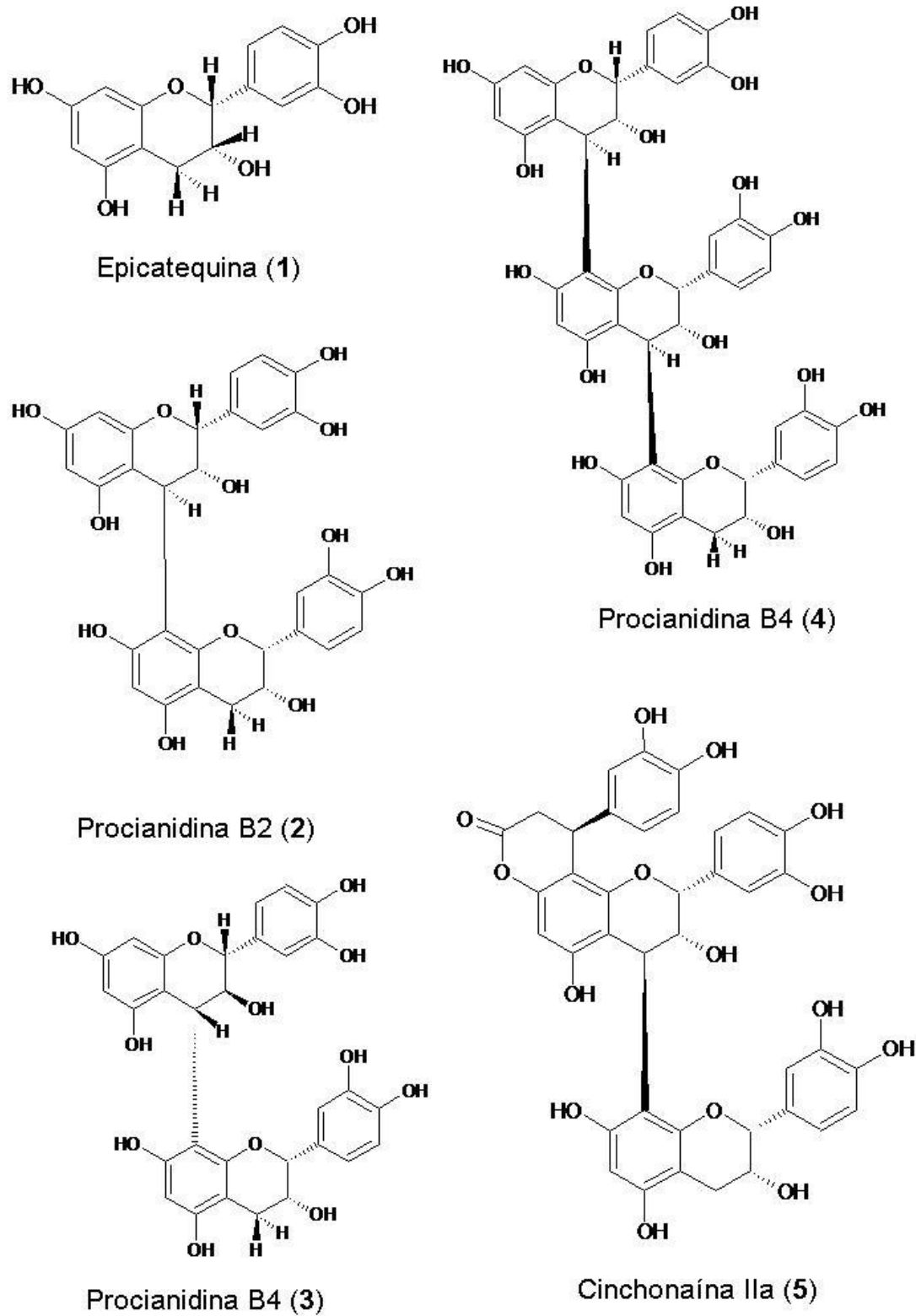


Figura 3. Substâncias isoladas de extratos de *T. catigua*.

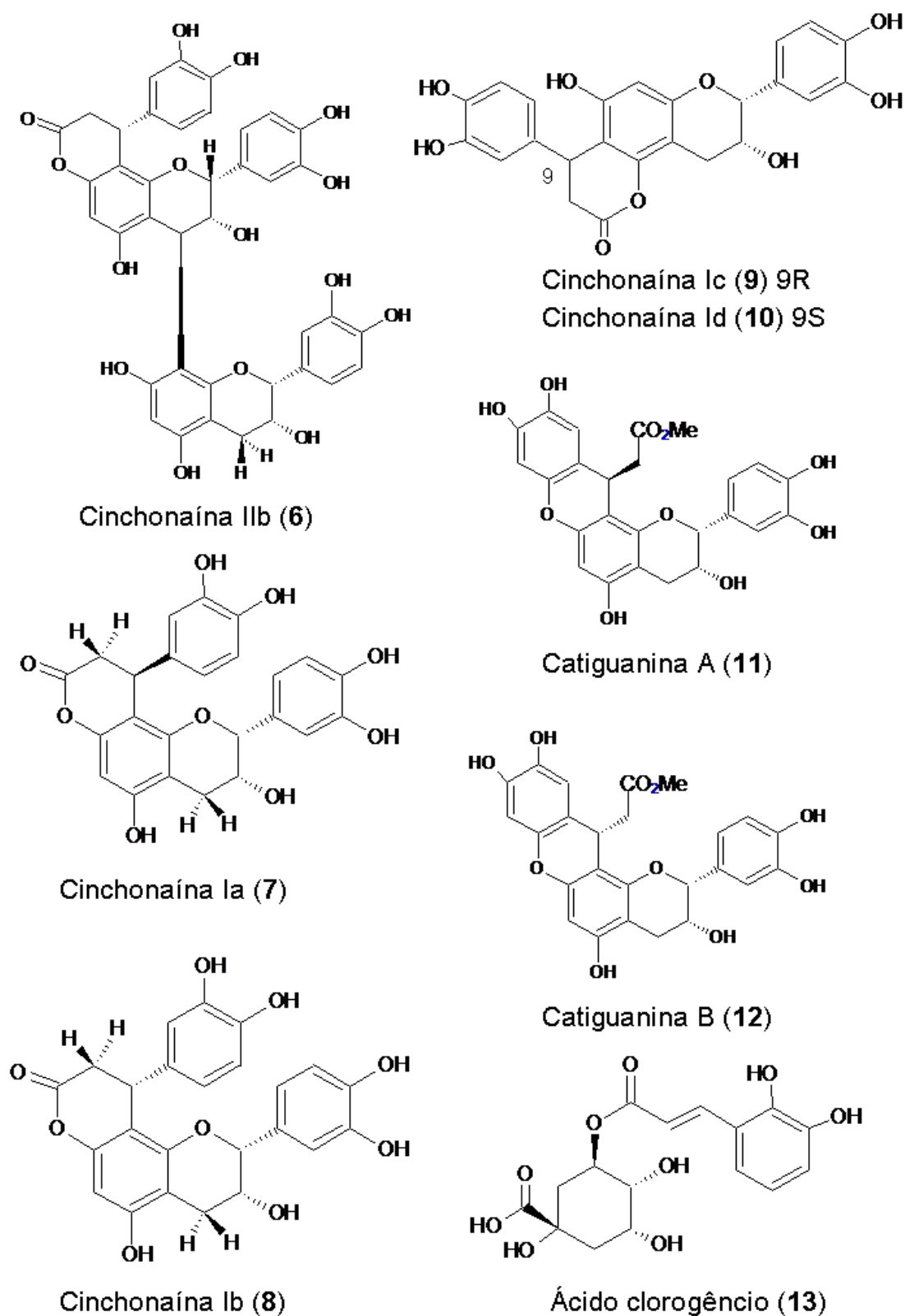


Figura 3. Substâncias isoladas de extratos de *T. catigua* (continuação).

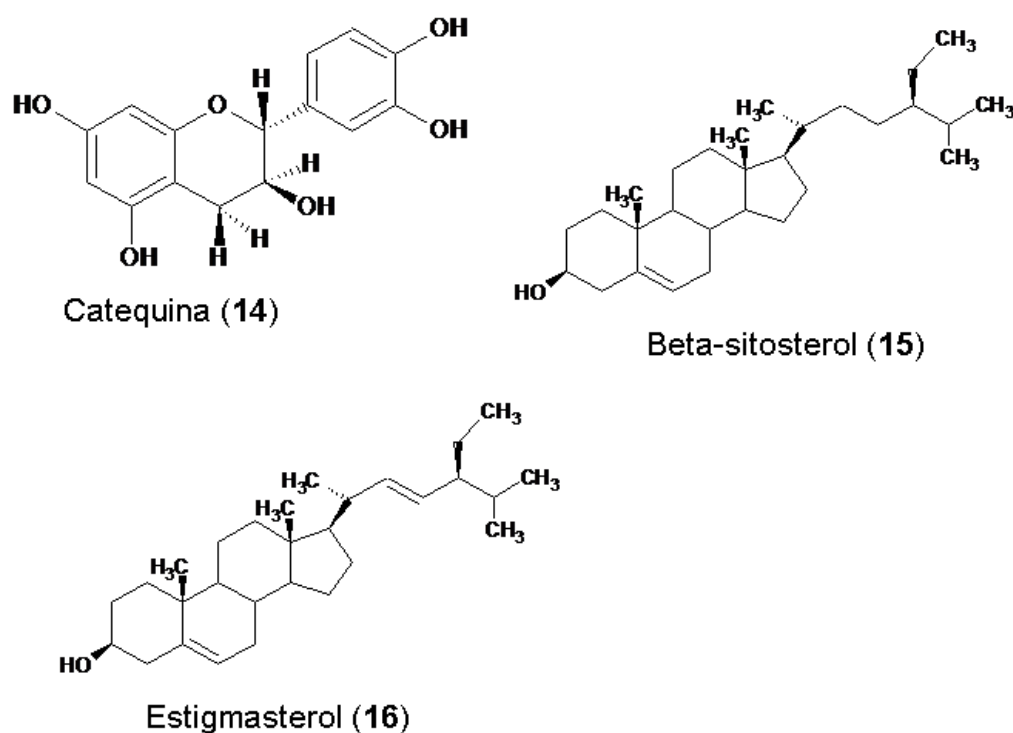


Figura 3. Substâncias isoladas de extratos de *T. catigua* (continuação).

Matos e colaboradores (2009) isolaram os limonoides cedrelona, angolensato de metila e uma mistura epimérica de fotogedunina de extrato metanólico do arilo dos frutos de *T. catigua*.

A presença de cinchonaínas, derivados de ácido gálico, polifenóis, flavonoides, catequinas e epicatequinas em extratos obtidos das cascas de *T. catigua* com uma mistura de água-metanol-acetona-etanol (1:1:1:1) foram analisados por componentes principais e análises de agrupamento hierárquico dos picos cromatográficos obtidos dos espectros de HPLC-DAD (LONNI et al., 2012).

Antimicrobiano

Os extratos hidroalcoólicos e frações acetato de etila obtidos das cascas de *T. catigua* demonstraram atividade inibitória do crescimento bacteriano. A fração acetato de etila apresentou melhor atividade inibitória do crescimento bacteriano, com inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas como *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, e Gram-negativas como as espécies de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Desta fração foram isoladas duas flavolignanas, identificadas como cinchonaína Ia e Ib, que também apresentaram atividade antibacteriana. Estes compostos foram mais ativos contra bactérias Gram-positivas do que contra Gram-negativas, mostrando um efeito bactericida,

com concentrações inibitória mínima e bactericida mínima variando de 0,31 a 0,62 e de 0,31 a 1,25 mg/mL, respectivamente (PIZZOLATTI et al., 2002a).

A atividade antiviral também demonstrou ser promissora. Faccin-Galhardi e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antiviral contra poliovírus tipo 1 em células HEp-2. Foram testados o extrato bruto, fração aquosa e fração acetato de etila. As amostras não foram tóxicas nas concentrações testadas (12,5 a 100 µg/mL) e mostraram atividade virucida, reduzindo em 100% a infecção. Estes resultados sugerem que o extrato e as frações derivadas de *T. catigua* interferiram na fase inicial da replicação do vírus da poliomielite.

Em 2010, o mesmo grupo avaliou os efeitos do extrato bruto, da fração aquosa e fração acetato de etila obtidos a partir de casca de *T. catigua* na replicação do herpesvírus bovino. As concentrações testadas variaram de 12,5 a 100 µg/mL, onde as amostras foram adicionadas 1 e 2 horas antes, durante (tempo zero – 0h) e 1 e 2 h após a infecção viral. Observaram citotoxicidade em células Hep-2 em concentrações maiores que 400 µg/mL para todas as amostras. No tempo zero e no teste virucida do extrato bruto a inibição foi de 100% em todas as concentrações. A inibição do vírus foi total nas concentrações de 50 e 100 µg/mL de fração aquosa e acetato de etila, ambas no tempo zero. Os resultados sugerem que os extratos e frações de *T. catigua* atuam nas fases iniciais da replicação do herpesvírus bovino e também diretamente sobre a partícula viral.

Tripanocida

O estudo de Pizzolatti e colaboradores (2002b) avaliou a atividade tripanocida de alguns extratos e frações de 13 espécies de plantas brasileiras, dentre elas a *T. catigua*. Os extratos foram testados *in vitro* contra culturas de epimastigotas de *T. cruzi*. No caso da *T. catigua* o extrato que apresentou atividade foi o hidroalcoólico das cascas, bem como as frações hexano, diclorometano e acetato de etila, sendo a DL₅₀ de 10 µg/mL. A fração diclorometano ainda apresentou atividade contra a forma tripomastigota presente no sangue, representando 74% de redução, em uma concentração de 500 µg/mL.

Antioxidante

Evidências sugerem que doenças causadas pelas reações oxidativas em sistemas biológicos podem ser retardadas pela ingestão de antioxidantes naturais encontrados na dieta, principalmente de compostos fenólicos, os quais englobam flavonoides e taninos (DATNER, 1999; MELLO et. al., 2010). Isto motiva a pesquisa por substâncias antioxidantes. Alguns trabalhos a seguir listam estudos envolvendo a *T. catigua*.

Tang e colaboradores (2007) observaram atividade antioxidante em extrato metanólico das cascas e de seis substâncias isoladas de *T. catigua*, catiguanina A e B,

cinchonaínas Ia, Ib, Ic e Id. O extrato metanólico apresentou 48% de inibição em concentração de 10 µg/mL através do teste de radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), as substâncias isoladas que apresentaram maior atividade sequestradora de radical DPPH foram as cinchonaínas Ic e Id com valores de IC₅₀ de 2,5 e 2,3 µM, respectivamente.

Resende (2007) avaliou a capacidade antioxidante do extrato bruto, fração aquosa e fração acetato de etila das cascas de *T. catigua*. Todos os extratos apresentaram uma elevada capacidade antioxidante, sendo que a fração acetato de etila apresentou capacidade superior à vitamina C e ao Trolox (substâncias de reconhecida ação antioxidante) frente ao radical livre DPPH e à capacidade total de redução do Fe³⁺ a Fe²⁺. A autora observou que quanto maior o teor de polifenóis totais e taninos totais presentes no extrato, maior é a sua capacidade antioxidante, isto explicaria a maior capacidade antioxidante da fração acetato de etila, já que seria uma extração direcionada a este grupo de substâncias, especialmente taninos.

Outros grupos também avaliaram a atividade antioxidante por meio da radical livre DPPH. Brighente e colaboradores (2007) pesquisaram oito extratos e frações diferentes, dentre eles o extrato hidroalcoólico das cascas de *T. catigua* e, verificaram que a atividade contra radical DPPH foi significativa, apresentando IC₅₀ de 2,1 µg/mL, quando comparado aos valores obtidos para ácido ascórbico (IC₅₀=8,4 µg/mL) e ácido gálico (IC₅₀=2,6 µg/mL). Albrecht e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antioxidante do extrato bruto, fase aquosa e fase acetato de etila obtidos das cascas de *T. catigua*, demonstrando um valor de IC₅₀ das amostras de: 5,48, 8,67 e 3,79 µg/mL, respectivamente. Com base nos resultados, os autores concluíram que a fase acetato de etila foi a que apresentou melhor capacidade doadora de átomos de hidrogênio, reduzindo assim o radical livre DPPH.

De Bruyne e colaboradores (1999) demonstraram as propriedades antioxidantes de taninos condensados, frente ao radical DPPH, ânion superóxido e o radical hidroxil. A cinchonaína Ib, obtida da fração acetato de etila das cascas de *T. catigua*, foi a que apresentou melhor atividade antioxidante no método de DPPH.

Já Resende (2007) isolou nove substâncias da fração acetato de etila das cascas de *T. catigua* das quais testou a atividade antioxidante de sete delas pelo método DPPH. As substâncias testadas foram epicatequina, procianidina B2, cinchonaínas Ia, Ib, IIa e IIb e procianidina C1, todas apresentaram capacidade antioxidante superior à vitamina C e ao Trolox. A que apresentou melhor atividade antioxidante foi a procianidina C1 (IC₅₀ 4,08 ± 0,01 µM), para as outras substâncias o valor de IC₅₀ variaram entre 5 e 10 µM, enquanto o Trolox e vitamina C apresentaram IC₅₀ em torno de 30 µM. A autora observou também que a atividade de sequestro de radicais livres de compostos fenólicos é amplamente influenciada pelo número de hidroxilas presentes nos anéis aromáticos, quanto maior o número de

grupos hidroxila, maior é a atividade de sequestro de radicais. A procianidina C1 tem 12 hidroxilas, enquanto nas demais o número varia de 4 a 9 hidroxilas.

Albrecht e colaboradores (2007) também avaliaram a atividade antioxidante pelo radical DPPH de substâncias isoladas das cascas de *T. catigua*, são elas: cinchonaínas Ia e Ib, com IC₅₀ de 7,87 e 7,64 µg/mL, respectivamente.

Mais recentemente, Chassot e colaboradores (2011) demonstraram uma atividade antioxidante com diferença significativa entre a fração semipurificada acetato de etila comparada com o extrato bruto e as substâncias de referência Trolox, derivado do ácido ascórbico, e vitamina C.

Anticelulite

A associação do extrato bruto de *T. catigua*, *Ptychopetalum olacoides* e *Pfaffia* sp, vem sendo empregada em formulações tópicas para o tratamento e a prevenção da lipodistrofia ginoide (celulite). Esta matéria-prima é comercializada, sob a apresentação de Slimbuster H® (Chemyunion, Brasil), a qual consiste de um extrato padronizado com conteúdo de 1,02% (p/p) em flavonoides totais, expressos em rutina. A concentração utilizada em formas farmacêuticas semi-sólidas é de 5,0%. O efeito lipolítico se deve à padronização de flavonoides totais e saponinas contidos no extrato (BABY et al., 2006, 2007), no entanto, a eficácia do uso tópico não foi comprovada, até o momento, na literatura científica.

Afrodisíaco

A *T. catigua* é uma das plantas conhecidas como afrodisíacas no Brasil, para tratamento de impotência sexual, estresse, fadiga e déficits de memória (PIZZOLATTI et al., 2002a).

Catuama® é um produto comercializado pelo Laboratório Catarinense. Atualmente, sua composição consiste de uma mistura dos extratos de *Trichilia catigua*, *Paullinia cupana* e *Croton heliotropiifolius*, sob as formas farmacêuticas de solução oral e cápsulas. Porém, sua formulação anterior tinha por base extratos hidroalcoólicos de *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Zingiber officinale* e *Ptychopetalum olacoides*. Este tônico está no mercado a mais de 20 anos e é indicado para algumas desordens, como fadiga mental e física, estresse e astenia muscular.

Antunes et al. (2001) e Gomes (2007) avaliaram os efeitos da Catuama® considerando sua antiga fórmula.

Foi pesquisado o efeito da Catuama® sobre a relaxação dos corpos cavernosos de coelhos, bem como o efeito dos extratos hidroalcoólicos isolados de cada uma das espécies

presentes no medicamento. O efeito da Catuama® e de cada extrato produziu um relaxamento dose-dependente em corpos cavernosos isolados e a mesma foi de curta duração. Já os extratos das cascas de *T. catigua* produziram uma relaxação prolongada e sustentada. A relaxação de corpos cavernosos é o passo chave na ereção peniana (ANTUNES et al., 2001).

Gomes (2007) avaliou os efeitos dos extratos de *T. catigua* (infusão aquosa) e da solução de Catuama® sobre a biometria corporal, glândula vesicular, túbulos seminíferos e componentes do espaço intersticial testicular de ratos Wistar adultos. A infusão aquosa foi administrada na dose de 36 e 72 mg/animal/dia e a solução de Catuama® na dose de 0,7 mL/kg/animal/dia, tratados por 56 dias. Em todos os tratamentos observou-se a manutenção das massas corporais, testiculares e de glândulas vesiculares, sendo que o índice gonadosomático apresentou aumento significativo em animais tratados com a solução de Catuama®, em relação ao grupo tratado com a maior concentração de catuaba. Quando considerado o parênquima testicular, não foram observadas variações significativas com relação ao diâmetro, volume e comprimento de túbulos seminíferos, assim como da altura do epitélio seminífero. Os extratos e a solução administrados promovem diminuição significativa da proporção das células de Leydig (responsáveis pela produção de testosterona) e macrófagos em todos os animais tratados. Os volumes nuclear, citoplasmático e de cada célula de Leydig sofreram reduções importantes nos grupos tratados, bem como o volume total ocupado por estas células por grama e peso total testicular. Estes resultados mostraram que as infusões ministradas durante o experimento causaram efeito deletério sobre a população e o volume de células de Leydig nos testículos dos animais tratados.

Antiarrítmico

Em outros estudos com Catuama®, Pontieri e colaboradores (2007) observaram que este medicamento foi capaz de reverter a fibrilação ventricular, evitando a reindução e prolongando a condução intraventricular, em corações isolados de coelhos, constituindo um efeito antiarrítmico. Este mesmo efeito foi observado para extratos de *T. catigua*. Os pesquisadores apontaram o extrato de *T. catigua* como o principal responsável desta ação atribuída ao Catuama®.

Antidepressivo

Outra atividade promissora e de investigação é o efeito antidepressivo atribuído à catuaba.

Campos e colaboradores em 2004 investigaram o efeito antidepressivo da Catuama®. Os autores mostraram evidências farmacológicas e neuroquímicas para ação

antidepressiva deste produto. Demonstraram que o tratamento oral crônico e agudo resultou em uma significativa redução do tempo de imobilidade em dois modelos de depressão em ratos, nado forçado e suspensão da cauda, quando utilizaram a dose de 200 mg/kg por via oral.

Os experimentos *in vivo* indicaram que o tratamento com o extrato hidroalcoólico das cascas de *T. catigua* produziu significativa redução do tempo de imobilidade em modelo clássico de nado forçado em ratos e camundongos, apontando potencial efeito antidepressivo. Estes estudos fornecem evidências de que o efeito antidepressivo é modulado por dopamina. As concentrações que demonstraram atividade foram nas doses de 200 e 400 mg/kg, administradas por via oral, seis horas antes do teste (CAMPOS et al., 2005).

Mais recentemente, Chassot e colaboradores (2011) avaliaram o possível efeito antidepressivo, ansiolítico, motor e cognitivo de extrato bruto e de uma fração acetato de etila (FAE) das cascas de *T. catigua*, nas doses de 200 a 400 e 100 a 400 mg/kg, respectivamente. Os autores concluíram que a administração única de diferentes doses, não mudou o comportamento dos animais submetidos ao labirinto em cruz elevado ou sua atividade motora em teste de campo aberto. O efeito antidepressivo foi detectado na dose de 400 mg/kg de FAE, após administração aguda. Tanto o extrato como a fração melhoraram a memória em camundongos.

O mesmo grupo em 2012 avaliou se a administração subcrônica de FAE mantinha o efeito antidepressivo e se este efeito estava relacionado a neurogênese. Foram administradas doses orais de 200 e 400 mg/kg durante 14 dias. Confirmou-se que a dose de 400 mg/kg de FAE promoveu efeito antidepressivo e este efeito foi acompanhado por um aumento da proliferação celular no giro dentado do hipocampo 24 h após os tratamentos serem interrompidos. Porém, este efeito proliferativo não influenciou a sobrevivência da célula ou neurogênese (BONASSOLI et al., 2012).

Antiinflamatório e efeito antinociceptivo

Calixto e Cabrini (1997) demonstraram que o produto Catuama® produziu uma resposta de vasorrelaxação, dependente da concentração, significativa em vasos isolados de diferentes espécies animais (ratos, cobaias e coelhos) e mostraram que estes efeitos são, em grande parte, dependentes da liberação de óxido nítrico e substâncias derivadas de óxido nítrico. As concentrações de estudo variaram de 1 a 3000 µg/mL. Também demonstraram que ação vasorrelaxante do produto parece ser devida à ação dos princípios ativos presente principalmente em *P. cupana*, *T. catigua* e em menor extensão em *Z. officinalis*.

O efeito antinociceptivo foi primeiramente estudado no produto Catuama® e nos extratos hidroalcoólicos que compõem esta preparação. A investigação foi realizada em modelos químicos e térmicos de nocicepção em camundongos machos Swiss (VAZ et al., 1997). Os autores também avaliaram a toxicidade aguda (200 a 5000 mg/kg, v.o.) e subcrônica (500 a 1000 mg/kg, v.o., durante 15 dias consecutivos) em camundongos Swiss, machos e fêmeas, e não foi observado nenhum sinal de toxicidade. O produto Catuama® (200 mg/kg, v.o.) produziu antinocicepção tempo-dependente e de longa duração contra contração induzida por ácido acético, formalina, lambidas induzidas por capsaicina e também nos ensaios de cauda ereta e chapa quente. De um modo geral, para todos os testes o efeito analgésico máximo foi atingido após seis horas da administração oral. Os extratos hidroalcoólicos presentes na Catuama® inibiram a dor induzida por ácido acético (*Trichilia catigua* 82%±2%; *Paullinia cupana* 66%±2%, *Ptychopelatum olacoides* 42%±2%, *Zingiber officinale* 30%±4%). No teste de formalina os extratos hidroalcoólicos de *T. catigua*, *P. cupana*, *P. olacoides*, e em menor extensão de *Z. officinale* (200 mg/kg, v.o., 6 h antes) também inibiram ambas as fases da dor induzida por formalina. Com base nos resultados, os autores concluíram que a ação antinociceptiva causada pelo Catuama® parece envolver uma interação sinérgica dos princípios ativos presente em todas as plantas que o compõe, e o mecanismo parece estar envolvido, pelo menos em parte, com o sistema opioide.

A mobilização do ácido araquidônico (AA) pela enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) e da síntese das prostaglandinas subsequentes são considerados evento primordial no processo inflamatório. Desta forma, drogas que inibem a PLA₂, bloqueando assim as vias metabólicas das enzimas ciclooxygenases na cascata do AA, podem ser efetivas no tratamento dos processos inflamatórios. Neste sentido, novas estratégias para o tratamento de processos inflamatórios podem ser atingidas na pesquisa de substâncias ativos de origem vegetal que controlem a produção dos mediadores lipídicos pela inibição da PLA₂. Uma vasta investigação exploratória dos efeitos da *T. catigua* demonstrou que a atividade da PLA₂ foi totalmente inibida pelo extrato hidroetanólico das cascas desta planta na concentração de 120 µg/mL, em ensaios radioenzimáticos *in vitro* com plaquetas humanas, sugerindo que esta planta possa produzir substâncias com atividade antiinflamatória (BARBOSA et al., 2004).

O efeito antinociceptivo do Catuama® em modelos de dor inflamatória e neuropática em ratos foi alvo do estudo de Quintão e colaboradores (2008), visando estimar alguns dos mecanismos de ação envolvidos. Catuama® foi administrado oralmente, tanto no tratamento agudo como crônico, consistentemente inibiu alodinia mecânica induzida pela injeção intraplantar do adjuvante completo de Freund (CFA). O mesmo tratamento com Catuama® não afetou significativamente a hiperalgesia térmica causada por CFA. Estes dados sugerem que o produto reduz a mecânica de nocicepção sem interferir com a sensibilização

térmica. Além disto, o produto não modificou significativamente a alodinia mecânica ou hiperaralgesia observada após a ligação parcial do nervo ciático ou polineuropatia diabética, respectivamente. Em outra série de experimentos, Catuama® causou notável redução da alodinia mecânica induzida pela *Escherichia coli*. Tratamento oral com Catuama® não foi, contudo, efetivo em alterar a produção de mediadores pró-inflamatório IL-1 β , TNF α , PGE₂ ou LTB₄ após administração intraplantar de salina contendo *E. coli* em patas de rato. O efeito antinociceptivo de Catuama® em modelos de *E. coli* foi revertido significativamente pelo haloperidol, antagonista não seletivo de dopamina, mas não pela serotonina ou ioimbina, receptor antagonista adrenérgico. Os resultados dos autores indicam que o Catuama® diminui a resposta nociceptiva inflamatória, mas não a neuropática em ratos, pelo mecanismo envolvendo uma interferência com as vias dopaminérgicas. Assim, produto pode representar uma ferramenta terapêutica com potencial para o tratamento da dor inflamatória persistente.

Viana e colaboradores (2009) avaliaram o efeito do extrato hidroalcoólico das cascas de *T. catigua* no modelo comportamental de nocicepção em camundongos Swiss machos e avaliaram os possíveis mecanismos envolvidos nesta ação. Os animais foram submetidos ao teste de placa quente, contração abdominal e teste de von Frey, após tratamento oral com o extrato na dose de 200 mg/kg. O extrato exibiu efeito antinociceptivo nos três modelos. Para o teste de placa quente, o extrato demonstrou ação antinociceptiva três horas após administração oral. Os autores atribuíram ao sistema dopaminérgico a possível ação do extrato, o qual foi sustentado pelos dados de potencialização de hipotermia induzida pela apomorfina e pela prevenção da catalepsia induzida por haloperidol.

Outras atividades

Utilizada também como fitofármaco, na forma de infuso ou decocto, para tratamento de insônia, exaustão, estresse, déficits de memória e como estimulante do sistema nervoso (PIZZOLATTI et al., 2002a; CAMPOS, 2005), além de apresentar atividade como relaxante muscular (ANTUNES, 2001).

Outro efeito interessante é o efeito adaptógeno. Galvão e colaboradores (1996) obtiveram dados farmacológicos preliminares das drogas *Trichilia catigua* (catuaba – casca do caule), *Pfaffia paniculata* e *P. iresinoides* (ginsengs brasileiros – raízes), *Ptychopelatum uncinatum* (muirapuama-do-nordeste – casca do caule) e *Vernonia cognata* (nó-de-cachorro – rizoma). Para isto, utilizaram camundongos Swiss machos, os quais foram tratados agudamente por via intraperitoneal com extratos hidroalcoólicos (50%) liofilizados, nas doses de 1 a 100 mg/kg e submetidos à triagem farmacológica e avaliação da coordenação motora e tempo de sono induzido por pentobarbital. A catuaba apresentou alteração da atividade motora e comportamento estereotipado. No teste de tempo de sono, os extratos

não alteraram o parâmetro de forma significativa, bem como não interferiram na coordenação motora dos animais. Na triagem farmacológica, o extrato de catuaba produziu efeito estimulante dependendo da dose.

Em estudos simultâneos, o mesmo grupo avaliou o efeito das mesmas drogas sobre a atividade motora e a reversão do efeito amnésico induzido pela escopolamina no modelo de esquiva passiva em camundongos *Swiss* machos, tratados agudamente por via intraperitoneal. A atividade motora foi avaliada em caixas dotadas de sensores fotoelétricos, sendo que das drogas testadas apenas a catuaba promoveu aumento significativo na movimentação dos animais na dose de 10 mg/kg. A esquiva passiva foi realizada em câmaras claro/escuro, submetendo os animais à aquisição da tarefa após administração de escopolamina (2 mg/kg) e/ou dos liofilizados e após 24 h, realizou-se o teste de retenção. A catuaba, assim como *P. paniculada* e nó-de-cachorro não interferiram nos parâmetros analisados, os outros prejudicaram o aprendizado e a memória dos animais (DIAS et al., 1996).

Em revisão da literatura, Mendes e Carlini (2007) apontaram a *T. catigua* como um dos participanetes de efeito adaptógeno, que compreende efeitos antiestresse, melhoramento da memória, aumento do desempenho físico e sexual, estando ao lado de outras plantas como: *Heteropterys aphrodisiaca* (Malpighiaceae), *Paullinia cupana* (Sapindaceae), *Ptychopetalum olacoides* (Olacaceae) e *Turnera diffusa* (Turneraceae). As espécies *Pfaffia glomerata* e *P. paniculata* (Amaranthaceae) juntamente com a *T. catigua* foram objetos de estudos farmacológicos a fim de confirmar esta possível atividade.

Com bases em seus resultados de atividade antioxidante contra o radical DPPH, Tang e colaboradores (2007) acreditaram em um importante potencial da *T. catigua* para tratamento de doenças neurodegenerativas. Assim, examinaram a atividade neurotrópica de dois compostos isolados da fração acetato de etila, a catiguanina A e a cinchonaína Ia. Para isto utilizaram as células PC12, contudo, ambos compostos não apresentaram efeito frente a estas células e nem em células PC12 mediado por fator de crescimento neural, nas concentrações de 1 a 100 µmol/L.

Bogorni e Vendramin (2005) buscaram alternativas para o manejo de pragas sobre as folhas do milho e encontraram nos extratos aquosos de ramos e folhas da *T. catigua* uma potencial atividade inseticida contra lagartas e pupas de *Spodoptera frugiperda*, assim como também em outras espécies de *Trichilia*. Observaram que o extrato das folhas de *T. catigua* a 1% (p/V) afetou o desenvolvimento do inseto.

Matos e colaboradores (2006) também avaliaram a atividade biológica de extratos orgânicos de folhas e ramos de três espécies de *Trichilia* (*T. catigua*, *T. clausenii* e *T. elegans*) sobre *S. frugiperda*. As folhas e ramos foram secos e moídos separadamente. Os solventes utilizados para a obtenção dos extratos foram hexano, metanol e metanol/água na

proporção de 1:1. Os extratos foram incorporados à dieta artificial na proporção de 100 mg de extrato para 100 g de dieta e oferecidos a *S. frugiperda* durante seu período larval. Os extratos hexânico e metanólico de folhas e o hexânico de ramos de *T. clausenii* foram os mais eficientes apresentando alta taxa de mortalidade larval (superior a 60%). Todos os extratos afetaram o desenvolvimento do inseto, retardando o desenvolvimento larval em 2,0; 1,3 e 3,2 dias, respectivamente, porém, não afetaram o período pupal.

Mais recentemente, o mesmo grupo avaliou a atividade biológica de extratos orgânicos de frutos de *T. elegans* e *T. catigua* sobre a *Spodoptera frugiperda*. Os extratos hexânico, metanólico e hidrometanólico das sementes de *T. catigua* provocaram mortalidades larvais moderadas (aproximadamente 50%). A mais alta taxa de mortalidade larval (100%) foi obtida com os extratos hexânico e metanólico de frutos de *T. elegans* (MATOS et al., 2009).

7. TOXICOLOGIA

Os estudos de toxicologia referentes à *T. catigua* estão pouco explorados, ficando um amplo campo em aberto, nosso grupo tem desenvolvido estudos de toxicidade, mas os dados ainda não foram publicados. Parte dos resultados pode ser observada em Lonni (2012), onde a segurança de uma formulação emulsão múltipla A/O/A contendo extrato de *T. catigua* para uso cosmético foi avaliada pela análise de toxicidade, comedogenicidade e histopatologia em coelhos (Nova Zelândia). A determinação da permeação *ex vivo* da formulação foi realizada por meio da técnica de espectroscopia fotoacústica. Após 14 dias de tratamento, os resultados histológico, bioquímico e hematológico mostraram que as formulações são seguras e não houve nenhuma reação no tecido, o que demonstra a ausência de toxicidade e as formulações não apresentaram qualquer comedogenicidade. A permeação da formulação realizada pela fotoacústica demonstrou que o extrato encontra-se presente tanto na epiderme como na derme (LONNI, 2012; LONNI et al., 2012b).

Galvão e colaboradores (1996) administraram doses de 1000 mg/kg em camundongos e o extrato hidroalcoólico de *T. catigua* causou morte em quatro horas após administração.

Encontrou-se estudo de toxicologia clínica, mas o objeto de estudo foi a preparação comercial Catuama®. Os autores investigaram a administração crônica de 25 mL de Catuama® duas vezes ao dia, durante 28 dias para avaliar qualquer manifestação de efeitos tóxicos em voluntários humanos saudáveis de ambos os sexos. Nenhuma reação adversa severa ou mudanças hematológicas e bioquímicas foi registrada (OLIVEIRA et al., 2005).

O comportamento de camundongos tratados com extrato bruto e fração acetato de etila das cascas de *T. catigua* pareceu normal. Não houve evidência de efeito tóxico nas doses de até 5000 mg/kg e até 3000 mg/kg de extrato bruto e fração acetato de etila,

respectivamente. Não observaram morte em qualquer grupo estudado, não sendo possível estabelecer a DL_{50} (CHASSOT et al., 2011).

Dos Santos et al. (2011) investigaram se a exposição materna ao extrato bruto de *T. catigua* poderia interferir com os parâmetros reprodutivos da prole masculina. Ratas Wistar receberam 400 mg/kg de extrato bruto no primeiro dia de gestação até dia pós-natal (21). No 90º dia pós-natal observaram em filhotes machos a preferência e o comportamento sexual, contagem de espermatozóides no testículo e epidídimo. Os resultados não mostraram diferença significativa quando comparados ao controle. Assim, a exposição materna não interfere nos parâmetros reprodutivos da prole masculina. Os resultados encontrados sugerem que a utilização do extrato bruto de *T. catigua* durante a gravidez e lactação poderia ser um tratamento alternativo da depressão, mas são necessários mais estudos.

O efeito da exposição maternal ao extrato bruto de *T. catigua* sobre a produção de anticorpos (IgM, IgG2a e IgG1) na prole de ratos foi avaliada por Silva et al. (2011). Os autores administraram 400 mg/kg de extrato bruto do primeiro dia de gestação até o 21º dia após o nascimento dos filhotes. Os resultados indicam que a exposição materna ao extrato bruto não influencia a produção de anticorpos na prole.

A citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio, nitroprussiato de sódio e ácido nitropropiónico foi avaliada para extrato hidroalcolico das cascas de *T. catigua*. Observou-se efeito neuroprotetor, onde o extrato apresentou capacidade de prevenir o estresse oxidativo por atenuação da morte celular e da produção de espécies reativas de oxigênio. Os estudos preliminares sugerem que a proteção oferecida pela catuaba pode estar relacionada com sua capacidade antioxidante (KANDEM et al., 2012).

8. MÉTODOS ANALÍTICOS E FORMAS FARMACÊUTICAS

A análise farmacognóstica auxilia no controle de qualidade, pois caracteriza as condições da droga vegetal, enquanto matéria-prima bruta para os demais processamentos.

Resende (2007) avaliou a qualidade da droga vegetal através da determinação da umidade, distribuição granulométrica, teor de extrativos, teor de polifenóis totais e taninos totais. Assim como Sereia e colaboradores (2012b), que também avaliaram cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido. Há certa semelhança entre os resultados, diferindo apenas no diâmetro médio das partículas e o teor de extrativos. Enquanto que Resende (2007) obteve diâmetro médio de 0,56 mm e teor de extrativos 19,16%, Sereia e col. (2012b) obtiveram 0,149 e 25,99%, respectivamente. Braz e colaboradores (2012) obtiveram teor de extrativos de 24,62%, os autores também avaliaram o teor de umidade e cinzas totais. Provavelmente, o teor de extrativos maior pode ser justificado pelo menor tamanho médio das partículas, proporcionando uma maior extração de substâncias das cascas. Esta hipótese foi constatada por Mello (1989) nos estudos com *Baccharis trimera*, onde a diminuição da faixa

granulométrica foi determinante para o rendimento, confirmando que a eficiência da extração sólido-líquido aumenta com a diminuição do tamanho das partículas, por aumentar sua área específica.

Os extratos das cascas de *T. catigua* são ricos em polifenóis totais e taninos totais. O extrato bruto acetona:água apresenta cerca de 36% e 27%, respectivamente. A preparação de uma fração rica em polifenóis e taninos apresenta 81% e 55% de polifenóis e taninos totais (CHASSOT et al., 2011).

O controle de qualidade de plantas é baseado no marcador químico o que, no geral, não satisfaz a ideia geral da complexidade da composição química que é a droga vegetal (DAOLIO et al., 2008). Técnicas analíticas de controle de qualidade são fundamentais para garantir a qualidade da droga vegetal, produto intermediário e produto acabado.

Considerando as diversas plantas comercializadas como catuaba, Daolio e colaboradores (2008) desenvolveram novo método analítico para determinar a identidade das plantas, fornecendo informações rápidas sobre autenticidade e/ou adulteração. Os autores observaram que o uso da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) seria um caminho possível para determinar ampla variação de metabólitos. Esta técnica foi associada com a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), juntamente com análise multivariada, para classificação de amostras comerciais de catuaba. As amostras comerciais (11) foram adquiridas de algumas farmácias e empresas dos Estados de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul. Os autores demonstraram diferenças entre as amostras comerciais e os padrões (cascas e folhas de *T. catigua* e *A. arvense*). As diferenças foram detectadas na região de deslocamento químico de hidrogênios correspondentes aos carboidratos e aos aromáticos, com açúcares e outros componentes. Eles demonstraram que as análises de RMN de hidrogênio podem ser usadas no futuro como primeiro passo na triagem para determinar e caracterizar diferenças na composição molecular de amostras de plantas.

Para o extrato comercial contendo *T. catigua* e *Ptychopetalum olacoides* foi desenvolvido e validado método analítico por espectrofotometria de ultravioleta. Os autores estabeleceram parâmetros de linearidade, intervalo, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, precisão e exatidão, utilizando a rutina como equivalente. Assim, pelos resultados os autores obtiveram um método validado para a quantificação de flavonoides totais, equivalente em rutina, de extrato comercial contendo *T. catigua* e *P. olacoides* (ROLIM et al., 2005).

Quatorze amostras comerciais de catuaba, cascas das espécies de *Anemopaegma*, *Erythroxylum* e *Trichilia* foram examinadas quanto à identidade e à pureza. Somente minoria das amostras de catuaba analisadas continha extrato bruto pretendido no rótulo, sendo que mais da metade dos produtos foi adulterada com diferentes extratos. A maioria das amostras continha cascas originadas de *T. catigua*. O *fingerprint* por cromatografia em

camada delgada (CCD) confirmou a heterogeneidade. Em 50 % das amostras alcaloides tropânicos em várias concentrações foram detectadas. Métodos de CCD e CLAE para separação e identificação de alcaloides tropânicos foram desenvolvidos. A elucidação estrutural de dois principais alcaloides, catuabina D e seu derivado hidroximetila, estavam presentes. Para avaliar a ação afrodisíaca, o efeito do extrato aquoso ou metanólico do material referência de *T. catigua* e extrato enriquecido de alcaloide tropânicos de duas amostras comerciais de catuaba em corpos cavernosos de coelhos foram investigados, porém nenhum deles demonstrou qualquer efeito no teste *in vitro* (KLETTER et al., 2004).

Beltrame e colaboradores (2006) avaliaram o extrato hidroalcoólico de *T. catigua* por CLAE. A cinchonaína Ib foi isolada e utilizada como padrão externo para o desenvolvimento e validação do método de análise. Como recurso de isolamento da cinchonaína Ib os autores utilizaram cromatografia de contra-corrente.

Já Lagos (2006) conseguiu um perfil cromatográfico de compostos fenólicos dos extratos brutos das cascas e folhas de *T. catigua*. O autor verificou a coincidência de tempos de retenção e dos espectros de UV da catequina, ácido clorogênico e epicatequina, com os padrões injetados anteriormente. Também foi obtido um perfil cromatográfico de esteroides e triterpenos dos extratos brutos das cascas e folhas da espécie, verificando a presença de estigmasterol e beta-sitosterol.

O perfil cromatográfico da fração acetato de etila também foi desenvolvido e validado por nosso grupo de pesquisa, quantificando procianidina B2 e epicatequina (DINIZ et al., 2011; LONGHINI et al., 2013). Foi avaliada a estabilidade da solução de trabalho, e esta foi estável por três dias, após este tempo, a coloração muda de amarelo claro, para alaranjado e novos picos aparecem no cromatograma. Porém, acompanhamento da atividade antioxidante durante 49 dias de um estudo de estabilidade não demonstrou diferença significativa. Sugere-se a formação de novos compostos, os quais podem se tratar de quinonas, também sugeridos por Martinelli (2010). A *T. catigua* contém muitas substâncias com grupos reativos como hidroxilas e carbonilas, dos quais átomos podem fazer ligações de hidrogênio, quebra de ligações ou outras interações. Estes resultados são compatíveis com a alta reatividade dos compostos presentes no extrato e sua fácil e rápida oxidação para originar novos compostos (LONGHINI et al., 2013). Castañeda-Ovando et al. (2009) propuseram um mecanismo de radical livre para a estabilização da semiquinona formada da oxidação da cianidina (antocianidina) e Longhini et al. (2013) consideraram que o mesmo mecanismos poderia ocorrer com as chinchonaínas, devida a semelhança estrutural entre ambas. Eles ainda apontam como outra explicação plausível que a instabilidade dos analitos, incluindo as cinchonaínas Ia e Ib, é devido a presença do grupo 3-hidroxila do anel C. A eliminação do grupo hidroxila como água, originaria uma dupla ligação entre C2-C3,

levando a uma conjugação com o oxigênio na posição 1, resultando em um composto mais estável.

Com relação aos estudos tecnológicos, variações nos solventes de extração foram relatadas.

Para estudar os efeitos de diferentes solventes (água, acetona, metanol e etanol) e suas misturas sobre o rendimento, o conteúdo total de polifenóis e atividade antioxidante das cascas de *T. catigua* Lonni et al. (2012a) utilizaram o delineamento estatístico. Os autores demonstraram pelos resultados experimentais e pelos modelos de superfície de resposta que as misturas quaternárias com proporções iguais de todos os solventes forneciam os rendimentos mais elevados, teor de polifenóis e atividade antioxidante seguidos de misturas ternárias. Este sistema resulta em 18 picos na impressão digital de cromatografia, e uma escolha incorrecta do solvente de extração dificulta a detecção de um número máximo de picos e produz uma impressão digital cromatográfica pobre (LONNI et al., 2011).

Martinelli (2010) também otimizou a preparação de extratos, porém variou a proporção da mistura álcool:água, em diferentes temperaturas, tempo de extração e proporção droga-solvente, a fim de obter maior proporção de cinchonaínas Ia e Ib. Assim, estabeleceu que a melhor condição de extração das cinchonaínas foram a proporção droga:solvente de 10%, solução etanólica 50% e refluxo por uma hora a 60 °C. Também desenvolveu e validou perfil cromatográfico para quantificação de cinchonaína Ia e Ib por CLAE.

Outras técnicas vêm sendo testadas como alternativas para a CLAE, como, por exemplo, a eletroforese capilar. Este método constitui-se de técnica mais econômica, por envolver um menor gasto de solventes e muitas vezes mais rápida, relacionada principalmente com o número de pratos teóricos envolvidos no processo. Sereia e Mello (2012a) aplicaram a técnica de eletroforese capilar de zona, desenvolvendo metodologia para identificação de polifenóis de uma fração semipurificada das cascas de *T. catigua*. Durante o desenvolvimento, avaliaram o comprimento de onda, voltagem, concentração e pH do tampão borato, tipo e concentração de ciclodextrinas, sendo que destes, os fatores relacionados ao tampão e à ciclodextrina exerceram maior influência no perfil eletroforético. O método permitiu a separação de catequina, epicatequina, procianidina B2 e a separação parcial dos enantiômeros cinchonaína Ia e Ib, em um tempo relativamente curto de análise (14 min).

A cromatografia em camada delgada (CCD) tem sido usada para auxiliar no controle de qualidade de fármacos e plantas. O extrato semipurificado de catuba foi avaliado sob esta óptica, utilizando um sistema eluente simples, composto por clorofórmio, ácido acético, metanol e água, o agente cromogênico foi vanilina perclórica, a substância padrão foi a

cinchonaína lb. Ao revelar a placa de CCD, a mancha do padrão foi amarela e apresentou valor de R_f de 0,58, a mesma mancha correspondente foi identificada no extrato de catuaba, confirmando a presença de cinchonaína lb (BRAZ et al., 2012).

Alguns grupos de pesquisa têm desenvolvido formas farmacêuticas semi-sólidas bem como métodos analíticos para quantificar o teor de substância ativa e/ou marcadora a fim de avaliar a qualidade.

Dentre eles pode-se citar o trabalho de Baby e colaboradores (2006) que desenvolveram e validaram método por espectrofotometria por UV para quantificação de bioflavonoides totais de uma emulsão O/A contendo extrato padronizado de *Trichilia catigua* e *Ptychopetalum olacoides*. O método apresentou-se linear para a substância química de referência rutina, com a concentração variando de 5,0 a 15,0 $\mu\text{g/mL}$ com especificidade para bioflavonóides totais (expresso em rutina) a 361 nm com ausência de interferentes da matriz complexa.

O mesmo grupo avaliou a estabilidade química acelerada da emulsão O/A desenvolvida. A estabilidade foi determinada em função dos flavonoides totais, expressos em rutina, contendo o mesmo extrato padronizado de *T. catigua* e *P. olacoides*. As amostras foram avaliadas por 90 dias e estocadas a $5\pm0,5^\circ\text{C}$, $24\pm2^\circ\text{C}$ e $40\pm0,5^\circ\text{C}$. De acordo com os resultados a emulsão O/A apresentou estabilidade química aceitável, durante os 90 dias de experimento quando armazenadas a $5\pm0,5^\circ\text{C}$ e $24\pm2^\circ\text{C}$. Já na condição de temperatura de $40\pm0,5^\circ\text{C}$ apresentou aceleração do processo de degradação dos flavonoides totais (BABY et al., 2007).

Outro grupo de pesquisadores também avaliou a quantificação de flavonoides de emulsão O/A com extratos de plantas brasileiras. Rolim e colaboradores (2006) utilizaram o método de espectrofotometria derivada para quantificar os flavonoides totais. A formulação também contém extratos vegetais de *T. catigua* e *P. olacoides*, como as formulações de Baby e colaboradores (2006), diferenciando no comprimento de onda da análise, sendo de 388 nm e apresentou linearidade para a rutina na concentração de 10 a 60 $\mu\text{g/mL}$.

Ainda dentro do desenvolvimento farmacotécnico, Velasco e colaboradores (2008) desenvolveram emulsões cosméticas contendo 5% do extrato comercial de *T. catigua* e *P. olacoides*. Quatorze formulações-teste foram elaboradas e avaliadas pela estabilidade macroscópica, valores de viscosidade aparente, pH compatível com a pele e características organolépticas adequadas, por meio dos testes de estabilidade preliminar e acelerada. Agruparam suas formulações em dois grupos de formulações: emulsões fluidas e emulsões mais viscosas. Após análise, oito formulações-teste foram consideradas aptas para serem submetidas ao teste de estabilidade preliminar. Destas, cinco formulações-teste foram selecionadas para o teste de estabilidade acelerada. Os ensaios foram conduzidos em condições de armazenamento, de luminosidade e de temperatura extremas. Ao final do

estudo, apenas duas formulações-teste apresentaram os perfis mais estáveis, sendo ambas, emulsões fluidas constituídas de ceras auto-emulsionantes e 0,3% (p/p) de um polímero natural, e uma delas adicionada também de 2,0% lecitina de soja.

A emulsão múltipla A/O/A contendo extrato de *T. catigua* foi preparada pelo método de emulsificação de inversão de fase, com óleo vegetal, como andiroba, buriti e canola. A melhor formulação foi obtida com óleo de canola e mostrou perfil reológico não-Newtoniano pseudoplástico. O perfil de liberação *in vitro* destes sistemas demonstraram que as emulsões contendo 1,0 e 0,5% de extrato de *T. catigua* podem liberar os polifenóis totais de forma controlada por um período de 16 e 23 horas, respectivamente. Testes de estabilidade acelerada foram realizados por 90 dias, e o pH, a condutividade, o tamanho das gotículas, as propriedades reológicas e do conteúdo de polifenóis totais destes sistemas foram avaliados. As altas temperaturas e a umidade aceleraram o processo de degradação dos polifenóis totais, e resultou em separação de fases (LONNI, 2012; LONNI et al., 2012b).

9. DESAFIOS

O conjunto de dados apresentados permite antever desenvolvimento de produtos antienvelhecimento cutâneo baseada na proteção dos diferentes compartimentos celulares cutâneos e o desenvolvimento de formulações qualitativa e quantitativamente apropriadas, com o objetivo de retardar o aparecimento de sinais de senescência, assim como melhorar o aspecto da pele.

Os constituintes de *T. catigua* para os quais os efeitos químicos e as propriedades farmacológicas têm sido bem caracterizados apresentam ótimos candidatos para melhores investigações que podem resultar em uso clínico e/ou cosmético. Alguns desses constituintes com estruturas químicas bem definidas podem vir a se tornar excelentes fitomedicamentos e/ou fitocosméticos. Contudo, apesar de terem mostrado potencial terapêutico em modelos animais, o grande desafio é desvendar seus mecanismo de ação para as atividades aqui relatadas.

Tendo em vista a capacidade antioxidante de compostos bioativos presentes em plantas, particularmente nas cascas da catuaba, destaca-se o potencial antioxidante do extrato alcoólico de *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae, demonstrado em estudos anteriores (DE BRUYNE et al., 1999; ALBRECHT et al., 2007) tanto para área farmacêutica quanto para a área cosmética.

Sugere-se, assim, priorizar a comercialização das cascas de *Trichilia catigua*, atualmente muito mais avaliada e com validação farmacológica positiva, se comparada à espécie farmacopeica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro, CNPq, INCT_if, Fundação Araucária e Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

10. REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.; GMÜNDER, F.; HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders – A survey of ethnobotanical literature. *J. Ethnopharmacol.*, v. 113, p. 363-381, 2007.
- ALBRECHT, I.; ITO, A.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. Anais do I Congresso de Farmácia de Maringá, Arq. Mudi. 11 (1), 2007.
- ALMEIDA, J.A.R.; AQUINO, V.L.; FIGUEIREDO, E.R.; CARLOS, L.A.; MOTTA, O.V.; VIEIRA, I.J.C. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Trichilia casaretti* e *T. silvatica* (Meliaceae) sobre *Staphylococcus aureus*. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza, 2009.
- 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.
- AMBROZIN, A.R.P.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. da; VIEIRA, P.C.; ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity of Meliaceae and Rutaceae plant extracts. *Mem. I Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 227-231, 2004.
- ANTUNES, E.; GORDO, W.M.; DE OLIVEIRA, J.F.; TEIXEIRA, C.E.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by herbal medicine Catuama® and its constituents. *Phytother. Res.*, v. 15, p. 416-421, 2001.
- BABY, A. R.; MIGLIATO, K. F.; MACIEL, C. P. M.; ZAGUE, V.; APARECIDA SALES de OLIVEIRA PINTO, C.; SALGADO, H. R. N.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v. 43, n. 3, p. 405-412, 2007.
- BABY, A.R.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. UV-spectrophotometric determination of bioflavonoids from semisolid pharmaceutical dosage form containing *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. standardized extract: analytical method validation and statistical procedures. *J. AOAC Int.*, Gaithersburg, v. 89, n. 6, p.1532-1537, 2006.
- BARBOSA, N., FISCHMANN, L., TALIB, L.L., GATTAZ, W.F. Inhibition of Platelet Phospholipase A2 Activity by Catuaba Extract Suggests Antiinflammatory Properties. *Phytother. Res.*, v. 18, p. 942–944, 2004.
- BELTRAME, F.L. Caracterização de duas espécies vegetais (*Trichilia catigua* e *Anemopaegma arvense*) usadas como “Catuaba” por métodos cromatográficos hifenados a métodos espectroscópicos e análise multivariada. 2005. 153f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.
- 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. *J. Chromatogr. A*, 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.
- BENENCIA, F.; COURRÈGES, M.C.; COULOMBIÉ, F.C. Anti-inflammatory activities of *Trichilia glabra* aqueous leaf extract. *J. Ethnopharmacol.*, n. 71, p. 293-300, 2000.
- BERNARDI, A.L.S.; FACCIN-GALHARDI, L.C.; RINCÃO, V.P.; NOZAWA, C.M.; MELLO, J.P.; LINHARES, R.E.C.; NOZAWA, C. Effects of the *Trichilia catigua* (catuaba/ catigua) inhibit Bovine herpesvirus-1 replication in cell culture. In: XXI National Meeting of virology, V Mercosur Meeting of virology, 2010, Gramado, RS. Virus review and research, v. 15, Rio de Janeiro, p. 112-113, 2010.
- BOGORNÍ, 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.
- BOGORNÍ, 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. *Neotrop. Entomol.*, v. 34, n. 2, p. 311-317, 2005.
- BONASSOLI, V.T.; CHASSOT, J.M.; LONGHINI, R.; MILANI, H.; MELLO, J.C.P.; OLIVEIRA, R.M.W. Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice, *J. Ethnopharmacol.*, n. 143, p. 179-184, 2012.
- BRASIL. CONSELHO FEDERAL DE NUTRICIONISTAS. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 402 de 30.07.2007. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 06 ago, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17 de 24.02.2000. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 24 abr, 2000.
- BRAZ, R.; WOLF, L.G.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P. Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market. *Rev. Bras. Farmacog.*, v. 22, p. 1111-1118, 2012.
- BRIGHENTE, I.M.C.; DIAS, M.; VERDI, L.G.; PIZZOLATTI, M.G. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharm. bio.*, v. 45, n. 2, p. 156-161, 2007.
- BURKILL, H.M. *The useful Plants of West Tropical Africa*, v. 4. 2. ed. Kew: Royal Botanic Gardens, 1997. p.88-134.
- 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. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. *J. Ethnopharmacol.*, v. 100, p. 131-134, 2005.
- 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. *Phytother. Res.*, v.11, p. 32-38, 1997.

- CAMPOS, M.M.; FARNANDES, E.S.; FERREIRA, J.; BORTOLANZA, L.B.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Pharmacological and neurochemical evidence for antidepressant-like effects of herbal product Catuama. *Pharmacol. Biochem. Be.*, n. 78, p.757-764, 2004.
- CAMPOS, M.M., FERNANDES, E., 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.
- CASTAÑEDA-OVANDO, A., PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L., PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E., RODRÍGUEZ, J. A., GALÁN-VIDAL, C. A.. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chem.*, v. 113, p. 859-871, 2009.
- CASTELLANI, D.C.; CASALI, V.W.D.; SOUZA, A.L.; CECON, P.R.; CARDOSO, C.A.; MARQUES, V.B. Produção de óleo essencial em catuaba (*T. catigua* A. Juss) e negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) em função da época de colheita. *Rev. Bras. Plant. Med.*, v.8, n.4, p. 62-65, 2006.
- 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. *J. Ethnopharmacol.*, v. 137, p. 1143– 1148, 2011.
- CORRÊA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Vol I, Imprensa Nacional (ed.), Rio de Janeiro, p. 545-555, 1984.
- CORRÊA, M. P. *Dicionário de plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Vol. II, 1931.
- DA SILVA, A. J. Estudo botânico e químico da catuaba (Erythroxylaceae catuaba do Norte). *Tese de doutorado da Faculdade de Medicina da Bahia*, 1906. [Reprint published in 3 parts in *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, as cited below as Da Silva, Arthur José (2004, 2005)].
- DAOLIO, C.; BELTRAME, F.; FERREIRA, A.G.; CASS, Q.B.; CORTEZ, D.A.G.; FERREIRA, M.M.C. Classification of commercial catuaba samples by NMR, HPLC and chemometrics. *Phytochem. Analysis*, n. 19, p. 218-228, 2008.
- DATTNER, A.M. Nutritional dermatology. *Clin. Dermatol.*, v.17, p. 57-64, 1999.
- DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 27, p. 445-459, 1999.
- DIAS, R.F.; ESPÍNOLA, E.B.; GALVÃO, S.M.P.; MARQUES, L.C.; MATTEI, R.; CARLINI, E.A. Avaliação farmacológica de plantas medicinais brasileiras com possível efeito adaptógeno – II: Determinação da atividade motora e da esquila passiva. *Anais... XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, Florianópolis, 1996.
- DINIZ, A. LONGHINI, R.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P. Development Analytical Method using RP-HPLC-PDA of *Trichilia catigua* (catuaba) extracts. In: 23 International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, João Pessoa, 2011.
- DOS SANTOS, A.H.; RAMOS, A.C.; LONGHINI, R.; MESQUITA, S.F.P.; MELLO, J.C.P.; DINIZ, A.; GERARDIN, D.C.C. Could the maternal exposure to *Trichilia catigua* interfere with reproductive development in male rats offspring? In: III Workshop on Male Reproductive Biology, Campinas, v.3, p.44, 2011.
- DUCKE, A. A catuaba na botânica sistemática científica e pseudo-científica. *Rev. Bras. Farm.*, v. 47, p. 267-71, 1966.
- ELDEEN, I.M.S.; ELGORASHI, E.E.; VAN STADEN, J. Antibacterial, anti-inflammatory, anticholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.*, v. 102, p. 457-464, 2005.

- FACCIN-GALHARDI, L.C.; RINCÃO, V.P.; NOZAWA, C.M.; LINHARES, R.E.C.; RAMOS, A.P.D. Antiviral activity of crude extract and the aqueous and acetate fractions from *Trichilia catigua* against poliovirus. In: XIX National Meeting of virology, III Mercosur Meeting of virology, 2008, Caxambu, 2008.
- 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.
- FRANQUILINO E. Em ritmo de expansão. *Cosmetics Toiletries* (ed. Port.), v.18, p.7-10, 2006.
- GALVÃO, S.M.P.; DIAS, R.F.; ESPÍNOLA, E.B.; MARQUES, L.C.; MATTEI, R.; CARLINI, E.A. Avaliação farmacológica de plantas medicinais brasileiras com possível efeito adaptógeno – I: Estudos preliminares. *Anais... XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis*, 1996.
- GARCEZ, F.R., GARCEZ, W.S., TSUTSUMI, M.T., ROQUE, N.F. Limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. *Phytochemistry*, v. 45, n. 1, p. 141-148, 1997.
- GERMANÒ, M.P.; D'ANGELO, V.; BIASINI, T.; SANOGO, R.; DE PASQUALE, R.; CATANIA, S. Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emetica* Vahl. *J. Ethnopharm.*, v. 105, p. 368-373, 2006.
- GOMES, M.L.M. *Morfometria testicular de ratos Wistar adultos tratados com infusão aquosa de catuaba (Trichilia catigua A. Juss. Meliaceae)*. Dissertação – Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, 2007.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Brasil em síntese. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/brasil_em_sintese/populacao04.htm>. Acesso em: 12 de março de 2008.
- JOLY, A.B. *Botânica. Introdução à taxonomia vegetal*. 13 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. p.408-410.
- KAMANZI ATINDEHOU, K.; SCHMID, C.; BRUN, R.; KONÉ, M.W.; TRAORE, D. Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Côte d'Ivoire. *J. Ethnopharmacol.*, v. 90, p. 221-227, 2004.
- KAMDEM J.P.; SOUZA, D.O.; ROCHA, J.B.T. Neuroprotective effects of catuaba (*Trichilia catigua*) against hydrogen peroxide, sodium nitroprusside and nitropropionic acid-mediated toxicity in rat hippocampus slices. *Caderno de Farmácia*, v. 28, supl., p. S11-S12, 2012.
- KLEIN, R.M. *Flora Ilustrada Catarinense – Meliáceas*, Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1984. p. 55-60.
- KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 30, p. 241-248, 2009.
- 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 Med.*, n. 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.

KRAFT, K. *Phytotherapy in the treatment of functional disorders*. MMW Fortschr Med. v.7, n.148, p.30-33, 2006.

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*. Curitiba: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, 2006. Dissertação de Mestrado.

LAGOS, J.B; MIGUEL, O.G; DUARTE, M.R. Caracteres anatômicos de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae). *Lat. Am. J. Pharm.*, v. 26, p. 185-90, 2007.

LONNI, A.A.S.G.; LOPES, G.C.; DICIAULA, M.C.; NELLO, J.C.P.; SCARMINIO, I.S. Mixture design optimization of extraction of *Trichilia catigua* (catuaba). In: Cifarp - 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2011, Ribeirão Preto, 2011.

LONNI, A. A. S. G.; LONGHINI, R.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P. de; SCARMINIO, I.S. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Anal. Chim. Acta*, v. 719, p. 57-60, 2012a.

LONNI, A.A.S.G. *Desenvolvimento e caracterização de formulação de uso tópico contendo extrato padronizado de Trichilia catigua para fins cosméticos*. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

LONNI, A.A.S.G.; SCARMINIO, I. S.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Desenvolvimento e caracterização de nanocosmético contendo extrato de *Trichilia catigua* para prevenção do envelhecimento cutâneo. In: V Congresso de Integração Empresa, Instituições de CT&I e Governo, 2012, Londrina, 2012b.

LONGHINI, R.; KLEIN, T.; SILVA JUNIOR, W.V. da; 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 *J. Sep. Sci.*, v.36, p. 1247-1254, 2013.

LORENZI, H. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*, vol.1, 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil. Nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MARQUES, L.C. Contribuição ao esclarecimento da identidade botânica da droga vegetal catuaba. *Revista Racine*, v.3, 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 A. Juss.)*. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Química, 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.; 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*, v.1, p. 7, 2006.

MATOS, A.P.; NEBO, L.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua*. *Quim. Nova*, 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. Desenvolvimento galênico de macerados de *Baccharis trimera* (LESS.) DC. – Compositae – (Carqueja). Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Análise, Síntese e Controle de Medicamentos, 1989.

MELLO, J.C.P.; SANTOS, S.C. Taninos. 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. 1ª. reimpr., Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed. Da UFSC, Cap. 24. p. 517-544, 2003.

MENDES, F.R., CARLINI, E.A. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, v. 109, p.493–500, 2007.

MOURÃO, K.S.M.; DIAS-PINTO, D.; SOUZA, L.A.; MOSCHETA, I.S. Morfo-anatomia da plântula e do tirodendro de *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. e *T. pallida* Sw. (Meliaceae). *Acta Scientiarum*, v.24, n. 2, p. 601-610, 2002.

NEBO, L.; MATOS, A.P.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; RODRIGUES, R.R. Atividade inseticida dos frutos de *Trichilia clausenii* (MELIACEAE) sobre *Spodoptera frugiperda*. *Quim. Nova*, v. 33, p. 1849-1852, 2010.

NORES, M.M., COURRÉGES, M.C., BENENCIA, F., COULOMBIÉ, F.C. Immunomodulatory activity of *Cedrele lilloi* and *Trichilia elegans* aqueous leaf extracts. *J. Ethnopharm.*, v. 55, p. 99–106, 1997.

OLIVEIRA, C.H.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O.; BEZERRA, F.A.F.; ABIB, E.; DE NUCCI, G. Clinical toxicology study of a herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale* (Catuama®) in healthy volunteers. *Phytother. Res.*, v. 19, p. 54-57, 2005.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). Organização Mundial da Saúde. *Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde*. Disponível em <<http://www.opas.org.br/publicmo.cfm?codigo=66>>. Acesso em 11 ago 2009.

PATRÍCIO, P.C.; CERVI, A.C. O gênero *Trichilia* P. Browne (Meliaceae) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Biol. Paran.*, v. 34, p. 27-71, 2005.

PENNINGTON, T.D.; STYLES, B.T. S; TAYLOR, D.A.H. *Meliaceae. Flora Neotropica*. (New York), v. 28, p. 1-470, 1981.

PEREIRA, N.A. *Contribuição de Manuel Freire Alemão de Cisneiros para o Conhecimento de nossos Fitoterápicos*. Rio de Janeiro: Brasileira de Artes Gráficas, 1982.

PHARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 1ª. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926.

- 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.
- PIZOLLATTI, M.G.; VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.; MADUREIRA, L.A.; BRAZ FILHO, R. Minor gamma-lactones from *Trichilia catigua* (Meliaceae) and its precursors by GC-MS. *Nat. Prod. Res.*, v. 18, n. 5, p. 433-438, 2004.
- PIZZOLATTI, M.G.; KOGA, A.H.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine*, v. 9, p. 422-426, 2002b.
- PIZZOLATTI, M.G.; VENSON, A.F.; SMÂNIA, A. J.; SMÂNIA, E.F.A.; BRAZ-FILHO, R. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. *Z. Naturforsch. C*, v.57, p.483-488, 2002a.
- 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. *J. Electrocardiol.*, v. 40, p.534-534, 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.
- RESENDE, F. O. *Trichilia catigua: avaliação farmacognóstica, fitoquímica e biológica in vitro*. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2007.
- RESENDE, F.O.; RODRIGUES FILHO, E.; LUFTAMNN, H.; PETEREIT F.; MELLO, J.C.P. Phenylpropanoids substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their in vitro antioxidative activity, *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 22, p. 2087-2093, 2011.
- 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. Isolation of terpenoids from *Trichilia quadrijuga* (Meliaceae) by droplet counter-current chromatography. *Chromatographia*, v. 70, p. 1191-1195, 2009.
- ROLIM, A.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; VELASCO, M.V.R. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss. (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Benthham (Olacaceae) commercial extract. *J. AOAC Int.*, v. 88, n.4, p.1015-1019, 2005.
- ROLIM, A.; OISHI, T.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, M.V. Total flavonoids quantification from O/W emulsion with extract of Brazilian plants. *Int. J. Pharmaceut.*, n. 308, p. 107-114, 2006.
- SEREIA, A.L.; MELLO, J.C.P. Desenvolvimento de metodologia analítica por ECZ para polifenóis de fração semipurificada de *Trichilia catigua*. In: VI Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais, Ponta Grossa, 2012a.
- SEREIA, A.L.; LONGHINI, R.; MELLO, J.C.P. Análise farmacognóstica de cascas de *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae). In: VI Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais, Ponta Grossa, 2012b.
- SILVA, A.J. Estudo botânico e químico da catuaba (Erythroxylaceae Catuaba do Norte). Parte I: Histórico, habitat, sinonímia e botânica da catuaba. *Rev. Bras. Farmacog.*, v. 14, n. 1, p. 67-77, 2004a.

- SILVA, A.J. Estudo botânico e químico da catuaba (Erythroxylaceae Catuaba do Norte). Parte II: Materia medica, formas farmacêuticas, aplicações e observações clínicas. *Rev. Bras. Farmacog.*, 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. *Rev. Bras. Farmacog.*, v. 15, n. 1, p. 77-81, 2005.
- SILVA, M.C.; FERNANDES, E.V.; RAMOS, A.C.; LONGHINI, R.; LOPES, G.C.; OLIVEIRA, R.M.M.W.; DINIZ, A.; MELLO, J.C.P.; GERARDIN, D.C.C.; VENANCIO, E.J. Efeito da exposição materna ao extrato bruto de *Trichilia catigua* (catuaba) na produção de anticorpos na prole de ratos. In: 1º Congresso Paranaense de Ciências Biomédicas, Londrina, 2011.
- 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. 1ª. reimp. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010, p.289-326.
- SOUZA, L.A.; MOSCHETA, I.S.; MOURÃO, K.S.M.; SILVÉRIO, A. Morphology and anatomy of the flowers of *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. and *T. pallida* Sw. (Meliaceae). *Braz. Arch. Biol. Techn.*, v.44, n.4, p.383-394, 2001.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. *Botânica sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. p. 428-429.
- SPARG, S.G.; VAN STADEN, J.; JÄGER, A.K. Efficiency of traditionally used South African plants against schistosomiasis. *J. Ethnopharmacol.*, v.73, p. 209-214, 2000.
- TABANCA, N.; PAWAR, R.S.; FERREIRA, D.; MARAIS, J.P.J.; KHAN, S.I.; JOSHI, V.; WEDGE, D.E. KHAN, I.A. Flavan-3-ol phenylpropanoid conjugates from *Anemopaegma arvense* and their antioxidant activities. *Planta Med.*, v. 73, p. 1107-1111, 2007.
- TANG, W.; HIOKI, H.; HARADA, K.; KUBO, M.; FUKUYAMA, Y. Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. *J. Nat. Prod.*, v.70, p. 2010–2013, 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. *Phytother. Res.*, v. 11, p. 101-106, 1997.
- VEIGA-JUNIOR, V.F.; MELLO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 18, p. 464-471, 2008.
- VELASCO, M.V.R.; MACIEL, C.P.M.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; CONSIGLIERI, V.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Desenvolvimento e teste preliminar da estabilidade de formulações cosméticas acrescidas de extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss e *Ptychopetalum olacoides* Benth. *Rev. Ciênc. Farm. Bas. Apl.*, v. 29, n. 2, p. 179-194, 2008.
- 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. *eCAM*, p. 1-8, 2009. Disponível em: <<http://ecam.oxfordjournals.org/cgi/reprint/nep144v1>>
- YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; Cechinel Filho, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quim. Nova*, v. 24, n. 1, p.147-152, 2001.

WHEELER, D. A.; ISMAN, M. B. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia amerina* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 81, p. 9-16, 2001.

ZANOLARI, B.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E.; PAULO, M.Q.; HOSTETTMANN, K. Tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. *J. Nat. Prod.*, v. 66, n.4, 2003a.

ZANOLARI, B.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E.F.; PAULO, M.Q.; HOSTETTMANN, K. Methylpyrrole tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. *J. Nat. Prod.*, v.68, p.1153-1158, 2005.

ZANOLARI, B.; WOLFENDER, J.L.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E.F.; PAULO, M.Q.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of tropane alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography-UV detection-multiple mass spectrometry and liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 1020, p. 75-89, 2003b.

CAPÍTULO 2 – VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Este capítulo consiste no desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação dos marcadores químicos procianidina B2 e epicatequina em fração semipurificada de catuaba (*T. catigua*). Este artigo foi aceito para publicação no periódico *Journal of Separation Science*, v. 36, p. 1247-1254, 2013.

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

Renata Longhini¹, Traudi Klein¹, Waldir Veríssimo da Silva Junior², Juliana Rodrigues¹, Norberto Peporine Lopes³ and João Carlos Palazzo de Mello^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Department of Pharmacy, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

²Department of Statistics, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

³Department of Physico-Chemistry, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Correspondence: Dr. João Carlos Palazzo de Mello, Department of Pharmacy, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Maringá, PR, BR-87020-900, Brazil

E-mail: mello@uem.br

Tel.: +55-44-3011-4816; Fax: +5-44-3011-5050.

Abbreviations: **CE**, crude extract; **EAF**, ethyl-acetate fraction; **EPC**, epicatechin; **GA**, gallic acid; **PB2**, procyanidin B2; **PDA**, photo diode array; **S**, slope

Keywords: *Trichilia catigua* / Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols / Quantitative analysis

Abstract

The phenolic compounds are the main phytochemical constituents of the bark of *Trichilia catigua* and are commonly used for medicinal purposes. An HPLC method for the simultaneous quantification of phenolic compounds (procyanidin B2 (PB2), epicatechin (EPC), chinchonains Ia, Ib, IIa, IIb, catechin, and chrologenic acid) in *T. catigua* extract was developed and validated. A suitable chromatographic system was selected, which uses a gradient elution with methanol-ACN (75:25), and water both with 0.05% TFA, as mobile phase, column Luna, 280 nm, and flow 0.4 mL/min. Validation of the analytical method was based on the parameters: linearity, precision, LODs and LOQs, accuracy, robustness, and stability. The method showed linearity for PB2 and EPC, in the range 10–120 mg/mL with good correlation coefficients (>0.996). For precision, the repeatability ranged from 1.89 to 3.23%, and the values for accuracy for PB2 and EPC were 95 and 89%, respectively. The LODs and LOQs for PB2 were 1.36 and 4.12 mg/mL, and for EPC were 2.18 and 6.61 mg/mL, respectively. The method was robust under the conditions employed. The proposed

method could be employed for quality assessment of *T. catigua*, as well as pharmaceutical products.

1 Introduction

Traditional medicines, including herbal medicines, are used worldwide and specifically in the developing world; 70–95% of the population relies on these traditional medicines for primary care [1]. Therefore, it is important to develop suitable methods for quality control of plants and their intermediate and final products.

Trichilia catigua A. Juss. (Meliaceae) is a medium-sized flowering tree, widely distributed in South America. In Brazil it is known as “catuaba,” “catiguá,” and “catuama.” Several different species of *Erythroxylum* or *Anemopaegma* are regionally known as “catuaba,” and are sold commercially, so that the identity of the plant source is often uncertain. *T. catigua* is the main species sold as “catuaba” in Brazil, according to observations by Marques [2], who described the differences among the species known as “catuaba.” The species has been used in folk medicine as a tonic for the treatment of fatigue, stress, impotence, and memory deficits [3]. An adaptogenic function has also been attributed to *T. catigua*, and it has been used to decrease the consequences of stress and improve physical and cognitive performance in both healthy and ill individuals [4].

Some popular uses of *T. catigua* have been confirmed by experimental studies. Commercially available preparations that contain *T. catigua* have been shown to exert relaxant effects on *corpus cavernosum* strips from rabbits [5], and to show antinociceptive [6], anti-inflammatory [7], and antidepressantlike effects [8–10], antioxidant activities [9–12], and to improve memory [9].

Tannins or phenylpropanoid-substituted flavan-3-ol [3,12–15], alkaloids, and lignans [3] are the main secondary metabolites found in *T. catigua*. In the present study, it was evaluated the condensed tannins isolated from the acetone:water extract of bark of *T. catigua*, monomer, and dimer flavan-3-ols (Fig. 1).

The literature shows methods for determination of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography (HPLC) [13, 16–18], but due to the complexity of plant extracts, it is not always possible to use the same method to another species. Thus, it is necessary to make adjustments or even a new chromatographic analytical development.

However, these herbs may contain hundreds of complex active components of which have limited knowledge; it is almost impossible to identify all of these compounds and to carry out a quantitative analysis [13, 16–18]. Generally, only a few effective components are determined by HPLC or other methods for evaluating the quality of herbal medicines.

Validation studies remain a widely explored area, for instance in the studies of Nugroho et al. [19] and Irakli et al. [20], who demonstrated good results to ensure appropriate

methodologies for quality control of raw materials. It is possible to establish parameters of acceptable quality, as well as to determine the total amount and correct doses.

For drugs derived from plants such as ‘catuaba’ bark, quality control of the plant raw material is especially important, because these drugs naturally vary in their chemical composition, mainly due to climate and other factors [21]. It is of fundamental importance to monitor the different lots in order to maintain quality. This quality is especially important because we have a large research group with ‘catuaba’, studies involving antidepressants, memory, and antioxidant [9, 10], and studies that evaluated the effect on pregnancy and lactation, intestinal absorption, against *Trypanosoma cruzi*, Herpes virus, oxidative stress, among others. This quality ensures the presence and the proportion of the chemical constituents, and opens opportunity for a more detailed study like bioavailability.

This paper describes the resulting optimization study and validation by reversed-phase HPLC method to detect and quantify procyanidin B2 (PB2) and epicatechin (EPC), and other compounds, in a *T. catigua* semipurified fraction. The validated method provides a significantly tool for industry, academic works, and regulatory agencies to ensure the quality of this botanical [22], and is fundamental for future studies.

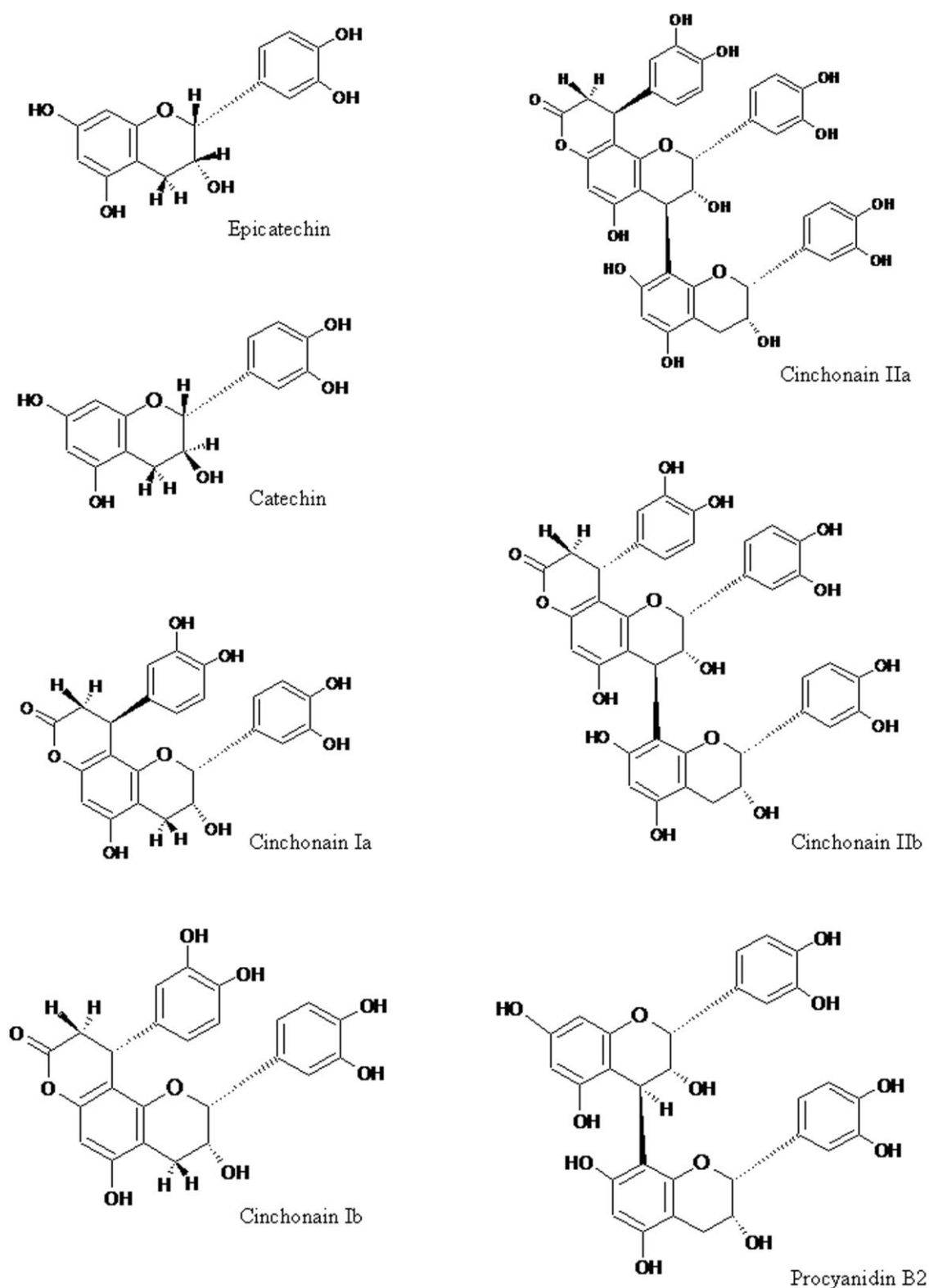


Figure 1. Isolated compounds from *Trichilia catigua*.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

HPLC-grade methanol and acetonitrile were obtained from J.T. Baker (USA), and ultrapure water was obtained using a Milli-Q Gradient[®] (Millipore, USA). Analytical grade acetone and ethyl acetate were obtained from Merck (Germany) and TFA was obtained from J.T. Baker. Analytical-grade standards, catechin ($\geq 99\%$ purity), epicatechin ($\geq 97\%$ purity), gallic acid ($\geq 97\%$ purity) and chlorogenic acid ($\geq 95\%$ purity) (Sigma, USA), and procyanidin B2, cinchonans Ia, Ib, IIa, and IIb ($> 87\%$ purity confirmed by HPLC; isolated from *T. catigua* [15]) were used.

2.2 Preparation of standard stock solutions

Procyanidin B2 and epicatechin were employed as external standards. Stock standard solutions were prepared by dissolving 2.00 mg of each compound in methanol-water solution (2:8; v/v) and diluting to 5.0 mL in a volumetric flask. To generate the calibration curves, a measured amount of each stock solution was transferred into a test tube and mixed, to obtain concentrations of 10.0, 40.0, 70.0, 100.0, and 120.0 $\mu\text{g/mL}$. The solutions were filtered through an FHLP01300 20 μm membrane filter (Millipore, USA).

Gallic acid (GA) was used as internal standard for quantification of other known compounds; 2.00 mg of gallic acid was dissolved in methanol-water solution (2:8; v/v) and diluted to 5.0 mL in a volumetric flask (stock solution). The following concentrations were obtained: 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, and 12.0 $\mu\text{g/mL}$. The solutions were filtered through an FHLP01300 20 μm membrane filter (Millipore, USA), and 200 μL of each concentration was added to 600 μL of semipurified ethyl-acetate fraction (EAF) solution, and the samples were analyzed in HPLC. Each point was evaluated in triplicate and the calibration curve was fitted by linear regression.

2.3 Preparation of extract and analytical solution

The bark of *T. catigua* used in this study was obtained in Caetité, Bahia, Brazil, in August 2008 and identified by Dr. Gerdt Hatschbach. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of Curitiba Town Hall (no. 306253), Curitiba, Paraná, Brazil. The bark (1.2 kg) was dried and pulverized for extraction with 12 L of acetone-water (7:3, v/v) by turbo-extraction (Ultra-Turrax, model UTC115KT, USA) for 15 min ($t < 40^\circ\text{C}$). The extracts produced were filtered, concentrated in a rotavapor under reduced pressure, and lyophilized to yield a crude extract (CE; 274 g). Each 50 g of CE was dissolved in water (0.5 L) and partitioned with ethyl acetate to obtain the semipurified ethyl-acetate fraction (EAF; 11 g). A 5.00 mg portion of EAF was dissolved in 1 mL of 20% methanol, and was eluted through the solid-

phase extraction cartridge (SPE, Strata C18-E, Phenomenex®) pre-conditioned with methanol and water, and diluted in 10 mL of 20% aqueous methanol. This work was developed with the EAF because this fraction showed best activities [9, 10].

2.4 Chromatographic system

The experiments were performed in a Thermo® HPLC equipped with a PDA (photo diode array) spectrophotometric detector module (Model Finnigan Surveyor PDA Plus Detector), integral pumps and degasser (Finnigan Surveyor LC Pump Plus), autosampler (Finnigan Surveyor Autosampler Plus) equipped with a 10 µL loop and controller software (Chromquest), A Phenomenex Luna PFP(2) 100 Å (250 x 4.6 mm, 5 µm) and guard column (Phenomenex) were used in all experiments. The mobile phase consisted of Phase A: methanol-acetonitrile (75:25; v/v) containing 0.05% TFA, and Phase B: water with 0.05% TFA, previously degassed using an ultrasonic bath. A gradient program, as follows: 0 min, 30% Phase A; 36 min, 40% Phase A; 38 min, 30% Phase A, and continued at 40 min, was followed by a 2 min post-time to re-equilibrate the system, at a flow rate of 0.4 mL/min. The eluent was monitored by a PDA, and the detection wavelength was set at 280 nm. The sample injection volume was 10 µL, and the column temperature was controlled room temperature (22±3 °C). Data were analyzed using ChromQuest 4.1 software. PB2, EPC, catechin, chlorogenic acid, and cinchonains Ia, Ib, IIa, and IIb were used to identify the major components in the EAF.

For the HPLC analysis of the semipurified extract (EAF), a different column was used: Gemini C18 (Phenomenex), 250 x 4.6 mm, 5 µm, and a C18 guard cartridge 6 x 3 mm, 5 µm.

2.5 Validation

The validation process followed the guidelines established by the ICH (International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use) [23], and the Brazilian regulation RE 899/2003 of the National Health Surveillance Agency [24].

2.5.1 Linearity

The linearity was determined for the calibration curves obtained by HPLC analyses of PB2 and EPC standard solutions as described in the “Preparation of standard stock solutions” section above. In order to demonstrate linearity over the desired range, four calibration curves for each analyte were constructed and examined. Evaluation of each point was conducted in three replicates. The slope and the other statistics of the calibration curves were calculated by linear regression.

2.5.2 Limit of detection and quantification

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation (SD) and the slope (S) of the calibration curve based on equations (1) and (2).

$$LOD = 3.3 \times SD / S \quad (1)$$

$$LOQ = 10 \times SD / S \quad (2)$$

2.5.3 Precision

Precision was considered at two levels: repeatability and intermediate precision, where the SD and relative standard deviation (RSD) of six injections were considered (500 µg/mL). To evaluate intermediate precision, the analyses were carried out by different analysts on different days.

2.5.4 Accuracy

Accuracy was evaluated through recovery studies, by adding known amounts of standards. The recovery experiment was performed at three concentrations of PB2 and EPC (40, 70, and 100 µg/mL) standards. The recovery data were determined by dividing the value obtained for the sample prepared with the added standard, by the amount added, and then multiplied by 100% [23]. The recovery experiments were performed in triplicate.

2.5.5 Robustness

Robustness was determined by changing the flow rates to 0.395 mL/min and 0.405 mL/min. The ANOVA was performed to demonstrate whether the flow variations altered the results of the HPLC analysis.

2.6 Stability

The stability of sample solutions was determined over six weeks (42 days). The samples were dissolved in 20% aqueous methanol solution at controlled room temperature (22±3 °C) while exposed to light, and refrigerated. Another sample was prepared and exposed to direct sunlight for six hours.

2.7 EAF extractive solution quantification

The EAF extractive solution was quantified using external and internal calibration curves. For the PB2 and EPC peaks the external calibration curve was used, and for the other compound peaks the internal calibration curve was used; both were quantified by linear regression of the standards. The EAF solutions were analyzed by HPLC in six replicates.

2.8 Statistical analysis

For calculations, the software Statistica® 7.0 was used. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), in which the results were considered significant when the probability was less than 5% ($p < 0.05$), followed by the Tukey test for multiple comparisons.

3 Results and Discussion

3.1 Selection of a suitable chromatographic system

In this study, most compounds of interest are phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols, the structures of which are given in Fig. 1.

For the optimization of the chromatographic conditions, several mobile phases, gradient elution programs, and columns were tested (Table 1).

Table 1. Mobile phases, column type, and flows tested in separation of EAF extractive solutions.

System	Mobile phase	Column	Flow (mL/min)
A	Water 5% acetic acid and Methanol 5% acetic acid	Gemini C18	0.7
B	Water 0.05% TFA and Methanol 0.05% TFA	Gemini C18	0.7
C	Water 0.05% TFA and Methanol/acetonitrile (50:50) 0.05% TFA	Gemini C18	0.7
D	Water 0.05% TFA and Methanol/acetonitrile (75:25) 0.05% TFA	Gemini C18	0.7, 0.5 and 0.4
E	Water 0.05% TFA and Methanol/acetonitrile (25:75) 0.05% TFA	Gemini C18	0.7
F	Water 0.05% TFA and Methanol 100%	Luna PFP(2)	1.0 and 0.8
G	Water 0.1% acetic acid and Methanol 100% 0.1% acetic acid	Luna PFP(2)	0.8
H	Water 0.05% TFA and Methanol/acetonitrile (75:25) 0.05% TFA	Luna PFP(2)	0.7 and 0.4

Initially, the Gemini C18 column (Phenomenex) was used, with different variations of the mobile phase, gradient elution programs, and flow rate. The compounds, mainly cinchonain isomers Ia, Ib, IIa and IIb, did not show good separation. The Luna PFP(2) column provided the best separation of both cinchonains IIa and IIb as well as other compounds, demonstrating a good chromatographic profile (Fig. 2).

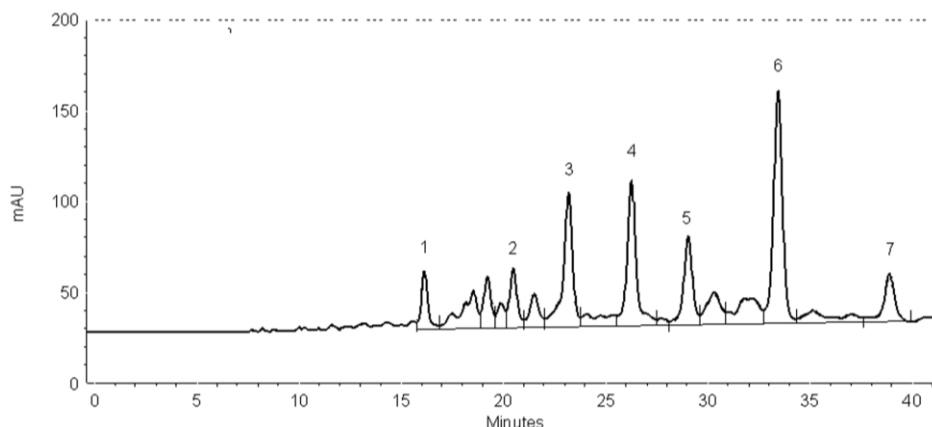


Figure 2. Chromatogram of EAF fraction with PB2 (1; t_r =16.5 min), mixture of catechin and chlorogenic acid (2; t_r =20.9 min), cinchonain IIb (3; t_r =23.6 min), cinchonain IIa (4; t_r =26.6 min), epicatechin (5; t_r =29.5 min), mixture of cinchonains Ia and Ib (6; t_r =33.8 min). (For peak #7 see stability discussion). Chromatographic conditions system H, with flow of 0.4 mL/min (see Table 1).

In order to elucidate the presence of cinchonain isomers Ia and Ib, previous studies have proceeded chiral separation using column Chiralcel OD-H [cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) coated on 5 μ m silica gel, Daicel Chemical Industries], 250 x 4.6 mm, 5 μ m, using as mobile phase *n*-hexane: ethanol: isopropanol (72:23:5, v/v) in isocratic elution system. The detection and temperature conditions were maintained as previously described (system H, Table 1), and with flow of 0.4 mL/min. For this purpose, we used the standard and semipurified fraction EAF, confirming the presence of both compounds (Fig. 3). Further studies will be developed to better the resolution in the separation.

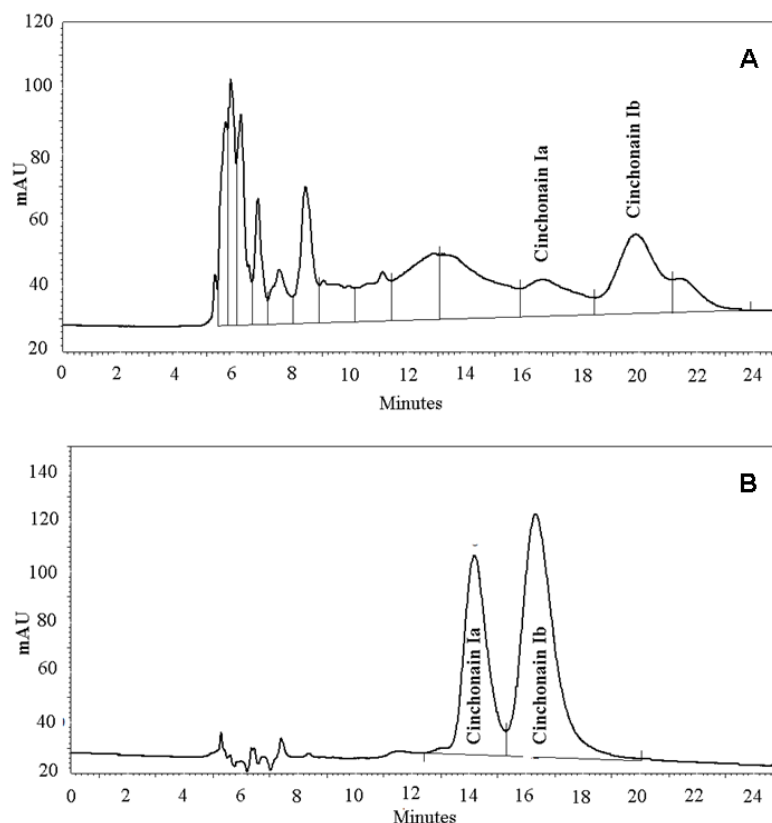


Figure 3. Chromatogram of the enantiomeric separation of the semipurified fraction EAF (A) and cinchonain Ia and Ib standards (B). Isocratic elution; Column: Chiralcel OD-H [cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) coated on 5 μ m silica gel, Daicel Chemical Industries], 250 x 4.6 mm, 5 μ m; mobile phase: *n*-hexane:ethanol:isopropanol (72:23:5; v/v); flow 0.4 mL/min, and detection at 280 nm.

Different mixtures of water, methanol, and acetonitrile were used as the mobile phase. When only methanol was used, the chromatographic peaks had relatively low resolution and separation. Therefore, we decided to use acetonitrile-methanol mixtures. Since chromatographic separation of tannins was much more efficient after acidification of the mobile phase, two different acids were tested: TFA and acetic acid. TFA at 0.05% proved to be more effective to obtain a better chromatographic profile; similar results were reported by Klein et al. [18].

The empty space in the beginning of gradient elution was necessary to obtain a good separation of the different compounds in the semipurified EAF fraction. Furthermore, the gradient program must also be optimized in order to provide the best resolution and acceptable peak parameters for different analytes. From the results obtained, the optimum conditions were: 1) eluent: water and methanol-acetonitrile (75:25; v/v), both acidified with

0.05% TFA; 2) flow of 0.4 mL/min, and 3) column: Luna PFP (2), which corresponds to System H (Table 1, Figure 2).

Before defining the most appropriate method, other methods for simultaneous determination of polyphenols were evaluated and were not obtained good results. Beltrame et al. [13] developed the method of crude extract of *T. catigua*, eluting at 60 min, methanol ranging from 5 to 100% and flow rate of 1.0 mL/min. We evaluated a semipurified fraction eluting within 42 min, methanol ranging from 30 to 40% and flow of 0.4 mL/min, representing a savings in time, cost, and low volume of organic residue.

Evaluation of the EAF by HPLC-PDA was indispensable to define certain parameters. By this means, the UV spectra of the PB2 and EPC peaks of the EAF fraction were obtained (Supporting Information Fig. S1). The spectra for these substances showed two bands that were very similar to the profile found for the PB2 and EPC standards. The same procedure was applied to identify other compounds in the chromatogram, and each compound was compared with the UV profile of standards. The peaks numbered 1 to 7 were analyzed by LC-ESI-MS (LC: Shimadzu 20AD; microTOF II - ESI-TOF Mass Spectrometer, Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), as well as peaks at $rt=19.5$ and 21.5 min. The peak at 19.5 min showed a ratio m/z 741, which may correspond to a substance of type cinchonain II. The second peak (21.5 min) showed a ratio m/z 711 can be characterized as a substance-type procyanidin A2.

3.2 Validation of the method

3.2.1 Linearity, LOQ and LOD

The calibration curve was linear in the range 10–120 $\mu\text{g/mL}$ for both standard (PB2 and EPC). The results of the calibration curves have good linear correlation was found between the peak area (y) and the concentrations (x) ($r>0.9962$) of PB2 and EPC over the range of concentrations tested. At least 99.24% of the data variability is explained by the adjusted regression ($R^2>0.9924$). And the representative linear equation was $y = 78791.93x + 89780.78$ ($n=4$; $r=0.9962$) for PB2 and $y = 108177.24x + 137811.5$ ($n=4$, $r=0.9964$) for EPC, and the RSD of the slope was 1.46 and 4.78%, respectively.

A value of regression coefficient close to unity is not necessarily the outcome of a linear relationship, and in consequence the test for the lack of fit must be applied. This test evaluates the variance of the residual values.

The ANOVA results for PB2 and EPC indicated that the curve is linear, with no lack of fit in the linear regression (p -value 0.9618 for PB2 and 0.9466 for EPC).

The LOD was 1.36 $\mu\text{g/mL}$ for PB2 and 2.18 $\mu\text{g/mL}$ for EPC. The LOQ was 4.12 $\mu\text{g/mL}$ for PB2 and 6.61 $\mu\text{g/mL}$ for EPC. These values clearly indicate that the analytical method

has good sensitivity, and is sufficient to determine the two compounds evaluated from catuaba bark. The LOD is defined as the smallest amount of analyte in a sample that can be detected but not necessarily quantified as an exact value [23]. The LOQ of an individual analytical procedure is the smallest amount of analyte in a sample that can be quantitatively determined with suitable precision and accuracy [23].

3.2.2 Precision

The precision of the method was evaluated by the repeatability and intermediate precision. The repeatability and intermediate precision were determined for evaluation of the precision and the RSD of six determinations at 100% of the test concentration. Repeatability showed an RSD from 3.23% and 2.97% for PB2 and EPC, respectively. Intermediate precision was evaluated on three different days and also by different analysts. The peaks showed an RSD range from 1.02 to 4.28% for PB2 and 2.97 to 4.48% for EPC, including analyses done on three different days. The RSD values of areas obtained by different analyst were 1.89 and 2.83% for the two substances. These data were considered satisfactory, and in accordance with the regulation (ICH and RE 899). ANOVA showed no statistical difference between the areas of peaks obtained on different days, confirming acceptable precision.

3.2.3 Accuracy

Accuracy, expressed as the percentage of the analytes recovered by the assay, was determined by the preparation of a simulated sample containing a known quantity of PB2 and EPC. The mean recoveries of an added standard solution at three levels of concentration were $95.07 \pm 3.58\%$ and $89.67 \pm 3.97\%$ of PB2 and EPC, respectively. These results are in good agreement with the results (80–120%) required for complex matrices [23].

3.2.4 Robustness

The results of one-way ANOVA showed no significant difference in peak area of the PB2 and EPC, considering the variation in the mobile phase flow of 0.400 mL/min to 0.395 and 0.405 mL/min. Thus, the method was robust for both substances under the conditions used. The evaluation of robustness should be included during the development of the HPLC method, and it should show the reliability of analyses with respect to deliberate variations in method parameters [23].

3.3 Stability

To demonstrate the stability of working solutions during analysis, the solutions of EAF extract were analyzed over a period of 0 to 42 days while they were stored in a refrigerator and also at room temperature. The seven peaks monitored are presented in Fig. 2.

The mean concentrations of the refrigerated samples, which contained substances such as PB2, catechin and chlorogenic acid, and cinchonains IIb, did not differ significantly ($p>0.05$) by Tukey test until day 21. EPC was stable for 7 days, and cinchonains Ia, Ib, and IIa were stable for 3 days.

For the samples stored at room temperature, the concentrations of cinchonains Ia and Ib were stable for 3 days, cinchonains IIb and IIa were stable for 7 days, and PB2 and the mixture of catechin and chlorogenic acid for 14 days. EPC and peak 7 did not show a significant difference ($p>0.05$) for 42 days.

The sample exposed to direct sunlight (6 h) remained stable for up to 2 h, and therefore direct exposure of these solutions to sunlight must be avoided. The sample can be kept in ambient indoor light and in a refrigerator for a short period of time (up to 3 days).

After the stability period (3 days) of the sample solution, a new peak began to appear (after peak #7, Fig. 2) and the chromatogram profile changed. This new peak was probably from substance 6 (mixture of cinchonains Ia and Ib). This was demonstrated by samples of both standard substances stored in a refrigerator (5 months), which showed the same peak when they were analyzed by HPLC (data not shown).

T. catigua contains many substances with reactive groups, such as hydroxyl and carbonyl groups, of which many atoms can form hydrogen bonds, broken links and other interactions. These results are compatible with the high reactivity of the compounds present in the extract, and their easy and rapid oxidation to originate new structures such as quinones. Castañeda-Ovando et al. [25] proposed a free-radical mechanism for the semiquinone stabilization formed from cyanidin oxidation (anthocyanin). The structural similarity between the substances makes it possible that a similar mechanism acts on cinchonains. Another possible explanation for the instability of the analytes, including cinchonains Ia and Ib, may be, at least in part, the presence of the 3-hydroxyl group of the C-ring. The elimination of the hydroxyl group as water gives a C2-C3 double bond which leads to conjugation to the oxygen at position 1, and thus results in a more stable compound.

3.4 Quantification of PB2 and EPC and identification of proanthocyanidins

The contents of PB2 and EPC in the EAF samples were determined as 18.57 and 30.99 mg/g, and the concentrations in the analytical solution were 8.47 and 11.99 $\mu\text{g/mL}$, respectively. It was possible to identify phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols in the chromatogram, from the standard isolated from the plant. These were quantified by adding different concentrations of the internal standard to the semipurified EAF fraction. The decision to use the internal standard is justified by the need to quantify the known major compounds present in the chromatographic profile. Therefore, because sufficient quantities

of all the isolated compounds were not available, PB2 and EPC were used as external standards, and gallic acid as the internal standard.

The retention time of gallic acid was 13.49 min, which proved to be adequate because it was not eluted with any other compound. The calibration curve was linear in the range chosen (2-12 µg/mL). The representative linear equation was $y=127699x+40653$ ($n=3$; $r=0.9979$). The quantification of the other compounds is presented in Table 2.

Table 2. Concentrations of different compounds present in EAF of *Trichilia catigua* in relation to the internal standard, gallic acid.

Compound	Concentration
	(µg/mL) of gallic acid $\pm$ SD; RSD%
2 (mixture of catechin and chlorogenic acid)	6.43 ± 0.14 ; 2.20
3 (cinchonain IIb)	18.70 ± 0.64 ; 3.42
4 (cinchonain IIa)	21.94 ± 0.46 ; 2.09
6 (mixture of cinchonains Ia and Ib)	30.41 ± 0.88 ; 2.92
7 (unknown substance)	8.05 ± 0.31 ; 3.89

4 Concluding remarks

The method was validated and proved to be simple, sensitive, accurate, linear, precise, reproducible, repeatable, robust, and stable, indicating that the developed HPLC-PDA method was well established. The results demonstrate that this method could be readily utilized as a suitable quality-control method for the quantification of proanthocyanidins in *Trichilia catigua* semipurified extract, development of formulations, determine the dissolution profile, as well as evaluating the intestinal permeation profile.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian Agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação Araucária and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if) for their financial support. We are grateful to CAPES for fellowships awarded to R. Longhini and T. Klein. We are grateful to J.C. Tomaz and J.N. Mendonça for help in mass spectra analysis. Thanks are due to Dr. Janet W. Reid, JWR Associates, Trumansburg, New York, for English revision.

5 References

- [1] WHO, The world medicines situation 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges, 2006, http://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch18_wTraditionalMed.pdf (accessed 10.07.11).
- [2] Marques, L. C., *Racine* 1998, 8, 8-11.
- [3] Pizzolatti, M. G., Venson, A. F., Smânia, A. J., Smânia, E. F. A., Braz-Filho, R., *Z Naturforsch.* 2002, 57, 483-488.
- [4] Mendes, F. R., Calini, E. A., *J. Ethnopharmacol.* 2007, 109, 493-500.
- [5] Antunes, E., Gordo, W. M., De Oliveira, J. F., Teixeira, C. E., Hyslop, S., De Nucci, G., *Phytother. Res.* 2001, 15, 416-421.
- [6] Viana, A. F., Maciel, I. S., Motta, E. M., Leal, P. C., Pianowski, L., Campos, M. M., Calixto, J. B., *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2009, 2011, 120820.
- [7] Quintão, N. L. M., Ferreira, J., Beirith, A., Campos, M. M., Calixto, J. B., *Phytomedicine* 2008, 15, 245-252.
- [8] Campos, M. M., Fernandes, E. S., Ferreira, J., Santos, A. R., Calixto, J. B., *Psychopharmacol.* 2005, 182, 45-53.
- [9] Chassot, J. M., Longhini, R., Gazarini, L., Mello, J. C. P., Oliveira, R. M. W. de, *J. Ethnopharmacol.* 2011, 137, 1143-1148.
- [10] Bonassoli V. T., Chassot, J. M., Longhini, R., Milani, H., Mello, J. C. P., Oliveira, R. M. W., *J. Ethnopharmacol.* 2012, 143, 179-184.
- [11] Brighente, I. M. C., Dias, M., Verdi, L. G., Pizzolatti, M. G., *Pharm. Bio.* 2007, 45, 156-161.
- [12] Tang, W., Hioki, H., Harada, K., Kubo, M., Fukuyama, Y., *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 2010-2013.
- [13] Beltrame, F. L., Rodrigues Filho, E., Barros, F. A. P., Cortez, D. A. G., Cass, Q. B., *J. Chromatogr. A* 2006, 1119, 257-263.
- [14] Burkill, H. M., *The useful plants of West Tropical Africa*, Kew, Royal Botanic Gardens, Richmond, 1997.
- [15] Resende, F. O., Rodrigues Filho, E., Luftmann, H., Petereit, F., Mello, J. C. P., *J. Braz. Chem. Soc.* 2011, 22, 2087-2093.
- [16] Lopes, G. C., Bruschi, M. L., Mello, J. C. P., *Chromatographia* 2009, 69, S175-S181.
- [17] Cai, Y., Yu, Y., Duan, G., Li, Yan., *Food Chem.* 2011, 127, 1872-1877.
- [18] Klein, T., Longhini, R., Mello, J. C. P., *Talanta* 2012, 88, 502-506.
- [19] Nugroho, A., Lim, S. C., Lee, C. M., Choi, J. S., Park, H. J., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, 61, 247-251.

- [20] Irakli, M. N., Samanidou, V. F., Biliaderis, C. G., Papadoyannis, I. N., *J. Sep. Sci.* 2012, 35, 1603-1611.
- [21] Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P., *Quím. Nova* 2007, 30, 374-381.
- [22] Brown, P. N., Chan, M., Betz, J. M., *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 397, 1883-1892.
- [23] International Conference on Harmonisation, ICH Topic Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology. Available from: <http://www.ich.org>. 2005 (accessed 10.11.10).
- [24] Brazil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE 899/2003-ANVISA. http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. 2003 (accessed 10.11.10).
- [25] Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A., *Food. Chem.* 2009, 113, 859-871.

Supporting Information

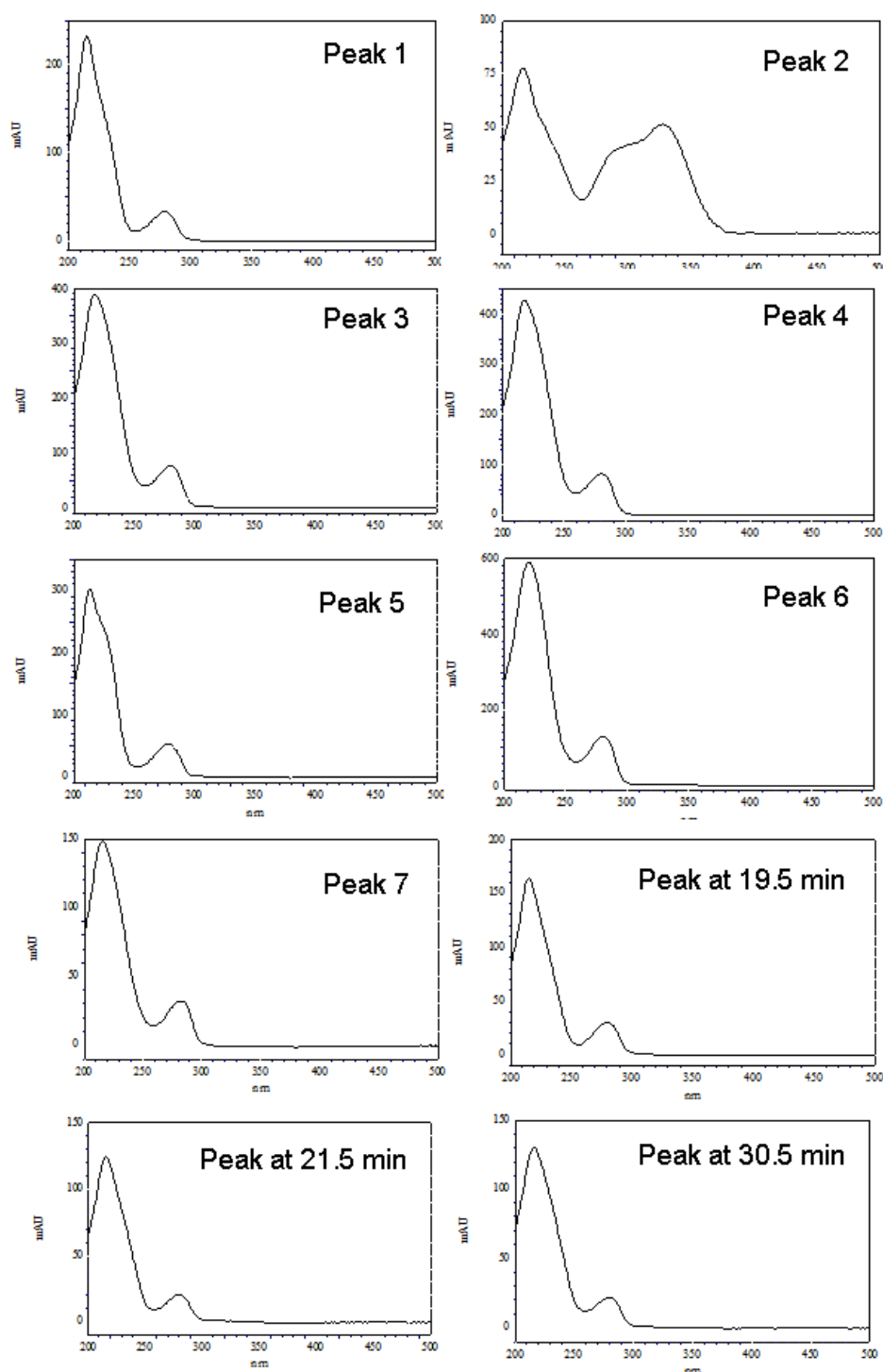


Figure S1. UV/Vis spectrum obtained from the HPLC chromatogram peak eluting at 16.5 min (peak 1 – procyanidin B2), 20.2 min (peak 2 – chlorogenic acid and catechin), 23.6 min (peak 3 – cinchonain IIb), 26.6 min (peak 4 – cinchonain IIa), 29.3 min (peak 5 – epicatechin), 33.9 min (peak 6 – cinchonain Ia and Ib), 39.6 min (peak 7), 19.5 min, peak 21.5 min, and 30.5 min.

CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO DE EXTRATOS POR *SPRAY DRIER* E DE COMPRIMIDOS CONTENDO CATUABA

Este capítulo consiste no desenvolvimento de extrato seco por aspersão (*spray drying*) contendo fração acetato de etila (FAE) e obtenção de forma farmacêutica comprimido. Este artigo será submetido ao periódico científico.

PREPARATION OF TABLETS CONTAINING A SPRAY DRIED EXTRACT OF *Trichilia catigua*

R. LONGHINI^a, T. KLEIN^a, M.L. BRUSCHI^a, J.C.P. de MELLO^a

^a Universidade Estadual de Maringá – UEM, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Maringá, PR, Brazil

ABSTRACT

The objective of this study was to develop tablets containing spray dried extract of *Trichilia catigua* prepared by direct compression (DC). For the success of DC, powder must present good flow and compactation properties. Therefore, eleven dried extracts semipurified extract of *Trichilia catigua* barks were produced and submitted to analysis of morphology, particle size and size distribution, and powder density (bulk density and tapped density). The Carr index, Hausner ratio, and cotangent of the angle α were determined. Thereafter, the better dried extracts were used to prepare tablets, L10 and L11. The tablets were evaluated for average weight, hardness, and friability tests, the results are in accordance with specified by the pharmacopoeia. The release profiles were determined, and the dissolution kinetics was studied. The results indicated that tablets released procyanidin B2 and epicatechin by 2 h, depending on the formulation it was influenced by physical and chemical characteristics.

Keywords: *Trichilia catigua*, spray-dried extracts, tablets, direct compression

1. Introduction

The administration of therapeutic agents requires their incorporation into a pharmaceutical dosage consisting of active compounds and pharmaceutical excipients. The choice of the most appropriate dosage form for an herbal medicine should consider the safety and efficacy of the active component ensuring its quality, stability problems, among others (SONAGLIO et al., 2010).

Tablets are solid dosage forms and contain the dose of active components in their individualized form, obtained by compacting of solid bulk materials. For production of herbal tablets is need of special care, mainly due to the hygroscopic behavior of vegetables extracts (SONAGLIO et al., 2010).

Direct compression is desirable to drug manufacturers because the powder does not require further processing physical or chemical to produce tablets, and is economically viable, also improves process performance and facilitates the control (SOLLOHUB & CAL, 2010).

The drying operation requires the removal of the liquid phase until residual values. Among the most popular techniques is spray-drying, which increases the specific surface by spraying the feed solution, thereby increasing the contact area with the drying fluid (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010; SONAGLIO et al., 2010).

Spray drying has become popular in this field due to the ability to dry even the most thermolabile fluid extracts without decomposition of their components, resulting in a product with better properties when compared to the lyophilization, for example, and produces homogeneous powders (SOLLOHUB & CAL, 2010), allows generation of spherical particles, with appropriate process parameters, and have the advantage offering similar adhesion conditions to every active particle attached to the surface but also non-spherical particles might be obtained, spray dried particles are usually considered as good flowing (LITTRINGER et al., 2012). Sometimes, due to the little diameter they flow with great difficulty.

Dried extracts have the advantage of greater chemical, physical-chemical and microbiological stability, easier standardization, higher concentration of active compounds and higher processing capacity in different types of solid dosage forms (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010).

The technique of cospray drying of active substances with excipients is to help the drug's aqueous solubility; about 40% of new active substances have low solubility in water, and high lipophilicity, difficulting the administration and had low bioavailability (SOLLOHUB & CAL, 2010).

The *Trichilia catigua* is recognized in folk medicine to treat fatigue, stress, impotence and memory deficits (PIZZOLATTI et al., 2002). Additionally, the scientific literature shows activities such as prolonged and sustained relaxation in the corpus cavernosum (ANTUNES et al., 2001), reversal of ventricular fibrillation (PONTIERI et al., 2007), anti-inflammatory activity (BARBOSA et al., 2004), antidepressant effect (CAMPOS et al., 2005; CHASSOT et al., 2011; BONASSOLI et al., 2012), antioxidant activity (TANG et al., 2007; RESENDE et al., 2011; CHASSOT et al., 2011), bacteriostatic (PIZZOLATTI et al., 2002) and trypanocidal activity (PIZZOLATTI et al., 2003), thus constituting a plant with therapeutic potential.

In its chemical composition can highlight tannins, alkaloids, flavonoids and sesquiterpenes (BURKILL, 1997; BRAZ et al., 2012). For the species *T. catigua* some compounds were isolated and elucidated. Among them may be mentioned: epicatechin, procyanidins B2, B4 and C1, cinchonans Ia, Ib, Ic, Id; IIa and IIb, and catiguanin A and B (PIZZOLATTI et al., 2002; BELTRAME et al., 2006; TANG et al., 2007; RESENDE et al., 2011).

Recently, Longhini et al. (2013) have developed an analytical method by high performance liquid chromatography (HPLC) to quantify procyanidin B2 (PB2) and epicatechin (EPC) and other phenylpropanoids present in the extract.

However, the semipurified fraction of *T. catigua* (EAF) is not readily soluble in water, which can compromise the pre-clinical studies and the absorption. In addition is highly hygroscopic and electrostatic. Therefore, the objective of this study was to develop dry extracts of the EAF with technological characteristics suitable for use in obtaining tablets containing high levels of this fraction.

2. Experimental

2.1 Materials

Colloidal silicon dioxide (CSD) (Aerosil® 200, Degussa, São Paulo, Brazil), maltodextrin (MALT) (Aldrich, St. Louis, MO, USA), microcrystalline cellulose (Avicel PH 101, FMC BioPolymer, Philadelphia, PA, USA), magnesium stearate (Otto Bärlocher, Germany), lactose spray-dryer (LACT) (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), methanol, acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) (J.T. Baker, Mexico City, Mexico), ultrapure water obtained from Milli-Q 95 (Millipore, Billerica, MA, USA) apparatus were used.

2.2 Preparation of *T. catigua* semipurified extract (EAF)

The barks of *T. catigua* used in this study were obtained in Caetité, Bahia, Brazil, in May 2011 and a voucher specimen was deposited in the Herbarium of Universidade Estadual de Maringá (HUEM#19434), Maringá, Paraná, Brazil, and identified by Dr. Cássia M. Sakuragui. The semipurified extract was prepared follow Chassot et al. (2011) and Longhini et al. (2013).

The acetone *T. catigua* extract was obtained by turbo-extraction (Ultra-Turrax, model UTC115KT, Wilmington, USA) of the powdered barks, using acetone-water solution (70:30, v/v) as solvent mixture, for 15 min ($t < 40$ °C). The solution produced were filtered, concentrated under reduced pressure (Büchi Rotavapor R-153, Switzerland), and lyophilized (Christ Alpha 1-4 LD) to yield a crude extract (CE). 50 g of CE were resuspended in water (0.5 L) and partitioned with ethyl acetate to obtain the semipurified ethyl-acetate fraction (EAF; 13.41 g).

2.3 Preparation of *T. catigua* spray-dried extracts

All extracts (L1-L11) were dried a spray dryer (model LM MSD 1.0, Labmaq, Brazil), with two component nozzle and co-current flow, under following operating conditions: inlet

temperature, 160 °C; feed rate 6 mL/min, air flow 30 mL/min and air pressure 3 bar. All extract contained 70% EAF and 30% mixture excipients (see Table1).

The extracts were prepared according to a 2x3 factorial design, evaluating two factors: (1) percentage of total solids, with 2 levels of 10 and 20%; and (2) proportion of excipients CSD:MALT, with 3 levels: 25:75, 50:50 and 75:25, shown in Table 1, constituting samples batches L1-L6.

Table 1. Factors and levels for the 2x3 factorial design for preparation of *T. catigua* spray-dried extracts.

Level	Factor	
	x_1	x_2
1	10	25:75
2	20	50:50
3	-	75:25

x_1 = percentage of total solids, x_2 = proportion of excipients CSD:MALT

Others batches (L7-L11) of extract are produced in the same conditions above, but with mixtures of CSD:LACT (same factor x_2), and 20% total solids.

The total powder obtained was weighed and the percentage over the initial amount of solids in the dispersion was calculated the yield of microparticle powder.

2.4 Morphology by scanning electron microscopy (SEM)

The morphology of extracts was investigated using scanning electron microscopy (SEM) (SHIMADZU SS-550). Prior to investigation, the samples were fixed in a double-sided tape on a metallic support and coated with gold. The samples were examined at 1500x and 3000x magnifications.

2.5 Particle mean size and size distributions

The determination of the particle mean size and size distribution in each dried extract was performed by capturing images through an optical microscope Kozo Optics®, using the program Image Pro Plus ® for quantification. The dried extracts were placed on a glass slide and examined for each field; performed a size distribution of microparticles, using the Feret diameter (BARBER, 1993). Were measured about 800 to 1000 particles, and the size distribution thereof was determined.

2.6 Moisture content of spray dried powders

The moisture content was determined by gravimetric method, on an analytical balance Ohaus (Model MB 35, TOLEDO) with infrared drying system, using 1 g samples of powders were dried at 105 °C for 30 min with an interval of 10 min between each determination. The result expressed as the mean of three determinations (CARVALHO et al., 1996).

2.7 Determination of bulk and tapped densities of the extracts

Bulk density (d_o) and tapped density (d_t) were measured indirectly through the apparent volume, as described in the European Pharmacopoeia (2009), and used an automatic compactor (Volumeter Tapped, model SVM 12, ERWEKA, Germany). The bulk density was determined by slowly pouring the 2 g samples into a 10 mL graduated glass cylinder. The bulk density was measured by the direct relation between the weight (g) and the apparent volume (mL). The volume was registered after 1250 taps (V1250). Repeat 1250 taps until volume difference are minor 0.1 mL. The tapped density (g/mL) was calculated from the initial mass (g) and the final volume of solids (mL) ($n = 3$).

2.8 Determination of Hausner ratio and Carr's Index

The Hausner ratio (HR) is the relationship between d_t and d_o , and can be used to evaluated the properties of powder flow. The Carr index (CI%) was calculated using bulk and tap densities data, expressed as a percentage (STANIFORTH et al, 2005):

$$\text{Carr index (\%)} = (\text{Tapped density} - \text{bulk density}) / \text{Tapped density} \times 100\%$$

2.9 Analysis of the angle of repose

In determination of the angle of repose used a simple apparatus containing a funnel, support, millimeter paper and ruler. This parameter was analyzed in triplicate, for lot L10 and L11. The powder was allowed to flow freely through a hole on a flat surface, forming a cone, where the base angle of this cone is the angle of repose, that is, the angle whose tangent is the ratio between the height (H) and radius (R) of the cone formed (PORTUGUESE PHARMACOPOEIA, 2002).

$$\tan \alpha = \frac{H}{R}$$

2.10 In vitro antioxidant activity

The free radical scavenging activities of the *Trichilia catigua* dried extracts were measured by using 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH); according to Chassot et al. (2011). Solutions of EAF and dried extracts were compared with standard Trolox® (6-

hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma) and Vitamin C (ascorbic acid, W.P. Co. Ltd., China) at different concentrations (1–10 µg/mL) were dissolved in 3 mL of methanol and then added to 375 µL methanolic solution of free radical DPPH (1 mM). After 30 min, the absorbance was read spectrophotometrically (Shimadzu UV/vis PC-1650, Japan) at 517 nm against a blank (2 mg of butylated hydroxytoluene-BHT, dissolved in 4 mL of methanol and added 500 µL of the free radical DPPH solution).

The capability to inhibit free radicals or to scavenge the DPPH radical was calculated using the following equation:

$$I\% = \frac{(A_b - A_s)}{A_b} \times 100$$

where I% is the capability to scavenge the DPPH radical or to inhibit free radicals, A_b is the absorbance of the negative control reaction (containing all reagents except the extracts), and A_s is the absorbance of the sample. The sample concentration providing 50% inhibition (IC_{50}), concentration required to inhibit DPPH radical formation by 50%, was calculated from the graph of I% against sample concentration. Tests were carried out in triplicate. Data are presented as IC_{50} (µg/mL).

2.11 Preparation of tablets by direct compression

Tablets containing 200 mg of EAF in a total weight of 400 mg were prepared. EAF and excipients were gently milled using a mortar and pestle. Tablets were prepared at a laboratory scale, were compressed in a tableting machine (mod. Compact 10, FELLIC, Brazil), using a punch 10 mm flat punches. Samples from two different batches were filled individually to the compression chamber and the compression force was maintained the same for both formulations. The compositions and sample designations of the tablets are shown in Table 2.

Table 2. Qualitative and quantitative composition of the formulation of tablets (all values in % w/w).

Composition	Formulation	
	A	B
Spray-dried extract	71.5 of L10	71.5 of L11
Microcrystalline cellulose	26	26
Magnesium stearate	2.5	2.5

2.12 Evaluation of tablets

The macroscopic characteristics of the tablets were observed in relation to the geometric shape, appearance and color.

The properties (hardness, friability and disintegration time) of the tablets were evaluated according to Brazilian Pharmacopoeia (2010) and United States Pharmacopoeia (2009).

Hardness was determined using 10 randomly selected tablets from each formulation (A and B) (Hardness tester TBH-30; Erweka, Germany).

Friability was determined on 20 tablets by measuring the average weight losts after 100 revolutions (5 min) in a friabilometer (ÉTICA MD48, Brazil).

Disintegration time was measured in disintegration tester (ÉTICA, Brazil) and the test medium used was water at 37° C, six tablets of each formulation were randomly selected and tested. The time of disintegration was noted.

2.13 Determination of EAF content in tablets

For determination of the tablets was weighed and triturated three tablets, and a quantity of powder, equivalent to 5.0 mg of EAF, was weighed and followed the protocol in according Longhini et al. (2013), where this quantity was dissolved in 1 mL of 20% aqueous methanol, and was eluted through the SPE cartridge (SPE, Strata C18-E, Phenomenex®) pre-conditioned with methanol and water, and the volume was completed to 10 mL in a volumetric flask with 20% aqueous methanol. The samples were analyzed by HPLC, second Longhini et al. (2013). Briefly, were performed in a Thermo® HPLC equipped with a PDA (photo diode array) spectrophotometric detector module (Model Finnigan Surveyor PDA Plus Detector), integral pumps and degasser (Finnigan Surveyor LC Pump Plus), autosampler (Finnigan Surveyor Autosampler Plus) equipped with a 10 µL loop and controller software (Chromquest), column Phenomenex Luna PFP(2) 100 Å (250 x 4.6 mm, 5 µm) and guard column Phenomenex Luna PFP (2) same material. A gradient program, as follows: 0 min, 30% Phase A; 36 min, 40% Phase A; 38 min, 30% Phase A, and continued at 40 min, where the phase A is methanol-acetonitrile (75:25; v/v) containing 0.05% TFA, and Phase B: water with 0.05% TFA, at a flow rate of 0.4 mL/min, and the detection wavelength was set at 280 nm. Procyanidin B2 (PB2) and epicatechin (EPC) standard substances reference were used to identify the components in the EAF.

2.14 Release profiles and dissolution kinetics

In vitro release tests of procyanidin B2 (PB2) and epicatechin (EPC) from spray-dried extract and tablets were carried out in sink conditions on a USP Apparatus 4 (flow cell dissolution apparatus, SOTAX Smart AT7®, USA), with cells having an internal diameter of

22.6 mm. During testing, the dissolution medium was pumped through each cell. For analysis of dissolution drying extracts 200 mg were placed between two portions of glass beads (1 mm in diameter) and tablets have been deposited on the holder, providing a medium without turbulence. Millipore filters (5 mm) were used in the filter-head in each experiment. The dissolution media were heated to 37 °C, and a flow rate of 8 mL/min was used for the evaluation.

The dried extracts obtained in batches L10 and L11 were submitted to analysis of dissolution test using water as dissolution medium. The tablets were subjected to dissolution medium water (WATER) for two hours, in order to reduce interferences, and also were submitted to the simulated gastric intestinal fluid (SGI), exposing 0.1 Mol/L hydrochloric acid (HCl, for two hours) and phosphate buffer pH 6.8 (for one hour), according to USP (2009).

For the dissolution medium SGI, during a dissolution run, the dissolution medium was changed from 0.1 Mol/L HCl to phosphate buffer to a pH of 6.8, to mimic the pH of the GI tract. In the first 120 minutes was used 0.1 Mol/L HCl as dissolution medium. After there was automatic exchanged the dissolution medium for phosphate buffer pH 6.8 for 60 min rest. At each time interval were collected 10 mL of the sample for HPLC analysis, to 1 mL of each sample were added 200 µL of methanol and the solution was passed through the cartridge in solid phase extraction, the samples were then assayed by validated method HPLC (LONGHINI et al., 2013).

To elucidate the release mechanism of the dried extract and each tablet formulation, the dissolution data were analyzed using first-order equations with linear regression, been considered the proximity to the linearity, in other words, the coefficient of determination closest 1.

2.15 Statistical analysis

The software Statistica® 7.0 was used for calculations. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), the results were considered significant when the p-value was less than 5% ($p < 0.05$), followed by the Tukey test for multiple comparisons.

3. Results and Discussion

First, the batches L1-L6 were obtained (Table 3), following predetermined factorial design (Table 1). The drying conditions were based on Pérez-Serradilla and Luque de Castro (2011) who used the maltodextrin and aerosil as drying expicients (25:75, w/w), to obtain an extract from wine lees rich in phenol compounds; however the inlet temperature was increased.

Considering the moisture content of the extracts and the PB2 and EPC concentrations, both have significant difference at least in one combination of factor levels.

Batch L6 showed the lowest moisture content and showed the highest concentrations of PB2 and EPC.

Comparing the yield of batches of factorial desing, it can be concluded that the best was also batch L6, therefore, this batch was used in the following experiments.

The flow of L6 (CSD:MALT, 75:25, w/w) was first visually evaluated, and did not show an adequate flow thus, the new extracts were produced containing 20% of total solids, of which 70% is EAF and other 30% remained the same proportions of excipients of the factorial desing, but replacing the maltedextrin by lactose in order to improve the flow. The new extracts (batches L7-L11) produced and their respective proportions are shown in Table 3.

In general, all batches produced by spray drying were values of loss on drying less than the EAF (6.61%, SD=0.18), indicating that the spray drying process is suitable for reducing the water content present in the extracts, reducing degradation / oxidation, caused by free water.

Batch L11 show the lowest values of loss on drying and the values were statistically different (Tukey' test).

The concentration of PB2 and EPC on the dried extracts between 80 and 120%, corresponding to 26.91-40.38 and 14.93–22.39 µg/mL for PB2 and EPC, respectively, when considering the EAF as reference. Based on the concentrations in EAF, all extract dried are inside of the range, except the concentration of PB2 for sample L8 and the concentration of EPC for L6, which are 120.01 and 120.44%, respectively. Considering all the batches produced, it is verified that no statistical difference between the EAF and the batches L4, L7, L9 and L11 for PB2. For EPC, lots L5 and L6 are statistically different from the others.

The concentration of solids in the liquid supply has an impact on the efficiency of the drying operation, the lower the solid contents consumes more energy for remove the solvent, thus operate with the maximum possible of solids. Moreover, the solid contents influences the particle size and density of the final product due to the increase in viscosity resulting in higher density powders (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010).

Considering these influences and results, the batches obtained with smaller total solids content (10%) presented lower incomes, so chose to work with higher solids content (20%). Was not tested solids content exceeding 20% because the viscosity of the solution was high already.

The EAF has been biological studied and the results demonstrated an antidepressant-like effect and improvement of memory in mice (CHASSOT et al., 2011) and subchronic administration promoted antidepressant-like effect in mice accompanied by an increase in cell proliferation in the dentate gyrus of the hippocampus (BONASSOLI et al., 2012), for oral administration. Considering these activities is promising that the administration

of EAF as tablets is could be feasible, but EAF (semipurified fraction of acetone:water extract from the barks of *T. catigua*) characteristics are not favorable technologically, because it has high hygroscopicity, solubility difficult, electrostatic and poor flow.

Thus, the extracts prepared by spray drying showed to be a good alternative to the observed problems of EAF, as during drying can be used drying excipients, which together improve the technological characteristics, like flow, hygroscopicity and solubility.

In order to evaluate if technological process could modify the biological activities of the extracts, their antioxidant activity was tested. This activity has been reported in the literature for extract, fractions and compounds isolated from *T. catigua* (CHASSOT et al., 2011; RESENDE et al., 2011).

The antioxidant activity was tested for batches L6-L11 (Table 4). All batches exhibit good activity with IC_{50} but lower than Trolox® (6.89 $\mu\text{g/mL}$), a substance known as an efficient antioxidant activity. The batches L6, L7, L9, and L10 showed higher activity than vitamin C (4.17 $\mu\text{g/mL}$). The results are in agreement with the findings of Chassot et al. (2011). The antioxidant activity of dried extracts was also better than the EAF. Although Georgetti et al. (2008) did not obtain similar results, after spray drying of a soybean extract, reportin a loss in antioxidant activity and degradation of phenolic compounds, this was not observed in this study.

Table 3. Composition and characterization of all batches obtained of dried extracts of barks semipurified extract of *Trichilia catigua*.

Batches	Proportion CSD:MALT	Proportion CSD:LACT	Total solids (% w/w)	Yield (%, w/w)	Moisture (%, w/w) mean $\pm$ SD	Particle size $\mu\text{m} \pm \text{SD}$	Contents ($\mu\text{g/mL}$) mean $\pm$ SD	
							PB2	EPC
L1	25:75	-	10	70.5	5.62 ± 0.06	3.94 ± 1.77	37.21 ± 0.35	17.83 ± 0.40
L2	50:50	-	10	56.77	4.54 ± 0.09	3.28 ± 1.55	37.47 ± 0.46	21.57 ± 1.51
L3	75:25	-	10	46.06	5.58 ± 0.14	3.79 ± 1.83	36.14 ± 0.98	17.27 ± 0.46
L4	25:75	-	20	67.47	4.30 ± 0.05	3.52 ± 1.87	37.85 ± 1.32	18.44 ± 0.22
L5	50:50	-	20	69.45	4.98 ± 0.02	4.06 ± 1.87	36.54 ± 0.31	19.09 ± 0.94
L6	75:25	-	20	70.8	3.51 ± 0.06	3.27 ± 1.72	38.89 ± 0.69	22.77 ± 0.30
L7	-	100:00	20	76.15	3.45 ± 0.15	3.74 ± 1.91	34.79 ± 0.17	17.79 ± 0.55
L8	-	00:100	20	71.28	3.77 ± 0.10	3.54 ± 2.25	40.53 ± 0.44	18.82 ± 0.23
L9	-	25:75	20	68.65	4.48 ± 0.13	3.24 ± 1.86	37.03 ± 0.66	17.00 ± 0.72
L10	-	50:50	20	74.37	3.23 ± 0.15	3.99 ± 2.67	38.41 ± 0.79	17.94 ± 0.37
L11	-	75:25	20	73.06	2.89 ± 0.06	3.56 ± 1.99	34.82 ± 0.93	17.12 ± 0.53

CSD = colloidal silica dioxide; MALT = maltodextrin; LACT = lactose; SD = standard deviation, PB2 = procyanidin B2, EPC = epicatechin

Table 4. Values of bulk density (d_0), tapped density (d_f), Carr's Index (CI), Hausner ratio (HR), and activity antioxidant (IC_{50}) for the spray dried extract L6-L11 batches.

Batches	d_0 (g/mL)	d_f (g/mL)	CI (%)	HR	IC_{50} (μ g/mL)
L6	0.296	0.401	26.08	1.353	3.85 ± 0.15
L7	0.349	0.479	27.12	1.372	4.01 ± 0.16
L8	0.307	0.434	29.41	1.417	4.34 ± 0.16
L9	0.257	0.379	32.05	1.472	3.70 ± 0.19
L10	0.334	0.411	18.75	1.231	3.84 ± 0.12
L11	0.384	0.463	16.98	1.204	4.63 ± 0.15
EAF	0.204	0.314	35.00	1.538	4.47 ± 0.07

The characterization of the powders of batches chosen, batches L6 to L11, was performed by the evaluation of bulk density (d_0), tapped density (d_f), Carr's Index (CI) and Hausner ratio (HR) and the results are shown in Table 4.

The results of the CI (Table 4) indicate that the dried extracts L10 and L11 have a favorable to tolerable flow, while the fraction EAF is very weak/poor, where CI values between 5% and 15% indicate excellent flow; values between 12% and 16% represent good flow, and a favorable to tolerable flow has values between 18 and 21%. On the other hand, values of 23% to 35% are attributed to materials whose flow is poor and very poor for those between 33% and 38% (WELLS, 2005). The Tukey's test confirmed that there no statistically significant difference ($p > 0.05$) between the means of the determinations of the CI for both. The CI for powders of samples L6 to L9 indicated a poor flow.

The only batches that had values of HR less than 1.25 were L10 and L11. A similar index is HR, where values below 1.25 indicate good flow and greater than 1.25 indicates poor flow (WELLS, 2005) and related the cohesion and adhesion forces between particles, where flow and cohesive capacity are inversely proportional (VILLANOVA et al., 2011).

The CI and HR are indirect indicators used to evaluate the compactability characteristics of particulate materials. They provide information about the capacity of packaging of powders or granules, considering that the proper values can indicate packaging materials with characteristics more stable, influencing positively in the reproducible filling of the compression chamber and the compression process (WELLS, 2005). The CI can to predict the flow properties and give an indication of the ability to produce a uniform blend (WELLS, 2005; VILLANOVA et al., 2011).

According to the results it is possible to conclude that L10 and L11 have flow properties and compaction behavior suitable for pharmaceutical applications. Therefore, the compressibility percentage indirectly gives an idea of the cohesion, size uniformity, and surface area of powders or their mixtures (STANIFORTH et al., 2005).

To confirm the results obtained by the CI was carried angle of repose, for batches L10 and L11, according to the results obtained the L10 result of 33.57°, classified as flow tolerable, since the L11 obtained angle of repose of 29.13 and is considered a good flow. Thus, tablets were made with batches L10 and L11, due to better flow characteristics.

The density of EAF was 0.204 g/mL following the process of spray-dryer increased density of the extracts (see Table 4), providing more easily weighing.

The simplest way to reduce the time and costs in the production of dosage forms is the minimization of the steps involved before compression. The direct compression involves only the powder mixture followed by compression. How it does not involve heat and water, product stability can be increased (WELLS, 2005), this problem has been reported for this fraction (LONGHINI et al., 2013), than, in solution, acquires strong orange coloration with time.

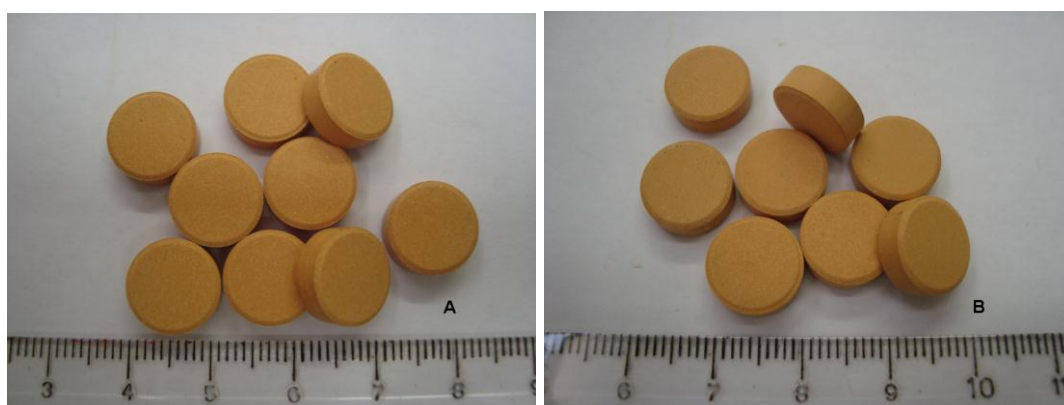
First, was tested a direct compression containing only the dry extract of batches L10 and L11 at a dose of 200 mg. After the direct compression, the average weight was evaluated, which showed variation lower than 1.6% for both samples. The dimensions of the tablets were 11x3 and 11x2 mm (diameter x height) for L10 and L11, respectively. The disintegration time was of 18 and 14 min for L10 and L11, respectively, probably the disintegration time was less for L11 due to its reduced thickness. However, both were highly friable and showed very high hardness (493 N), and the powder was adhered on the punches and the matrix. This results indicates requiring the addition of excipients.

Some formulations were previously tested to obtain the final composition (Table 2). Initially, magnesium stearate (1%) as lubricant and microcrystalline cellulose as a filler and sorbent material (27.5%) were added. The amount of dried extract (L10 or L11) was kept the same, corresponding to a dose of 200 mg of EAF. The hardness remained high, but less friable, with losses below 0.61%, but the powder was still adhered to the punches and matrice. Then the concentration of magnesium stearate was increased to 2.5% and microcrystalline cellulose decreased to 26%, the powders did not adhered to the punches and matrice, with appropriate characteristics, as shown in Table 5, and tablets showed acceptable.

Table 5. Specification and results of tests for quality control performed on the formulations L10 and L11.

Test	Specification	n	Results mean ± s	
			Formulation A	Formulation B
			(L10)	(L11)
Dimensions				
thickness (mm)	-	10	4	4
diameter (mm)	-	10	11	11
Bulk density (mg/mm ³)	-	10	1.06 ± 0.004	1.05 ± 0.006
Hardness (N)	less than 3 kgf (30N)	10	110.83 ± 2.64	57.33 ± 2.73
Friability (%)	maximum 1.5%	20	1.5	1.33
Disintegration time (min)	≤ 30 min	6	30	25

The tablets were evaluated for physical characteristics. The tablets showed brown coloration (Figure 1) characteristic of EAF. The geometric shape was cylindrical and did not show deformations or lamination of the tablets, the size is 11x4 mm for both.

**Fig. 1.** General aspects of the tablets produced from Formulation A (L10) and B (L11).

The mechanical strength of tablets is of considerable importance, because tablets must be able to withstand of handling and transportation, not breaking easily. For these reasons, the mechanical strength is routinely measured (VILLANOVA et al., 2011). For this, evaluated the friability, which determines their resistance to chipping and surface abrasion by tumbling them in a rotating cylinder and the percentage weight loss after tumbling is measured. The hardness is another measure of the mechanical, and measure the breaking force and is of interest to both the compression process (parameter for equipment adjustment and calibration), and the quality of the finished product. The friability is according to the specifications of the Brazilian Pharmacopoeia (see Table 5) and the results showed that the samples presented a good hardness, according to the specifications and capping and lamination weren't observed in tablets of both formulation.

The disintegration time also was conform to the specifications of the Brazilian Pharmacopoeia (Table 5).

Generally, the particles obtained by spray drying have a characteristic form of hollow spheres, sometimes with a small hole that results from the drying process (AULTON, 2005). However, the particles morphology of the spray drier extract (L10 and L11) were rough and with reentrance, as demonstrated by SEM (Figure 2). By observing the particles of the Batch excipients (same conditions of drying of the extract, but only with the excipients, without the presence of EAF), there is the formation of smooth and spherical particles, it is concluded that the extract induces the formation of particles roughness. This probably occurs because the chemical bonds between the constituents of the extracts (tannins) and excipients, mainly hydrogen bonds, due to the presence of hydroxyl. Thus, favoring the exit of air and moisture during drying, producing a less rigid wall, forming depressions in the surface of the particles.

When comparing the morphology of the dried extracts with ethyl-acetate fraction (EAF), could be confirm the amorphous character of the EAF (A and B, Fig. 2) where the particles are brittle and rolled prisms. Moreover, the freeze-drying technique of the fraction generated laminate materials with irregular shape and size distribution. The products obtained by lyophilization present light, friable, porous and bulky (LIST & SCHMIDT, 1989).

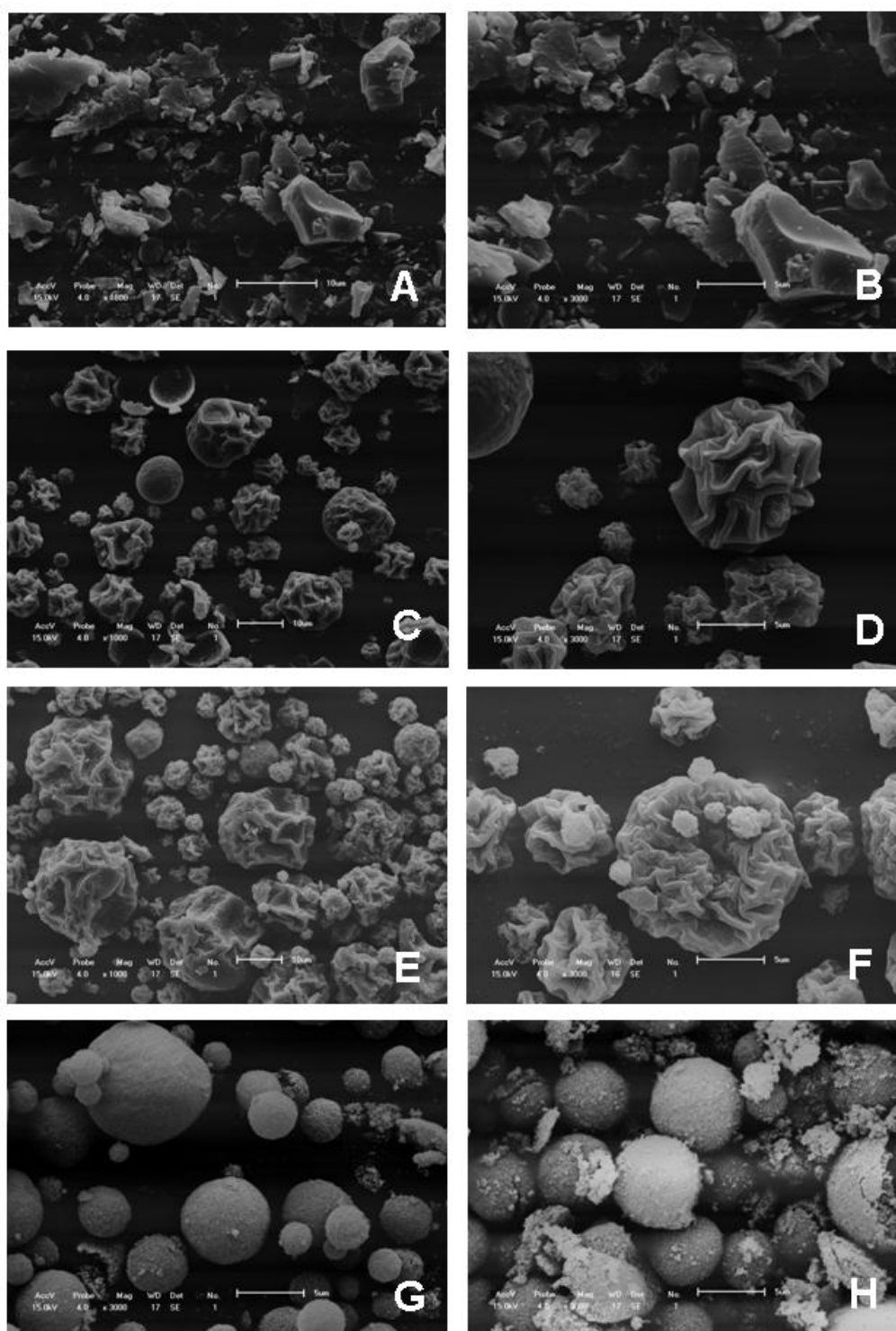


Fig. 2. SEM of EAF (A and B), dried extract batch L10 (C and D), dried extract batch L11 (E and F), dried excipients batch L10 (G) and dried excipients batch L11 (H). (Figures A, C and E had an increase of 1000 x, Figures B, D, F, G and H increased 3000x).

Spherical particles exhibit better flowability than other particle forms due to less friction between particles and between particles and equipment surfaces (VILLANOVA et al., 2011).

The flow of powders is an important property in the production of dosage forms. Among the reasons for the production of pharmaceutical powders with free flow can be highlighted: i) uniform feeding, to ensure a uniform particle packing and uniformity of weight, ii) reproducibility of filling machine, also ensures uniformity of weight. Furthermore, powders with irregular flow can result in excess air trapped in the powders, when at high speed the tablets can appearance of capping or lamination of the tablets. Irregular flowing powders can also result in excess fine particles, which increase the friction between the particles, dies and walls (STANIFORTH, 2005).

Evaluation of particle morphology by SEM can be correlated with the results obtained from the determination of the flow because the spray drying extracts exhibited higher bulk densities than EAF, most likely due to sphericity and small particle size, which favored the closer packing.

The mean particle size and particle size distribution play significant role in flowability, even a small change in particle size can change the flowability, particles of small size has a greater surface area, increases the contact area between the particles, thus, increasing the cohesive forces and lowering the flow rate (VILLANOVA et al., 2011).

The particle mean size of the dried extract (batches L10 and L11) are very close (Table 3), but when compared the coefficient of variation of both, 66.92% and 55.90%, respectively, can confirmed that the variability in data is greater for L10, in practice it has a greater oscillation of the data. In these batches (L10 and L11) 50% of the particles have a particle size smaller than 3 μm . Then, the characteristic of release is related to the proportion of excipients in each batch and not the particles size.

Moreover, the microcrystalline cellulose has high crystallinity (60-80%), this is important because it influence the flowability and the stability. The Avicel PH 200 is particularly suitable for the direct compression because it has excellent flowability and compactibility together with self-lubricating properties (PIFFERI et al., 1999).

Considering that the two formulations were developed within the specifications required to obtain tablets with suitable characteristics (USP, 2009; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), both tablets were subjected to dissolution test as well as their corresponding dry extracts in order to evaluate the influence of formulation on release profile of chosen substances. The release profiles of PB2 and EPC of the dried extracts and tablets are presented in figures 3, 4, and 5.

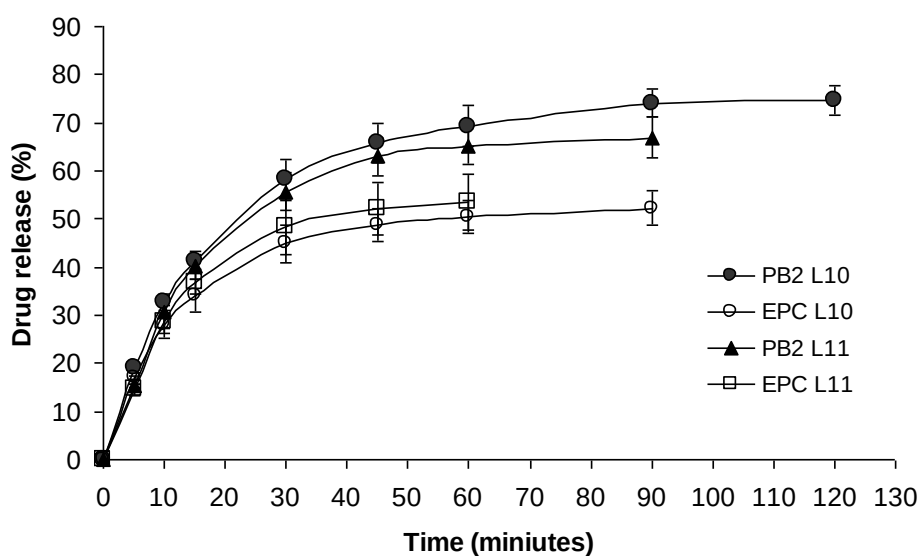


Fig. 3. Release profiles of procyanidin B2 (PB2) and epicatechin (EPC) from dried extracts containing EAF ($n = 3$), water as dissolution medium.

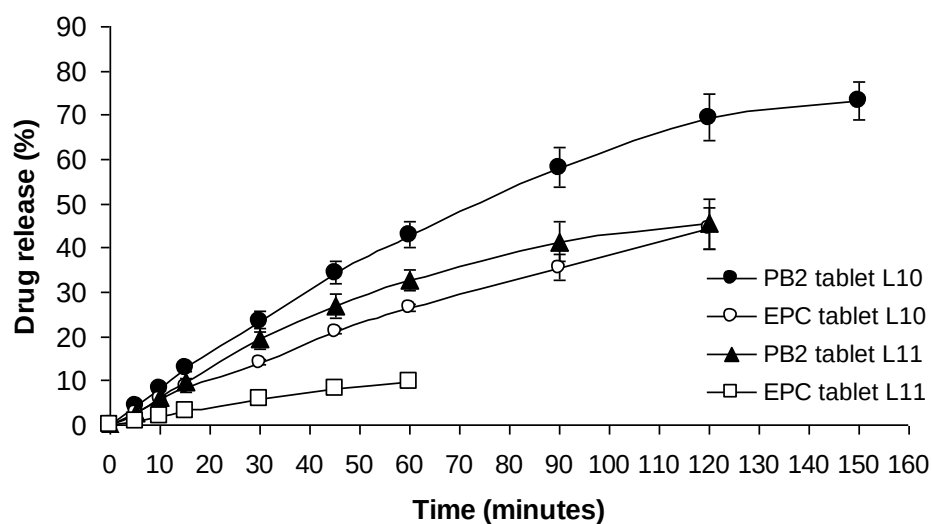


Fig. 4. Release profiles of procyanidin B2 (PB2) and epicatechin (EPC) from tablets (formulation A and B) containing EAF ($n = 3$), water as dissolution medium.

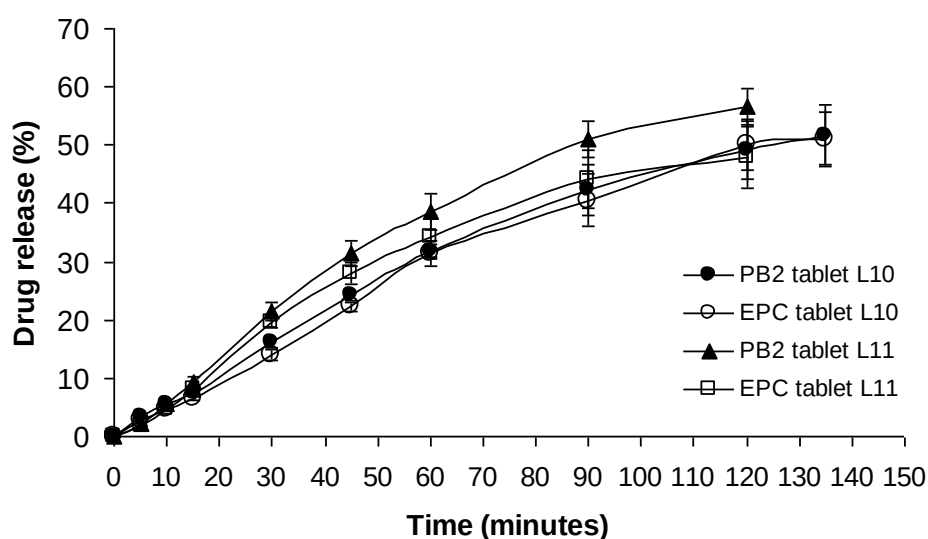


Fig. 5. Release profiles of procyanidin B2 (PB2) and epicatechin (EPC) from tablets containing EAF ($n = 3$), simulated gastric intestinal fluid (SGI) as dissolution medium.

In dried extracts L10, containing 50:50 (w/w) proportion of excipients CSD:LACT, 74.7% of PB2 was released in 120 min and 52.3% of EPC was released in 90 min. For dried extract L11, produced with 75:25 (w/w) CSD:LACT, at 90 min release time was for PB2 and 60 min for EPC, corresponding a 66.9 and 53.5% of liberation for PB2 and EPC, respectively. In formulation A, containing dried extract L10, the PB2 and EPC were released in water as dissolution medium in 150 and 120 min, respectively, when used SGI as dissolution medium, released 51% in 135 min, for both compounds and the tablets suffered total breakdown during the test. For formulation B, produced with dried extract L11, the release time was approximately 120 min for two conditions of the test, except for EPC than released in 60 min and in water mean released 9.7% of the total, indicating that in this condition aqueous EPC was not able to release of the system, remained strongly adhered in the excipients, probably due to hydrogen bonds established between EPC and the excipients, rich in hydroxyl groups, and EPC has a smaller molecular size when compared to the excipients, which favors interaction without large steric impediment.

Comparing the release profiles of the formulations, the tablets with a greater hardness (L10) showed a more prolonged release both assayed substances, probably the tablets were less porous, limiting the rate of penetration of the dissolution medium and reducing the rate of drug release.

Some studies have also observed partial release of the markers, among them can mention: Sansone et al. (2011); Sousa et al. (2011); Chaves et al. (2009); Fini et al. (2008), and Gabriëls and Plaizier-Vercammen (2004).

The dissolution profile is a useful tool in formulation development because it can show differences in the dissolution arising of the factors related to the drug, excipients, and manufacturing process (VILLANOVA et al., 2011). The bioavailability of a drug defines the rate and extent to which a drug is absorbed. Any change that affects the drug release from the dosage form and its dissolution in gastrointestinal fluids can also affect bioavailability (ASHFORD, 2005).

The selection and proper use of excipients in the spray drying is a process of fundamental importance, since they determine the stability and quality of the same, and may even affect the bioavailability characteristics (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010).

The dissolution profile of PB2 and EPC follows a first order kinetics for all conditions and samples tested and depends on the dissolution medium used and the presence of excipients, the chemical compounds may assume different values of n (release exponent, Table 6) that characterizes the release mechanism. For geometrical cylinder shapes, values of n can range and framing on the three cases: Fickian diffusion ($n \leq 0.45$), non-Fickian diffusion ($0.45 < n < 0.89$) and transport mechanism type II ($n > 0.89$) (KOSMIDIS et al., 2003).

Based on the results, the values of n vary of the dried extract for the formulations. In dried extract was less than 0.45 for batch L10, it may be suggested that for this extract, the release of PB2 and EPC occurred by a Fickian diffusion mechanism, since there was no swelling and polymer relaxation, were expected could be happens in cases of anomalous transport or type II, as in tablets. And the batch L11 has non-Fickian diffusion.

For tablets can observed that the PB2 had non-Fickian diffusion for both medium, except in batch L11, where his behavior was managed by the transport mechanism type II. EPC already behaves only transport mechanism type II from tablets.

Table 6 Values of release exponent (n) for dried extract, tablets in dissolution medium water and in simulated gastric intestinal fluid (SGI).

Sample	Dried extract	Tablets dissolution medium water	Tablets dissolution mediun SGI
L10 – PB2	0.4211	0.8597	0.8851
L10 – EPC	0.3784	0.9105	0.9487
L11 – PB2	0.4601	0.8845	1.0380
L11 – EPC	0.4536	0.9151	0.9831

4. Conclusion

Dried extracts containing a semipurified extract of *T. catigua* (EAF) were obtained with better physicochemical characteristics than EAF.

Tablets were prepared with two spray dried extracts, L10 and L11, by direct compression. The composition of each formulation influenced the physical and chemical characteristics.

The two developed formulations met pharmacopoeial specifications, and are therefore suitable for oral administration. The results of the *in vitro* drug release may be related to the more-complex structure of tablets.

Acknowledgement

The authors thanks for the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Brazilian Agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação Araucária and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if) for their financial support. We are grateful to CAPES for fellowships awarded to R. Longhini and T. Klein. The technical assistance provided by A. Arantes and C. R. Novello is gratefully acknowledged. Thanks are due to Dr. Janet W. Reid, JWR Associates, Trumansburg, New York, for English revision.

5. References

- ANTUNES, E.; GORDO, W.M.; DE OLIVEIRA, J.F.; TEIXEIRA, C.E.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by herbal medicine Catuama® and its constituents. *Phytotherapy Research*, v. 15, p. 416-421, 2001.
- ASHFORD, M. Biodisponibilidade – fatores físico-químicos e relacionados à forma farmacêutica, in: M. Aulton (Ed.), *Delineamento de formas farmacêuticas*, 2a ed., Artmed, Porto Alegre, 2005, p. 245–263.
- AULTON, M. Secagem, in: M. Aulton (Ed.), *Delineamento de formas farmacêuticas*, 2a ed., Artmed, Porto Alegre, 2005, p. 385–401.
- BARBER, T.A. Pharmaceutical particulate matter: analysis and control. Buffalo Grove: Interfarma, 1993, p. 266-303.
- BARBOSA, N., FISCHMANN, L., TALIB, L.L., GATTAZ, W.F. Inhibition of Platelet Phospholipase A2 Activity by Catuaba Extract Suggests Antiinflammatory Properties. *Phytotherapy Research*, v. 18, p. 942–944, 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*, 1119, p. 257-263, 2006.
- BOGORNI, P.C., VENDRAMIM, J.D. Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) em milho. *Neotropical Entomology*, v. 34, n. 2, p. 311-317, 2005.
- BONASSOLI, V.T.; CHASSOT, J.M.; LONGHINI, R.; MILANI, H.; MELLO, J.C.P.; OLIVEIRA, R.M.W. Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 143, p. 179-184, 2012.

BRAZ, R.; WOLF, L.G.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P. Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2012.

BURKILL, H.M. *The useful Plants of West Tropical Africa*, v. 4. 2. ed. Royal Botanic Gardens Kew, 1997. p.88-134.

CAMPOS, M.M., FERNANDES, E., 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.

CARVALHO, E.L.S.; DE SOUZA, K.C.B.; BASSANI, V.L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; PETROVICK, P.R. Development of Spray-dried Extracts from Medicinal Plants, Conferencia Panamericana de Educación en Farmacia, 3, Buenos Aires, 1996. Ente Coordinador de Unidades Acadêmicas de Farmacia y Bioquímica, *Resúmenes NP*, v. 128, p. 141, 1996.

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.

CHAVES, J.S.; COSTA, F.B. da; FREITAS L.A.P. de. Development of enteric coated tablets from spray dried extract of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.), *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45, p. 573-584, 2009.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 6th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2009.

FARMACOPÉIA Brasileira. São Paulo: Andrei, 2010.

FINI, A.; BERGAMANTE, V.; CESCHEL, G.C.; RONCHI, C.; FONSECA DE MORAES, C.A. Fast dispersible/slow releasing ibuprofen tablets, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 69, p. 335-341, 2008.

GABRIËLS, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Design of a dissolution system for the evaluation of the release rate characteristics of artemether and dihydroartemisinin from tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 274, p. 245-260, 2004.

GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P.; FONSECA, M.J.V. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, v. 41, p. 1521–1527, 2008.

KOSMIDIS, K.; RINAKI, E.; ARGYRAKIS, P.; MACHERAS, P. Analysis of case II drug transport with radial and axial release from cylinders. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 254, p. 183-188, 2003.

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. *Phytopharmaceutical Technology*. Boca Raton: CRC, 1989.

LITTRINGER, E.M.; MESCHER, A.; SCHROETTNER, H.; ACHELIS, L.; WALZEL, P.; URBANETZ, N.A. Spray dried mannitol carrier particles with tailored surface properties – The influence of carrier surface roughness and shape. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 82, p. 194-204, 2012.

LONGHINI, R.; KLEIN, T.; SILVA JUNIOR, W.V. da; RODRIGUES, J.; LOPES, N.P.; MELLO, J.C.P. de. Development and validation studies for determination of phenylpropanoid substituted flavan-3-ols in semipurified extract o *Trichilia catigua* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of Separation Science*. v. 36, p. 1247-1254, 2013.

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

- PÉREZ-SERRADILLA, J.A.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chemistry*, v. 124, p. 1652–1659, 2011.
- PIFFERI, G.; SANTORO, P.; PEDRANI, M. Quality and functionality of excipients. *II Farmaco*, v. 54, p. 1-14, 1999.
- PIZZOLATTI, M.G.; VENSON, A.F.; SMÂNIA, A. J.; SMÂNIA, E.F.A.; BRAZ-FILHO, R. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. *Zeitschrift der Naturforschung*, v.57(c), p.483-488, 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.534-534, 2007.
- PORTUGUESE PHARMACOPOEIA. 2002, 4 ed. Sup. 2000, p.166-168.
- RESENDE, F.O.; RODRIGUES FILHO, E.; LUFTAMNN, H.; PETEREIT F.; MELLO, J.C.P. Phenylpropanoids 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.
- SANSONE, F.; PÌCERNO, P.; MENCHERINI, T.; VILLECCO, F.; D'URSI, A.M.; AQUINO, R.P.; LAURO, M.R. Flavonoid microparticles by spray-drying: influence of enhancers of the dissolution rate on properties and stability, *Journal of Food Engineering*, v. 103, p. 188-196, 2011.
- SOLLOHUB, K.; CAL, K. Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, p. 587-597, 2010.
- SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápico, 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*, 5 ed., Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2004, pp. 289-326.
- SOUSA, S.A. de; PÁSCOA, H.; CONCEIÇÃO, E.C. da; ALVES, S.F.; DINIZ, D.G.A.; DE PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Dissolution test of herbal medicines containing *Paullinia cupana*: validation of methods for quantification and assessment of dissolution. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, p. 269-277, 2011.
- STANFORTH, J. Powder flow, in: M. Aulton (Ed.), *The Design and Manufacture of Medicines*, 3rd ed., Elsevier, Canada, 2007, pp. 152–210.
- 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.
- USP 32. United States Pharmacopeia. 32nd ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD, USA, 2009.
- VILLANOVA, J.C.O.; AYRES, E.; ORÉFICE, R.L. Design of prolonged release tablets using new solid acrylic excipients for direct compression. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 79, p. 664–673, 2011.
- WELLS, J. Pré-formulação farmacêutica: as propriedades físico-químicas dos fármacos, in: M. Aulton (Ed.), *Delineamento de formas farmacêuticas*, 2nd ed., Artmed, Porto Alegre, 2005, pp. 124–148.

Qualidade compreende um conjunto de critérios que caracterizam matéria-prima e produtos para o uso ao qual se destinam (FARIAS, 2010). É necessário estabelecer os parâmetros de qualidade aceitáveis para a matéria-prima, produto intermediário e acabado.

Para produtos naturais, a qualidade da matéria-prima vegetal é a determinante inicial da qualidade do produto final (FARIAS, 2010), por isto tem-se a necessidade de desenvolver um controle de qualidade adequado, assim é possível garantir um produto de qualidade durante toda sua cadeia de desenvolvimento e produtiva.

Embora a *Trichilia catigua* seja amplamente utilizada na medicina popular como tônico para o tratamento da fadiga, estresse, impotência e déficit de memória (PIZZOLATTI et al., 2002), e na indústria farmacêutica, sendo comercializada na forma de uma formulação líquida, conhecida como Catuama, constituída por mais três espécies vegetais, ainda inexistem especificações oficiais de qualidade da droga vegetal.

O controle rigoroso das etapas de processamento é necessário para que haja reprodutibilidade em termos de eficácia, segurança e especificações técnicas (FARIAS, 2010). Com os parâmetros pré-definidos e os procedimentos de preparação de extratos padronizados, obtém-se os chamados extratos padronizados (FARIAS, 2010). Este método já foi estabelecido no PALAFITO, tendo-se o cuidado de seguir o protocolo e manter a padronização.

Primeiramente, estabeleceu-se o controle de qualidade da droga vegetal, segundo estabelecido nas Farmacopeias e os resultados estão disponíveis em anexo (Anexo A). A droga vegetal atendeu as expectativas, estando de acordo com estudos anteriores.

Após avaliação da qualidade procedeu-se a obtenção do extrato bruto (EB), da fração acetato de etila (FAE) e dos extratos secos por aspersão (L1-L11). A descrição da forma de obtenção já foi relatada nos Capítulos 2 e 3.

Os extratos secos são matérias-prima que apresentam algumas vantagens em relação a outras, por possuírem maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, são mais facilmente padronizadas, apresentam maior concentração de compostos ativos e podem ser transformadas em diferentes tipos de formas farmacêuticas (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010). Por isto a conservação na forma de extrato seco é mais viável e segura para trabalhar e padronizar.

Um dos objetivos deste trabalho foi o estudo do perfil cromatográfico da fração acetato de etila obtido a partir das cascas de *Trichilia catigua*, através do desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que permitisse a análise e quantificação de substâncias presentes nesses extratos. Assim, este método pode ser aplicado ao controle de qualidade dos extratos, produtos intermediários e formas farmacêuticas. Esta metodologia analítica está descrita no Capítulo 2, e é útil para a

quantificação de procianidina B2 (PB2) e epicatequina (EPC), além de uma mistura de catequina e ácido clorogênico, cinchonaínas IIa e IIb, e uma mistura de cinchonaínas Ia e Ib.

A validação de um método analítico deve garantir que este atenda às exigências analíticas, as quais asseguram a confiabilidade dos resultados, por meio de estudos experimentais (BRASIL, 2003). O método desenvolvido para a fração semipurificada acetato de etila de *T. catigua* mostrou-ser linear, robusto, exato, preciso e reprodutível na análise de PB2 e EPC na faixa linear estabelecida, atendendo a todos os parâmetros da legislação vigente (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Conforme descrito no Capítulo 1, a catuaba é uma planta interessante, devido às suas atividades biológicas, de uso popular e também por comprovação científica. Muitos têm sido os parceiros de trabalho envolvidos nestes estudos. Destes, pode citar: a) tecnologia farmacêutica, Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi – UEM; b) avaliação do efeito antidepressivo e para memória, Profa. Dra. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira – UEM; c) avaliação do comportamento sexual, Profa. Dra. Daniela Cristina Ceccatto Gerardin – Universidade Estadual de Londrina - UEL; d) absorção intestinal, Profa. Dra. Andréa Diniz – UEM; e) estresse oxidativo em ratos diabéticos, Profa. Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni e Profa. Dra. Marli Defani - UEM; f) atividade antitripanossoma, Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura – UEM; g) imunoestimulante, Prof. Dr. Emerson José Venâncio – UEL; h) atividade virulogica, Profa. Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares e Prof. Dr. Carlos Mitihiko Nozawa – UEL; i) morfologia tecidual e toxicidade por meio de comedogenicidade, Profa. Dra. Eneri Viera de Souza Leite Mello e Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali – UEM; j) avaliação de permeação cutânea por meio de espectroscopia fotoacústica, Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso – UEM; k) avaliação dos extratos por espectrometria de massas, Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes – USP-Ribeirão Preto; l) avaliação da atividade antioxidante de plasma, Prof. Dr. Décio Sabbatini - UEL.

Com o desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE pode-se controlar melhor os constituintes dos extratos e frações que são enviados aos grupos de pesquisa, parceiros nos estudos da catuaba.

Dentre as técnicas de secagem comumente empregadas para a obtenção de extratos secos vegetais, destacam-se o processo de liofilização e de aspersão (nebulização ou *spray drying*). O primeiro processo emprega baixas temperaturas e a secagem por aspersão envolve o uso de calor.

A secagem por aspersão consiste na obtenção de uma forma particulada sólida a partir de uma solução, dispersão, suspensão ou emulsão que será aspergida na forma de pequenas gotículas. Para isto utiliza-se uma câmara de secagem sob altas temperaturas, onde o líquido é rapidamente eliminado por evaporação (COUTO, 2000; AULTON, 2005).

Ultimamente, a técnica de *spray-drying* tem sido amplamente utilizada na pesquisa e desenvolvimento farmacêutico. O produto obtido pode ser incorporado diretamente em formulações de comprimidos, cápsulas, pomadas, granulados ou ser dispensado como forma farmacêutica final (COUTO, 2000; OLIVEIRA & PETROVICK, 2010).

A operação de secagem visa a retirada de água, que pode fornecer um meio reacional adequado, pois a umidade residual pode ser suficiente para conduzir a deterioração dos produtos durante o período que permanecem armazenados, além do mais, quando a umidade residual é reduzida assegura ao produto propriedades de fluxo livre durante o tempo de uso (AULTON, 2005).

Além de ajudar na estabilidade química dos ativos por redução da quantidade de água disponível, o produto obtido pela secagem por aspersão pode melhorar as características tecnológicas dos extratos.

Neste trabalho desenvolveram-se extratos secos por aspersão a partir da fração acetato de etila de extrato liofilizado de extrato hidroacetônico das cascas de *T. catigua*, com intuito de melhorar a estabilidade química, as características tecnológicas, diminuir a eletrostática da FAE, resultando em um produto mais facilmente dispersível e com maior valor tecnológico agregado.

As partículas obtidas por *spray-drying* foram caracterizadas e aquelas com as melhores características foram utilizadas na obtenção de forma farmacêutica comprimido.

Os comprimidos têm sido o sistema de liberação de fármacos preferidos para a obtenção de efeito sistêmico dentre as formas farmacêuticas destinadas à administração pela via oral. Dentre as vantagens destas formas pode-se destacar a precisão de dose, a uniformidade de conteúdo, facilidade de manuseio e administração, tendo uma maior aceitação por parte dos pacientes. Estas formas conferem maior estabilidade, quando comparado às formas farmacêuticas líquidas e semissólidas (ALDERBORN, 2005), fato que foi considerado como positivo para a realização deste estudo.

Os comprimidos desenvolvidos a partir dos extratos secos por aspersão de FAE foram caracterizados através de testes físicos, físico-químicos e perfil de dissolução, de acordo com a Farmacopeia Americana (2009) e Farmacopeia Brasileira (2010). Tanto o extrato seco, quanto os comprimidos obtidos apresentaram liberação máxima de 74,7% do seu conteúdo. Assim, é necessário avaliar a liberação *in vivo* dos componentes ativos e a biodisponibilidade e considerar possíveis alterações nas formulações. De qualquer forma outros testes devem ser conduzidos, como estudo de estabilidade da formulação, a fim de melhor caracterizar as mudanças que podem ocorrer na formulação desenvolvida e futuramente pensar no desenvolvimento de comprimidos revestidos, para garantir uma melhor proteção aos comprimidos contendo extratos secos de *T. catigua* como componente ativo e mascarar seu sabor amargo.

A qualidade da matéria-prima vegetal cascas foi devidamente estabelecida e demonstrou estar de acordo com os estudos anteriores.

O método desenvolvido neste trabalho foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência. O sistema empregado foi gradiente com metanol, acetonitrila e água adicificada nas fases com ácido trifluoroacético.

O método proposto demonstrou ser preciso, extato, reprodutível e robusto para determinação de procianidina B2 e epicatequina, além da quantificação das substâncias identificadas na fração acetato de etila, como uma mistura de catequina e ácido clorogênico, cinchonaínas IIa e IIb, mistura de cinchonaínas Ia e Ib.

Este método desenvolvido e validado foi importante para caracterizar a fração liofilizada (FAE), os produtos intermediários subsequentes (extratos secos por aspersão) e controle de qualidade do produto acabado.

Foram preparados extratos secos por aspersão contendo FAE (70% dos sólidos totais), utilizando mistura de adjuvantes de secagem (dióxido de silício coloidal e maltodextrina), em diferentes proporções e em duas concentrações de sólidos totais, utilizando-se um planejamento fatorial. Os extratos obtidos foram caracterizados quanto ao seu rendimento, distribuição granulométrica, morfologia, perda por dessecação, concentração de procianidina B2 e epicatequina. O extrato que apresentou melhores características foi o obtido lote L6 (dióxido de silício coloidal:maltodextrina, 75:25 p/p, 20% sólidos totais).

Visualmente, o lote L6 não demonstrou qualidades de fluxo, havendo a necessidade de alterar a composição dos adjuvantes. Após os testes de avaliação tecnológica (densidade bruta e de compactação, ângulo de repouso, determinação do fator de Hausner e índice de Carr), dois extratos apresentaram melhores características, o lote L10 (dióxido de silício coloidal: lactose, 50:50 p/p, 20 % sólidos totais) e L11 (dióxido de silício coloidal: lactose, 75:25 p/p, 20 % sólidos totais).

Após o processamento e seleção dos extratos secos por aspersão avaliou-se a atividade antioxidante *in vitro* destes extratos e constatou-se a manutenção da mesma, ou seja, o processo de secagem não interferiu na atividade da fração acetato de etila.

Os comprimidos contendo altos teores de extratos secos dos Lotes 10 e 11 foram obtidos por compressão direta. Ambos foram devidamente caracterizados através de testes farmacopeicos (peso médio, dureza, friabilidade e tempo de desintegração) e determinação dos perfis de dissolução e a avaliação da cinética de liberação.

Os resultados obtidos com os comprimidos estão dentro dos valores estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira, atendendo as especificações.

- ALDERBORN, G. Comprimidos e compressão. In: AULTON, M.E. (Ed). *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- ANTUNES, E.; GORDO, W.M.; DE OLIVEIRA, J.F.; TEIXEIRA, C.E.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by herbal medicine Catuama® and its constituents. *Phytotherapy Research*, v.15, p.416-421, 2001.
- AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. Porto Alegre: Artmed, 2 ed. 2005. 677 p.
- AULTON, M. Secagem. In: AULTON, M.E. (Ed). *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BARBOSA, N., FISCHMANN, L., TALIB, L.L., GATTAZ, W.F. Inhibition of Platelet Phospholipase A2 Activity by Catuaba Extract Suggests Antiinflammatory Properties. *Phytotherapy Research*, v. 18, p. 942–944, 2004.
- 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. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17 de 24.2.2000. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 24 abr, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1587 de 03.9.2002. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 05 set. 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, 29 de maio de 2003. Dispõe protocolo para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 02 de junho de 2003.
- BONASSOLI, V.T.; CHASSOT, J.M.; LONGHINI, R.; MILANI, H.; MELLO, J.C.P.; OLIVEIRA, R.M.W. Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice, *Journal of Ethnopharmacology*, n. 143, p. 179-184, 2012.
- CAMPOS, M.M., FERNANDES, E., 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.
- 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.
- COUTO, A.G. *Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado contendo produto seco nebulizado de Phyllanthus nirui L. – Euphorbiaceae (quebra-pedra)*. Porto Alegre: Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. 2000. Dissertação de Mestrado.
- DE SOUZA, T.P.; SPANIOL, B.; PETROVICK, P.R. Avaliação de comprimidos revestidos por película contendo alta concentração de produto seco por aspersão de *Phyllanthus nirui*. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v.24, n.1, p.61-67, 2005.

- 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. 1ª. Reimp. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010, p.263-288.
- FARMACOPÉIA Brasileira. São Paulo: Andrei, 2010.
- FIGE, E.F.; HAGEN, T.A. Pré-formulação. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.J.; KAMG, J. J. *Teoria e prática na Indústria Farmacêutica*. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v. I, p.295-339.
- GONZÁLEZ ORTEGA, G.; SCHIMIDT, P.C. Obtención de comprimidos conteniendo extractos atomizados de Flor de la Pasión (*Pssiflora incarnata* L.). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v.14, n.3, p.173-180, 1995.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, ICH Topic Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology. Available from: <http://www.ich.org>. 2005.
- OLIVEIRA, O.W.; PETROVICK, P.R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, p. 641-650, 2010.
- PETROVICK, P.R. *Tecnologia farmacêutica I – polígrafo de acompanhamento*. 2004-1. Porto Alegre: UFRGS, 2005.
- PIFFERI, G.; SANTORO, P.; PEDRANI, M. Quality and functionality of excipients. *II Farmaco*, v. 54, p. 1-14, 1999.
- PIZZOLATTI, M.G.; VENSON, A.F.; SMÂNIA, A. J.; SMÂNIA, E.F.A.; BRAZ-FILHO, R. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. *Zeitschrift der Naturforschung*, v.57(c), p.483-488, 2002.
- PIZZOLATTI, M.G.; KOGA, A.H.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology*, v.10.5, p.422-426, 2003.
- PLAIZIER-VERCAMMEN, J.A.; BRUWIER, C. Evaluation of excipients for direct compression of the spray-dried extract of *Harpagophyton procumbens*. *S.T.P. Pharma Sciences*, v.2, p.525-530, 1986.
- 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.534e1-534e8, 2007.
- REMILI, H.; BOUSSARD, P.; DEVLEESCHOUWER, M. Microbiological quality of spray-dried pharmaceutical plant extracts. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 1, p. 265-268, 1994.
- RESENDE, F. O. *Trichilia catigua: avaliação farmacognóstica, fitoquímica e biológica in vitro*. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2007.
- SOARES, L.A.L.; SCHIMIDT, P.C.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; PETROVICK, P.R. Efeito da força e da velocidade de compressão sobre as propriedades de comprimidos contendo alta concentração de extrato seco vegetal. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v.22, n.2, p.147-154, 2003.

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.; MENTS, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. 1ª. Reimp. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010, p. 289-326.

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 UNITED States Pharmacopoeia. 32th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009.

WELLS, J.I. *Pharmaceutical Preformulation*. Chichester: Ellis Horwood, New York: John Wiley, 1988.

WELLS, J. Pré-formulação farmacêutica. In: AULTON, M.E. (Ed). *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; Cechinel Filho, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p.147-152, 2001.

ANEXO A

Caracterização da droga vegetal

A1. Matéria-prima vegetal

A droga vegetal cascas de *Trichilia catigua* foram adquiridas em dois momentos diferentes. O primeiro lote (LabCat) foi cedido pelo Laboratório Catarinense, Lote 17573, em agosto de 2008 (4 kg). Com este lote desenvolveram-se os estudos de validação, referentes ao Capítulo 2. O segundo lote (Caetité) foi adquirido diretamente do produtor, em Caetité – Bahia, em maio de 2011, perfazendo um total de 25 kg. Uma exsicata foi preparada e adicionada no Herbário desta Universidade, sob o número 19434, e sua identidade botânica foi confirmada pela Profa. Dra. Cássia Mônica Sakuragui. Este segundo lote foi usado no desenvolvimento tecnológico, referente ao Capítulo 3.

As cascas secas foram pulverizadas em moinho de martelos (Tigre ASN-5) e armazenadas em recipientes fechados ao abrigo da luz.

A2. Determinação da perda por dessecação

Cerca de 2 g da droga vegetal cominuída foi exatamente pesada em porta amostra de alumínio previamente tarada e colocado em balança de secagem por infravermelho por 30 min a temperatura de 110 °C. Os resultados são expressos em perda de massa percentual, pela média de, no mínimo, três determinações.

Os resultados para perda por dessecação da droga vegetal estão descritos abaixo (Tabela A1).

Tabela A1. Perda por dessecação das cascas de *Trichilia catigua*.

Amostra	Perda por dessecação média% ± dp (CV%)
LabCat	10,73 ± 0,51 (4,78)
Caetité	11,61 ± 0,25 (2,17)

dp = desvio padrão; CV% = coeficiente de variação

O teor máximo de umidade estabelecido pelas farmacopeias estão entre 8 e 14% (FARIAS, 2010). Os resultados encontrados para ambos os lotes estão dentro dos limites esboçados para as diferentes espécies vegetais, parâmetro adotado, pois não existe monografia descrita para a espécie em estudo. Teores muito elevados em matérias-primas

vegetais permitem o desenvolvimento de fungos e bactérias, e a ação de enzimas, que podem levar a uma degradação de constituintes químicos (FARIAS, 2010).

Resende (2007) também trabalhou com esta espécie vegetal e obteve valores de perda por dessecação de 9,93% estando os resultados próximos aos obtidos neste estudo. Já Braz e colaboradores (2011) obtiveram resultados de 10,42%.

A3. Determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2007)

Amostra de 0,750 g da droga pulverizada, exatamente pesada, foi transferida para erlenmeyer com 150 mL de água, deixando-se durante 30 min em banho-maria à temperatura de 80 a 90 °C. Após resfriou-se o erlenmeyer em água corrente e o conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 250 mL, lavando-se e completando-se o volume com água. Deixou-se a solução decantar, o líquido sobrenadante foi filtrado e os primeiros 50 mL foram desprezados. O filtrado foi denominado de solução-mãe (SM).

Para determinação de polifenóis totais (PT), 5 mL da SM foram diluídos com água em balão volumétrico de 25 mL. Dessa solução foram transferidos 2,0 mL para balão volumétrico de 25 mL, acrescentado 1 mL de solução de ácido fosfotúngstico R (reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 Mol/L) e 10 mL de água destilada, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio a 10,75 %. Após 30 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 760 nm, empregando-se a água como branco. Para determinação de polifenóis não adsorvíveis por pó-de-pele (PNA), 10,0 mL da SM foram agitadas com 0,100 g de pó-de-pele R durante 60 min.

Após, procedeu à filtração da dispersão e 5,0 mL deste filtrado foram diluídos com água para 25 mL em balão volumétrico. Dois mililitros dessa solução foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL, adicionando-se 1 mL de solução de ácido fosfotúngstico R (reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 Mol/L) e 10 mL de água e o volume foi completado com solução de carbonato de sódio a 10,75 %. Após 30 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 760 nm, empregando-se a água como branco.

Também se procedeu a leitura de um padrão, o pirogalol, onde 50 mg de pirogalol foram exatamente pesados, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e dissolvidos com água. Desta solução foram tomados 5,0 mL e completado para 100 mL com água. Tomaram-se 2,0 mL desta nova diluição, acrescentou-se 1,0 mL de solução de ácido fosfotúngstico R, 10 mL de água e o volume foi completado com solução de carbonato de sódio a 10,75 % em balão volumétrico de 25 mL. A absorvância foi determinada conforme as soluções anteriores.

A porcentagem de taninos totais foi calculada segundo as fórmulas:

$$PT = \frac{62,5.A_1.m_2}{A_3.m_1} \quad TT = \frac{62,5(A_1 - A_2).m_2}{A_3.m_1}$$

onde:

PT = polifenóis totais (%)

A₁ = absorvância medida

A₂ = absorvância dos polifenóis não adsorvíveis por pó de pele

A₃ = absorvância padrão

m₁ = massa da droga em g

m₂ = massa de padrão em g

TT = taninos totais (%)

Os resultados estão expressos na Tabela A2. Resende (2007), também procedeu ao controle de qualidade das cascas de *T. catigua*, para teor de polifenóis totais obteve 10,51% e para taninos totais, 6,96%.

Tabela A2. Determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais das cascas de *Trichilia catigua*.

Droga vegetal	Polifenóis totais	Taninos totais
	Média % ± dp (CV%)	Média % ± dp (CV%)
LabCat	7,31 ± 0,05 (0,66)	5,44 ± 0,19 (3,52)
Caetitê	9,54 ± 0,24 (2,50)	7,07 ± 0,06 (0,93)

dp = desvio padrão; CV% = coeficiente de variação

A4. Teor de extrativos

A metodologia utilizada foi a descrita em Deutsches (1986). Cerca de 1,0 g da droga vegetal moída, exatamente pesada, foi submetido à decocção com 100,0 g de água durante 10 min. Após o resfriamento o volume foi completado a 100,0 mL. A solução restante foi filtrada em papel filtro e, os primeiros 20,0 mL foram desprezados. Do restante do filtrado foi pesada alíquota equivalente a 20,0 g em pesa-filtro previamente tarado, e evaporado até secura em banho-maria, sob agitação constante. O resíduo foi colocado em estufa, à temperatura de 105 °C por 2 h, resfriado em dessecador e pesado. O teor de extrativos foi calculado em massa percentual segundo a equação:

$$TE = \frac{g.FD.100}{m}$$

Onde TE é teor extrativos em % (m/m); g é a massa de resíduo em gramas; m é a massa da amostra em gramas e FD é o fator de diluição. E os resultados de três determinações estão descritos na Tabela A3.

Tabela A3. Determinação do teor de extrativos das cascas de *Trichilia catigua*.

Droga vegetal	Teor de extrativos
	Média% $\pm$ dp (CV%)
LabCat	21,10 $\pm$ 1,01 (4,83)
Caetité	25,99 $\pm$ 0,87 (3,34)

dp = desvio padrão; CV% = coeficiente de variação

A determinação do teor de extrativos é realizada para se conhecer a quantidade de substâncias extraíveis a partir de uma determinada quantidade de material vegetal (WHO, 1998b), empregando-se água como líquido extrator. Resende (2007) obteve como resultado o valor médio de 19,16%.

A5. Cinzas totais, insolúveis e sulfatadas

A5.1. Cinzas totais (FARMACOPEIA, 2010)

As cinzas totais incluem cinzas fisiológicas e de materiais estranhos e cinzas não-fisiológicas.

Foram pesados, exatamente, cerca de 3 g da amostra pulverizada em cadinho de porcelana previamente tarado. A amostra foi distribuída uniformemente no cadinho e incinerada aumentando gradativamente a temperatura até, no máximo, 600 ± 25 °C, até que todo o carvão fosse eliminado. Os cadinhos foram resfriados em dessecador e pesados em seguida. A porcentagem de cinzas foi calculada em relação à droga seca ao ar.

A5.2. Cinzas insolúveis em ácido (FARMACOPEIA, 2010)

Cinzas insolúveis em ácido compreendem o resíduo obtido na fervura de cinzas totais ou sulfatadas com ácido clorídrico diluído, após filtragem, lavagem e incineração. O método destina-se à determinação de sílica e constituintes silícicos da droga.

O resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi fervido durante 5 min com 25 mL de ácido clorídrico a 7% (p/V) em cadinho coberto com vidro de relógio. O vidro de relógio foi lavado com 5 mL de água quente, juntando a água de lavagem ao cadinho. O resíduo insolúvel em ácido foi recolhido sobre papel de filtro isento de cinza, lavando-o com água quente até que o filtrado se mostrasse neutro. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original, seco sobre chapa quente e incinerado a cerca de 500 °C

até peso constante. A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido foi calculada em relação à droga seca ao ar.

A5.3. Cinzas sulfatadas (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2008)

No cadinho de porcelana previamente tarado foi pesado, exatamente, cerca de 2 g da droga seca e moída. A amostra foi umedecida com um pouco de ácido sulfúrico R (2 mL) e aquecida até carbonização completa da amostra. Após arrefecimento, o resíduo foi novamente umedecido com 1 mL de ácido sulfúrico R e novamente aquecido até que não houvesse mais libertação de fumaças brancas e, em seguida, foi incinerado a $600 \pm 50^\circ\text{C}$ até completa incineração do resíduo. O cadinho foi resfriado em dessecador na presença de gel de sílica anidro R e pesado de novo. A porcentagem de cinzas sulfatadas foi calculada em relação à droga seca ao ar.

Os resultados encontrados para os teores de cinzas estão descritos na Tabela A4.

Tabela A4. Determinação dos teores de cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido e cinzas sulfatadas das cascas de *Trichilia catigua*.

Amostra	Cinzas totais média% $\pm$ dp (CV%)	Cinzas insolúveis em ácido média% $\pm$ dp (CV%)	Cinzas sulfatadas média% $\pm$ dp (CV%)
LabCat	4,56 $\pm$ 0,09 (1,96)	Não quantificáveis	5,19 $\pm$ 0,14 (2,76)
Caetité	5,15 $\pm$ 0,07 (1,29)	Não quantificáveis	5,28 $\pm$ 0,04 (0,79)

dp = desvio padrão; CV% = coeficiente de variação

Os resultados encontrados para cinzas insolúveis em ácido para ambos os lotes demonstraram que a droga vegetal apresenta teor de cinzas insolúveis em ácido abaixo do limite detectável por essa técnica. Assim, pode-se concluir que essa matéria-prima não possui contaminação por silicato e, portanto, não foi adulterada com areia e/ou terra, e que o farmacógeno não apresenta este tipo de material em sua composição natural.

O teor de cinzas sulfatadas apresentou-se maior que o teor de cinzas totais. Assim, a técnica de cinzas sulfatadas, embora mais demorada, parece conservar os cloretos alcalinos, perdidos a alta temperatura na técnica de cinzas totais e, ser mais representativa com relação ao teor de minerais totais presentes no vegetal (PLANTAMED, 2008).

Referências

BRAZ, R.; WOLF, L.G.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P. Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22, p. 1111-1118, 2012.

BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION. *British Pharmacopoeia 2009*. London: The Stationery Office, 2008.

DEUTSCHES ARZNEIBUCH, 9.ed., Stuttgart: Wissenschaftliche, 1986.

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. 1ª. Reimp. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010, p.263-288.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5 ed., São Paulo: Andrei, 2010.

FARMACOPEIA EUROPEIA. *Determination of tannins in herbal drugs*, 6 ed. European Directorate for the Quality of Medicines, 2007, p. A286.

GOBBO-NETO L, LOPES NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, p. 374-81, 2007.

HEGNAUER, R. Myriophyllinm Inklusen und Gerbstoffe. In: *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Basel: Birkhäuser, 1986. p.298, v.7.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 30, p. 241-248, 2009.

PLANTAMED, Determinação de Cinzas. Disponível em: http://www.plantamed.com.br/DIV/CULTIVO_COLHEITA_MEDICINAL.htm. Acesso em: 31 de agosto de 2008.

RESENDE, F. O. *Trichilia catigua: avaliação farmacognóstica, fitoquímica e biológica in vitro*. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for the appropriate use of herbal medicines*. Manila, 1998a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Quality control methods for medicinal plant materials*. Genebra, 1998b.

ANEXO B**Caracterização dos adjuvantes tecnológicos****B1 Caracterização físico-química dos adjuvantes farmacêuticos****B1.1 Maltodextrina**

Identificação (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2006)

Dissolveu-se 0,1 g de maltodextrina em 2,5 mL de água, a solução foi aquecida com 2,5 mL de solução de cupri-tartárico R. Um precipitado vermelho deve ser formado.

Determinação da perda por dessecação (conforme item A2)

Os valores devem ser menores que 6 %.

B1.2 Dióxido de silício coloidal

Determinação da perda por dessecação (conforme item A2)

Os valores devem ser menores que 2,5 % (USP 32).

B1.3 Lactose

Identificação (USP, 2009)

Dissolveram-se 250 mg de lactose em 25 mL de água. Adicionaram-se 3 mL de hidróxido de amônio e aqueceu-se em banho de água a 80 °C por 10 min. Uma colocação vermelha deve ser desenvolvida.

Determinação da perda por dessecação (conforme item A2)

As amostras devem ser secas a 80 °C e os valores devem ser menores que 0,5 % (USP, 2009).

B1.4 Celulose microcristalina

Identificação (USP, 2009)

Foram pesados exatamente cerca de 20 g de cloreto de zinco, 6,5 g de iodeto de potássio e dissolvidos em 10,5 mL de água. Foram adicionados 0,5 g de iodo à solução, a qual foi mantida sob agitação por 15 min. Pesaram-se 10 mg de celulose microcristalina em um vidro relógio e adicionaram-se 2 mL da solução de cloreto de zinco iodado. A fase líquida deve apresentar coloração azul-violeta.

Determinação da perda por dessecação (conforme item A2)

Os valores devem ser menores que 6,0 % (USP, 2009).

B1.5 Estearato de magnésio

Identificação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010)

Cerca de 4 g de amostra foram adicionados de 25 mL de água e 5 mL de ácido clorídrico até ocorrência da separação do ácido esteárico na superfície. A mistura foi aquecida até fervura e, após resfriamento à temperatura ambiente, realizaram-se as seguintes provas:

Prova A: alíquotas de 5 mL do líquido aquoso foram alcalinizados com hidróxido de amônio R. A verificação da alcalinidade foi realizada com fita de pH. Em seguida, foram adicionados 2 mL de fosfato de sódio SR. A formação de precipitado branco caracteriza uma reação positiva.

Prova B: o ácido esteárico sobrenadante foi separado por decantação e lavado com água e deixado dessecar por 20 min. Após a secagem, o ponto de fusão foi determinado, devendo corresponder a 54 °C.

Determinação da perda por dessecação (conforme item A2)

Os valores devem ser menores que 6,0 % (USP, 2009).

A fim de garantir a qualidade dos adjuvantes utilizados neste estudo fez-se necessário realizar alguns ensaios de caracterização, como identificação e perda por dessecação, os resultados estão expressos na Tabela B1.

Dos ensaios realizados apenas a maltodextrina e o dióxido de silício coloidal não atenderam as especificações no que diz respeito a perda por dessecação.

Tabela B1. Ensaios de identificação e perda por dessecação dos adjuvantes tecnológicos.

Adjuvante	Especificações para identificação	Resultados	Valores de referência para perda por dessecação	Resultados Média % $\pm$ dp (CV%)
Maltodextrina	Formação de precipitado vermelho (Ph. Eur, 2001)	Conforme especificação	$\leq 6\%$ (Ph Eur, 2001)	$7,20 \pm 0,17$ (2,44)
Dióxido de silício coloidal	-	-	$\leq 2,5\%$ (USP, 2009)	$2,86 \pm 0,06$ (2,29)
Lactose	Coloração vermelha (USP, 2009)	Conforme especificação	$\leq 0,5\%$ (USP, 2009)	$0,49 \pm 0,01$ (3,07)
Celulose microcristalina	Coloração azul-violeta (USP, 2009)	Conforme especificação	$\leq 6\%$ (USP, 2009)	$5,53 \pm 0,07$ (1,23)
Estearato de magnésio	Teste A: formação de precipitado brando Teste B: determinação do ponto de fusão do resíduo orgânico (F. Bras., 2010)	Conforme especificação	$\leq 6\%$ (USP, 2009)	$3,09 \pm 0,06$ (1,96)

Referências

EUROPEAN PHARMACOPŒIA. 6.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2007.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Fiocruz: Brasília, 2010.

USP 32. UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. The United States Pharmacopeia 32. National Formulary 27: the official compedia of standards. 32. ed. Rockville: U. S. Pharmacopeial, 2009.

ANEXO C

Controle de qualidade dos extratos brutos e fração acetato de etila e avaliação da capacidade antioxidante

C1. Determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2007)

A mesma metodologia descrita em A2 foi aplicada para o controle de qualidade do extrato bruto (EB) e da fração acetato de etila (FAE). Pesaram-se cerca de 0,15 g de EB e 0,07 g de FAE, de acordo com o rendimento, em relação a droga vegetal. Os resultados estão descritos na tabela abaixo (Tabela C1).

Tabela C1. Determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais do extrato bruto (EB) e da fração acetato de etila (FAE).

Amostras	Polifenóis totais média% ± dp (CV%)	Taninos totais média% ± dp (CV%)
EB LabCat	36,63 ± 0,31 (0,84)	27,27 ± 0,96 (3,52)
EB Caetité	42,34 ± 0,27 (0,63)	31,43 ± 0,37 (1,16)
FAE LabCat	81,12 ± 2,26 (2,78)	54,95 ± 1,32 (2,40)
FAE Caetité	68,86 ± 1,79 (2,60)	49,72 ± 2,10 (4,22)

dp = desvio padrão; CV% = coeficiente de variação

Vale ressaltar que a técnica de determinação do teor de polifenóis totais não é uma técnica específica, determinando não somente taninos como também outros polifenóis. Por exemplo, substâncias derivadas do ácido cafeico encontradas em Asteraceae e Lamiaceae demonstraram a capacidade de reagirem com o pó-de-pele, mas não são capazes de curtir o couro (HEGNAUER, 1986). Verza (2006) demonstrou em seus estudos que o pó-de-pele é capaz de complexar flavonoides do meio, o que compromete a especificidade do método.

Esta diferença de teores entre os dois lotes pode ser justificada pelo fato dos constituintes químicos sofrerem variações edafo-climáticas, ou seja, coletas em diferentes épocas do ano e locais, formas de cultivo, condições climáticas, entre outros (FARIAS, 2010; GOBBO-NETTO & LOPES, 2007; KLEIN et al., 2009).

C2. Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (AMAROWICZ et al., 2004)

Os extratos brutos e as frações acetato de etila liofilizadas foram diluídos em 3 mL de metanol, de modo a atingir concentrações de 3 a 8 µg/mL, faixa de concentração pré-determinada de modo a se obter uma curva linear. A estas soluções foram acrescentados

375 µL de solução de DPPH (1 mmol/L). A mistura foi agitada em vortex por 15 s e deixada à temperatura ambiente durante 30 min ao abrigo da luz. As absorvâncias das soluções resultantes foram medidas espectrofotometricamente em 517 nm. Foi utilizado como branco uma solução metanólica de BHT (2 mg em 4 mL de metanol) adicionada de 500 µL de solução de DPPH e como controle negativo, uma solução contendo 3 mL de metanol e 375 µL de solução de DPPH. A atividade de sequestro de radicais (%ASR) foi calculada como porcentagem de descolorimento do DPPH, usando a seguinte equação:

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

Onde, AbsCN é a absorvância do controle negativo e AbsA é a absorvância da amostra.

Os resultados (Tabela C1) foram expressos pela concentração de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH (IC₅₀), obtidos pela equação da reta.

Tabela C2. Capacidade antioxidante de diferentes extratos brutos (EB) e frações acetato de etila (FAE) de *Trichilia catigua* demonstrada pela redução do radical DPPH.

Amostras	IC ₅₀
	Média µg/mL ± dp (CV%)
EB LabCat	4,77 ± 0,14 (3,20)
EB Caetité	6,71 ± 0,28 (4,17)
FAE LabCat	3,16 ± 0,10 (3,22)
FAE Caetité	4,47 ± 0,07 (1,58)
Trolox	6,62 ± 0,07 (1,11)
Vitamina C	4,21 ± 0,15 (3,69)

dp = desvio padrão; CV% = coeficiente de variação

Resende (2007) obteve resultados semelhantes, 5,49 e 3,85 µg/mL para extrato bruto e fração acetato de etila, respectivamente.

Referências

AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J.A.; Freeradical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, v. 84, p. 551–562, 2004.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. *Determination of Tannins in Herbal Drugs*, 6 ed. European Directorate for the Quality of Medicines, pp. A286, 2007.

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. 1ª. Reimp. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010, p.263-288.

GOBBO-NETO L, LOPES NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, p. 374-81, 2007.

HEGNAUER, R. Myriophyllinm Inklusen und Gerbstoffe. In: *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Basel: Birkhäuser Verlag, v. 7, 1986, p.298.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 30, p. 241-248, 2009.

RESENDE, F. O. *Trichilia catigua: avaliação farmacognóstica, fitoquímica e biológica in vitro*. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2007.

VERZA, S.G. *Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados de polivinilpirrolidona*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ANEXO D

Considerações prévias sobre estabilidade

Os extratos de catuaba quando em solução hidrometanólica 20% apresentam instabilidade, caracterizada por mudança de coloração, passando de amarelo claro para alaranjado, conforme descrito no Capítulo 2. As soluções foram estáveis e sem diferença significativa entre as áreas dos picos, em relação ao tempo zero, por 3 dias.

Juntamente com o teste de estabilidade à temperatura ambiente, foi avaliada a propriedade antioxidante, pelo teste de DPPH (metodologia descrita em Anexo C2), durante os 42 dias de análise. Pode-se observar que não houve diferença significativa na atividade antioxidante entre os dias analisados (p -valor = 0,2769; Tabela D1), conclui-se que a mudança na coloração não faz com que o extrato perca sua capacidade antioxidante.

Tabela D1. Capacidade antioxidante (IC_{50}) da solução metanólica de fração acetato de etila (FAE) obtida das cascas de *Trichilia catigua* submetida ao teste de estabilidade à temperatura ambiente.

Tempo (dias)	IC_{50} (μ g/mL)
0	6,57
1	8,06
3	7,60
7	8,82
14	8,58
21	8,47
28	9,02
35	10,90
42	7,93

Geralmente, os compostos que são mais fáceis de oxidar-se são melhores antioxidantes, ou seja, são moléculas capazes de doar um elétron livre ou átomos de hidrogênio para radicais livres reativos (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

As soluções de FAE tornam-se coloridas com o passar do tempo, quando recém preparadas apresentam coloração amarela clara, com o avançar dos dias a solução vai adquirindo cor, assumindo a tonalidade alaranjada, o mesmo perfil pode ser observado pelas substâncias isoladas, como no exemplo abaixo para as cinchonaínas (Figura D1). Martinelli (2010) também observou a alteração da coloração com o passar dos dias para as substâncias isoladas cinchonaínas Ia e Ib.

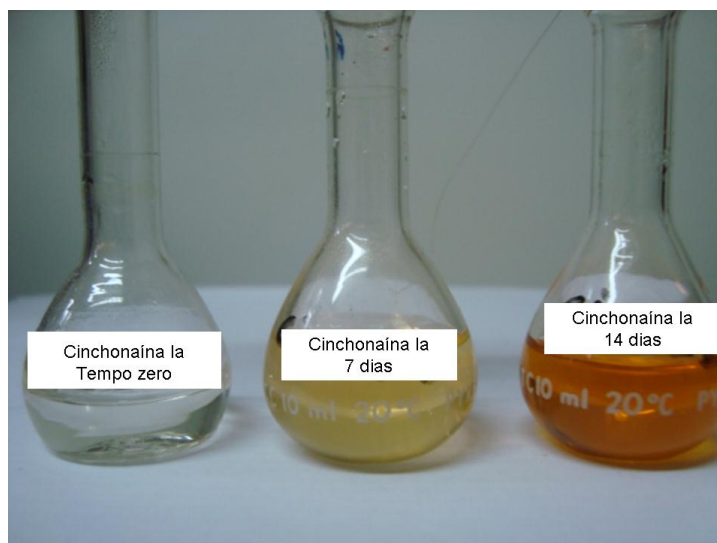


Figura D1. Aspecto das soluções (metanol:água, 20:80) de cinchonaína la nos tempos zero, 7 e 14 dias, expostas à temperatura ambiente.

Na tentativa de esclarecer o que acontece com a solução extrativa de FAE preparou-se uma amostra e após 7 dias a mesma foi submetida à análise por espectrometria de massas LC-ESI-MS (LC: Shimadzu 20AD; microTOF II - ESI-TOF Mass Spectrometer, Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA).

Ao comparar os cromatogramas a 425 nm da FAE recém preparada e após 7 dias percebe-se que o pico em 19,6 min diminui sua intensidade (Figura D2). A Figura D3 mostra o perfil de UV de ambas e a Figura D4 o espectro de massas. Para ambas as amostras os espectros são os mesmos diferindo um pouco em intensidade para a amostra após 7 dias no pico a 19,6 min.

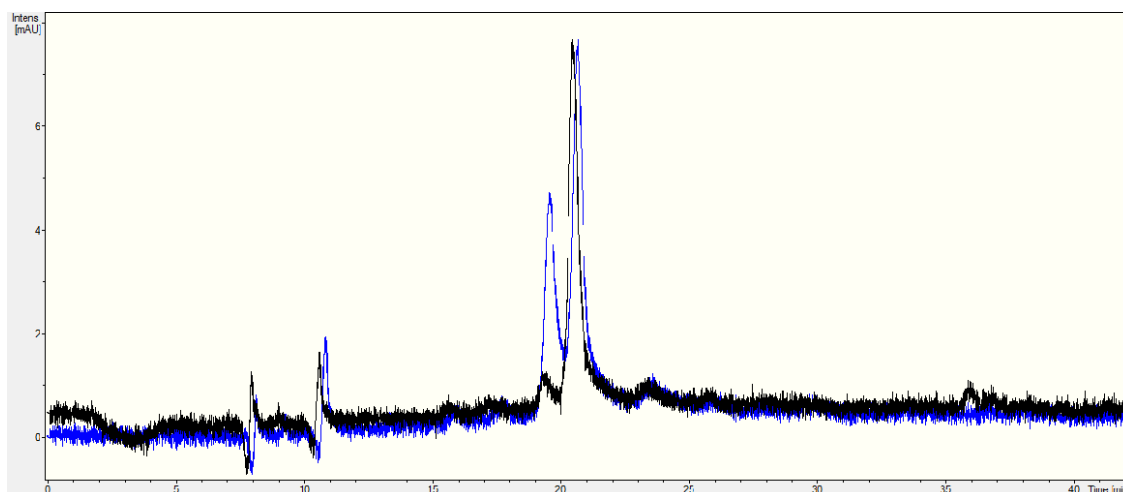


Figura D2. Cromatograma obtido para a amostra de FAE em 425 nm de uma amostra recém preparada (azul) e uma amostra com 7 dias de preparo (preto).

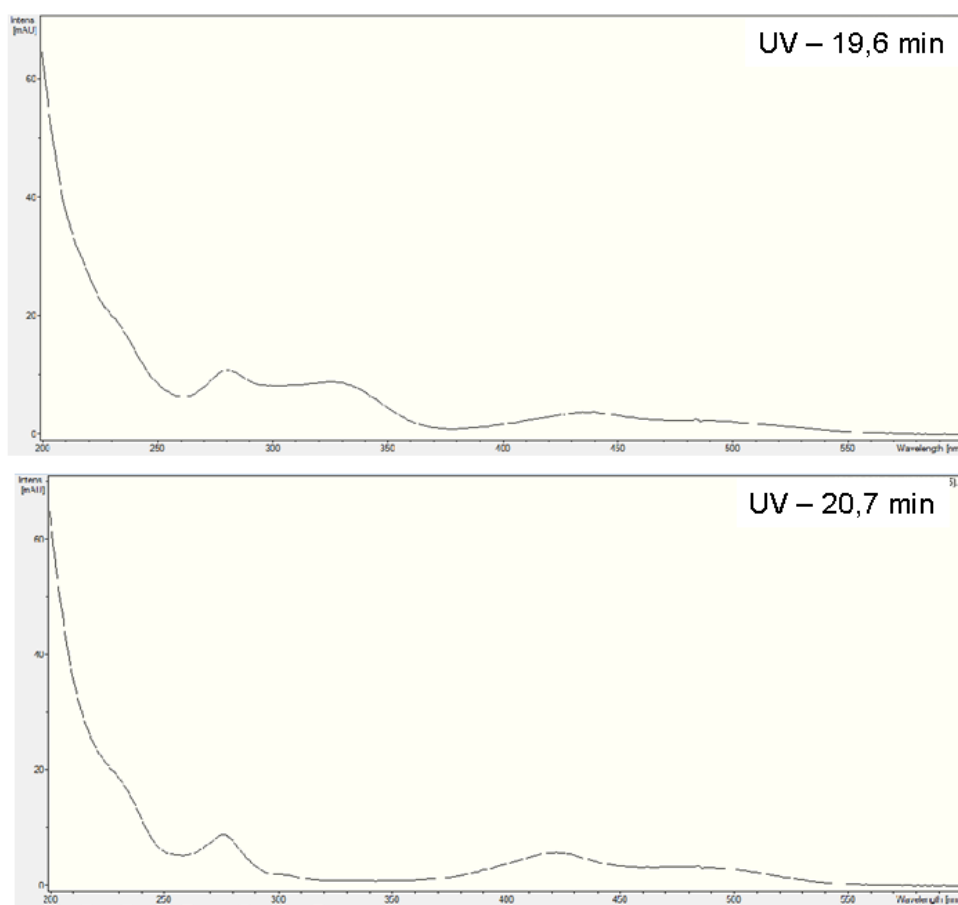


Figura D3. Espectro de ultravioleta (UV) obtido para a amostra de FAE recém preparada para os picos com tempo de retenção em 19,6 e 20,7 min, respectivamente.

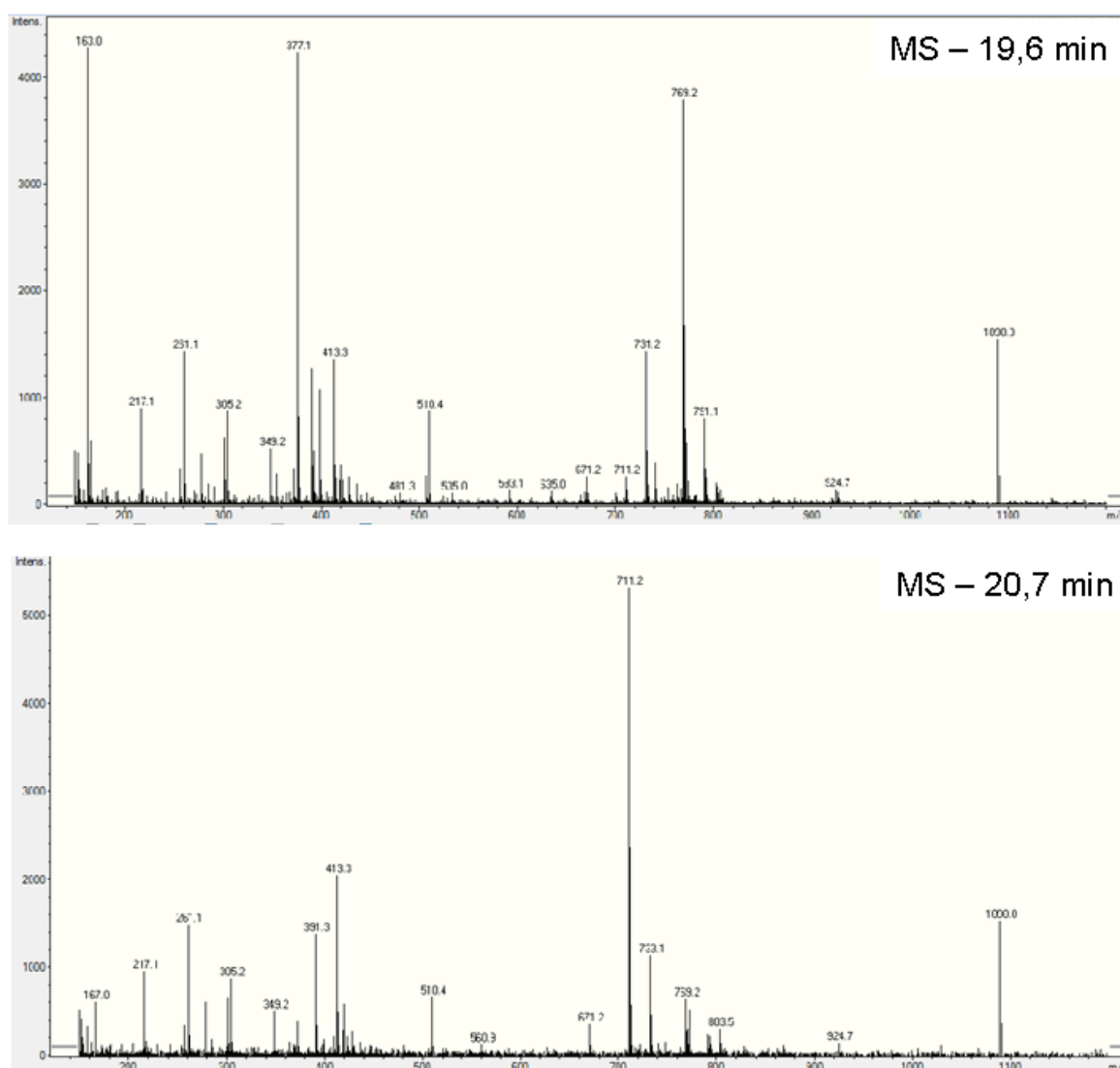


Figura D4. Espectro de massas (MS) obtido para a amostra de FAE recém preparada para o pico em 19,6 e 20,7 min, respectivamente.

Foi possível obter uma razão m/z 377 e 711 para os picos em 19,6 e 20,7 min, respectivamente. Não foi possível, no entanto, propor uma estrutura, ficando em aberto para estudos futuros.

Martinelli (2010) também avaliou a estabilidade de solução metanólica 50% de cinchonaínas Ia e Ib, extraídas da catuaba, e de extrato hidroalcoólico das cascas da catuaba, durante 14 dias. A autora observou a mesma mudança de coloração, passando do amarelo claro para o alaranjado. O produto de degradação das cinchonaínas foi avaliado através do LC-MS, constatando que houve uma perda de 4 hidrogênios em sua estrutura, indicando a oxidação da molécula nos grupos catecólicos. Castañeda-Ovando e colaboradores (2009) propuseram um mecanismo via radical livre para a estabilização da semiquinona formada a partir da oxidação da cianidina, uma antocianina estruturalmente

muito semelhante aos derivados fenilpropanoides flavan-3-óis, assim, pode-se inferir que possivelmente aconteça o mesmo mecanismo.

Em catecóis a oxidação é realizada por meio de radicais livres, formando um radical semiquinona muito estável. Os compostos com grupos catecol ou 1,4-hidroquinona são especialmente fáceis de oxidar porque o radical fenóxi pode ser estabilizado com oxigênio. Esta espécie é bastante estável e não retira hidrogênio de outras substâncias, tempo suficiente para reagir com outra semiquinona e originar uma reação de desprotonação que gera uma quinona e um grupo fenol utilizando dois radicais (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Lonni (2012 – comunicação pessoal) em estudos prévios observou que formulações semissólidas também apresentaram mudanças de coloração em 3 dias, sendo necessária a proteção do extrato por meio de uma emulsão múltipla. Nos estudos de estabilidade das emulsões múltiplas observou que as formulações armazenadas à temperatura ambiente (25 °C), em geladeira e em freezer não sofreram alteração no aspecto, cor e odor por 90 dias. Os resultados demonstraram estabilidade desta formulação contendo extrato bruto de *T. catigua*. Porém, quando armazenado a 40 °C e 75% de umidade relativa, houve alteração na cor e uma diminuição do conteúdo de polifenóis totais (LONNI, 2012).

Uma vez constatada a instabilidade dos extratos é necessário protegê-lo da luz e umidade, assim, para estudos futuros deve-se considerar revestir os comprimidos.

Referências

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M.L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M.E.; RODRÍGUEZ, J.A.; GALÁN-VIDAL, C.A., *Food. Chemistry*, v. 113, p. 859-871, 2009.

LONNI, A.A.S.G. Desenvolvimento e caracterização de formulação de uso tópico contendo extrato padronizado de *Trichilia catigua* para fins cosméticos. 2012. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

MARTINELLI, F.R. Cinchonaínas – método cromatográfico e produção de padrões para controle de qualidade de extratos polares de catuaba (*Trichilia catigua* Adr. Juss.). Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Química, 2010.

ANEXO E

Distribuição granulométrica dos extratos secos por aspersão

Lote 1

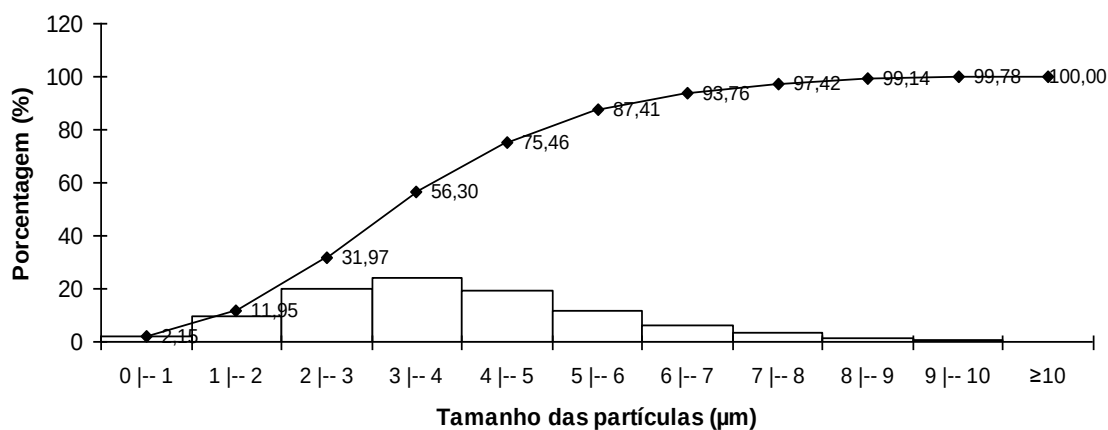


Figura E1. Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L1 (aerosil:maltodextrina, 25:75, 10% sólidos totais) de *T. catigua*.

Lote 2

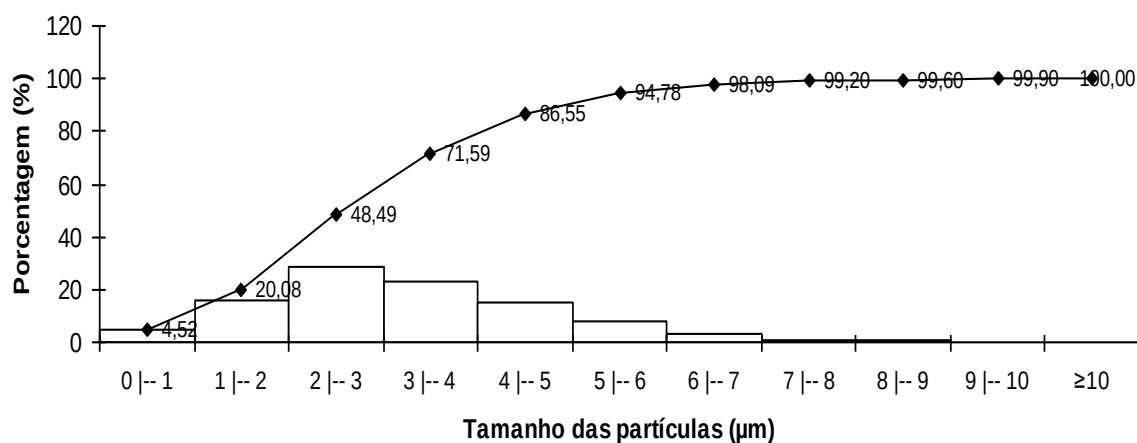


Figura E2. Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L2 (aerosil:maltodextrina, 50:50, 10% sólidos totais) de *T. catigua*.

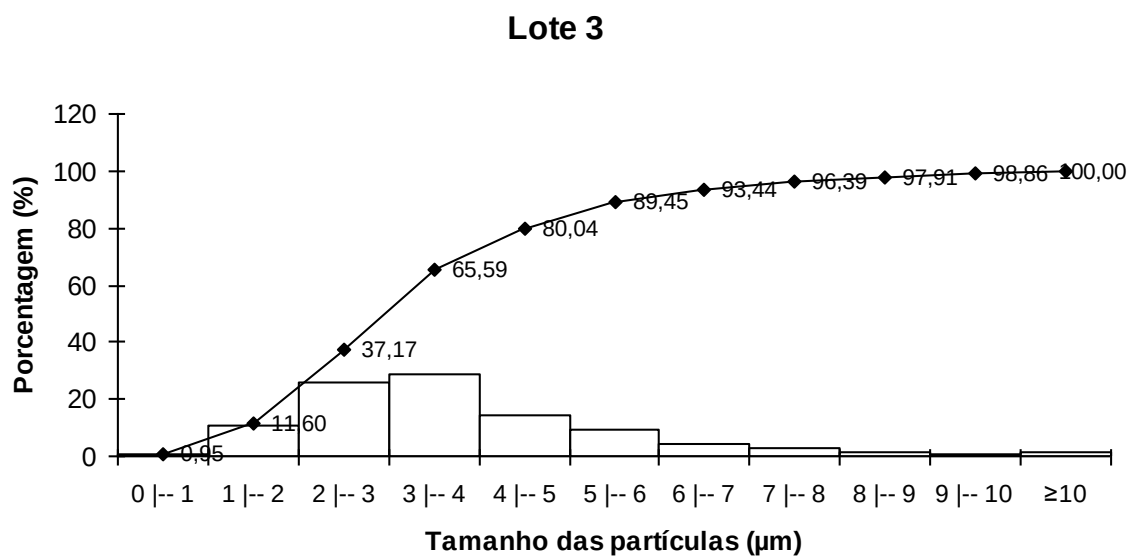


Figura E3. Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L3 (aerosil:maltodextrina, 75:25, 10% sólidos totais) de *T. catigua*.

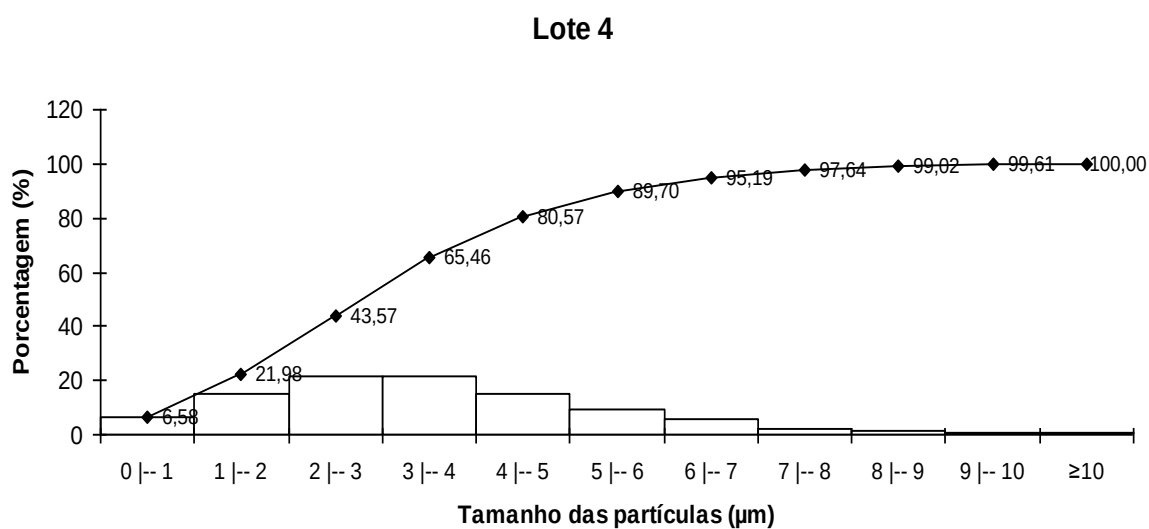


Figura E4. Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L4 (aerosil:maltodextrina, 25:75, 20% sólidos totais) de *T. catigua*.

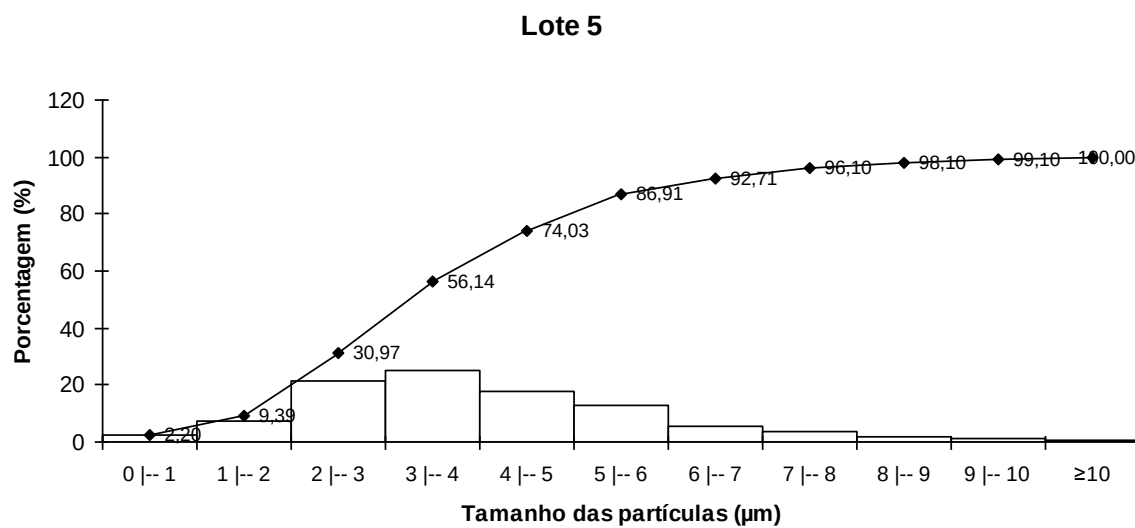


Figura E5. Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L5 (aerosil:maltodextrina, 50:50, 20% sólidos totais) de *T. catigua*.

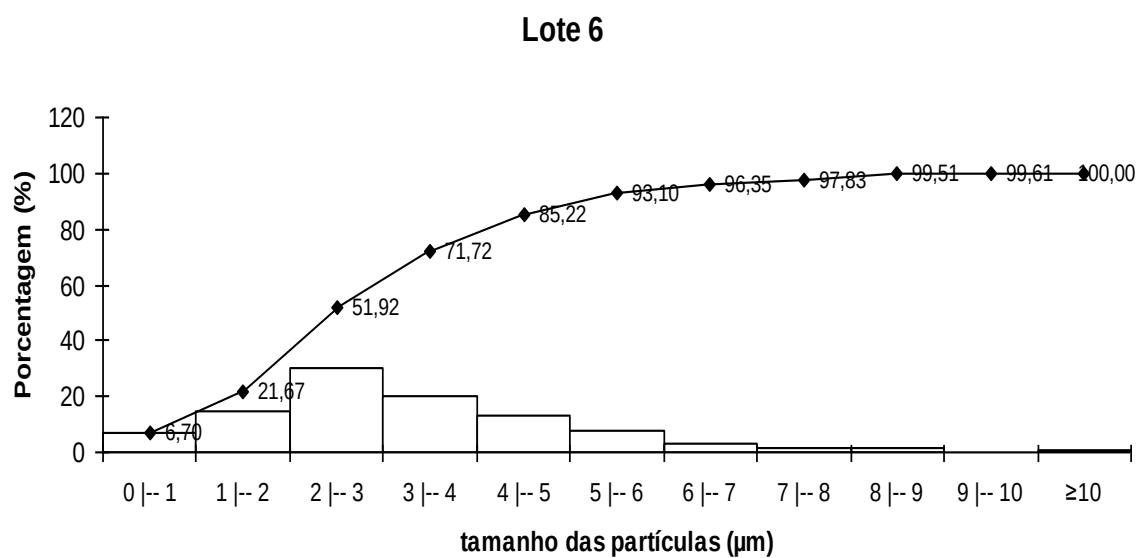


Figura E6. Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L6 (aerosil:maltodextrina, 75:25, 20% sólidos totais) de *T. catigua*.

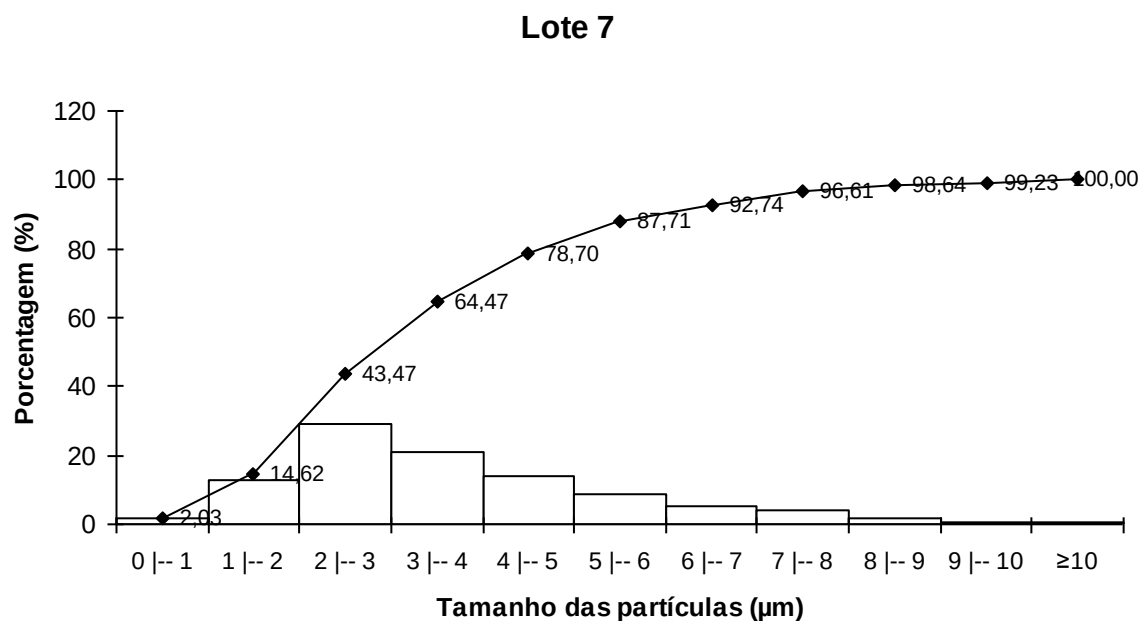


Figura E7. Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L7 (aerosil, 20% sólidos totais) de *T. catigua*.

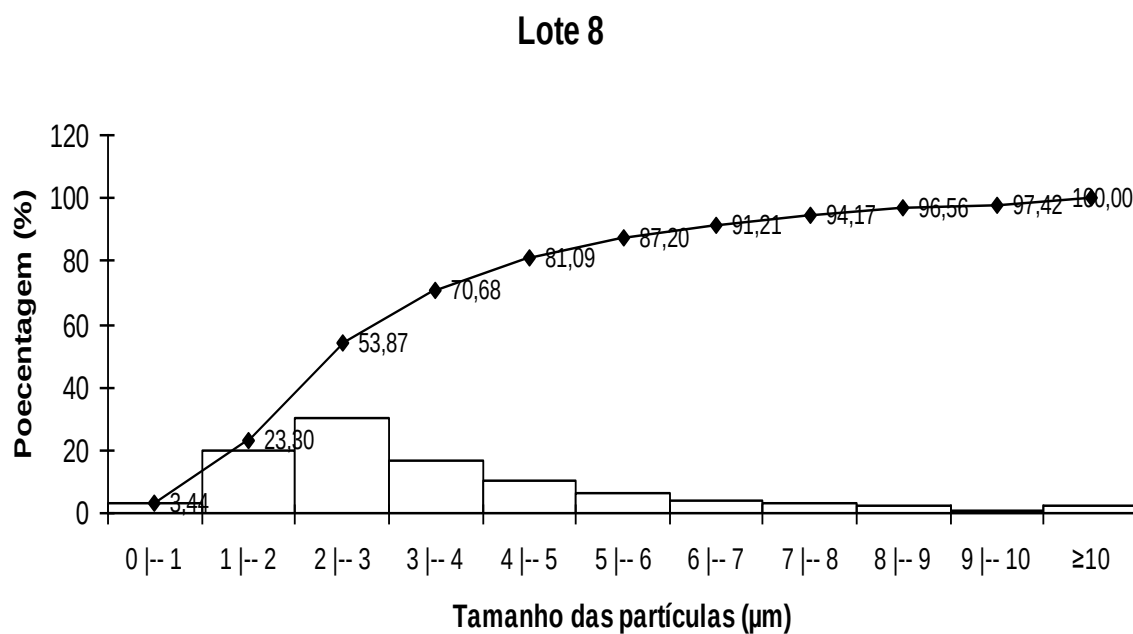


Figura E8. Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L8 (lactose, 20% sólidos totais) de *T. catigua*.

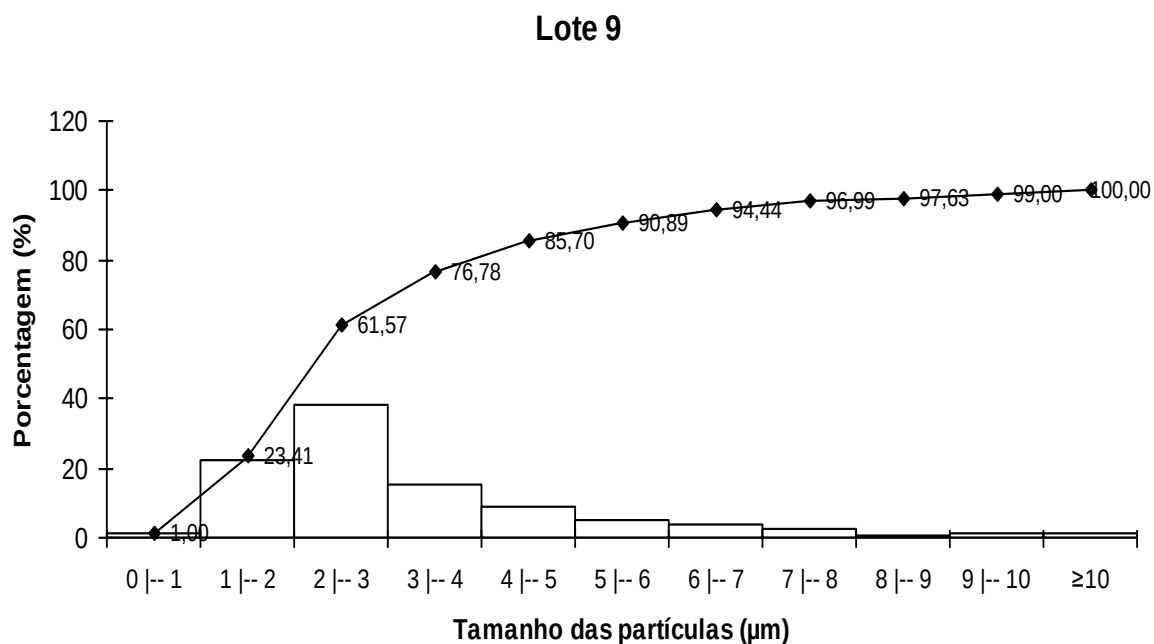


Figura E9. Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L9 (aerosil:lactose, 25:75, 20% sólidos totais) de *T. catigua*.

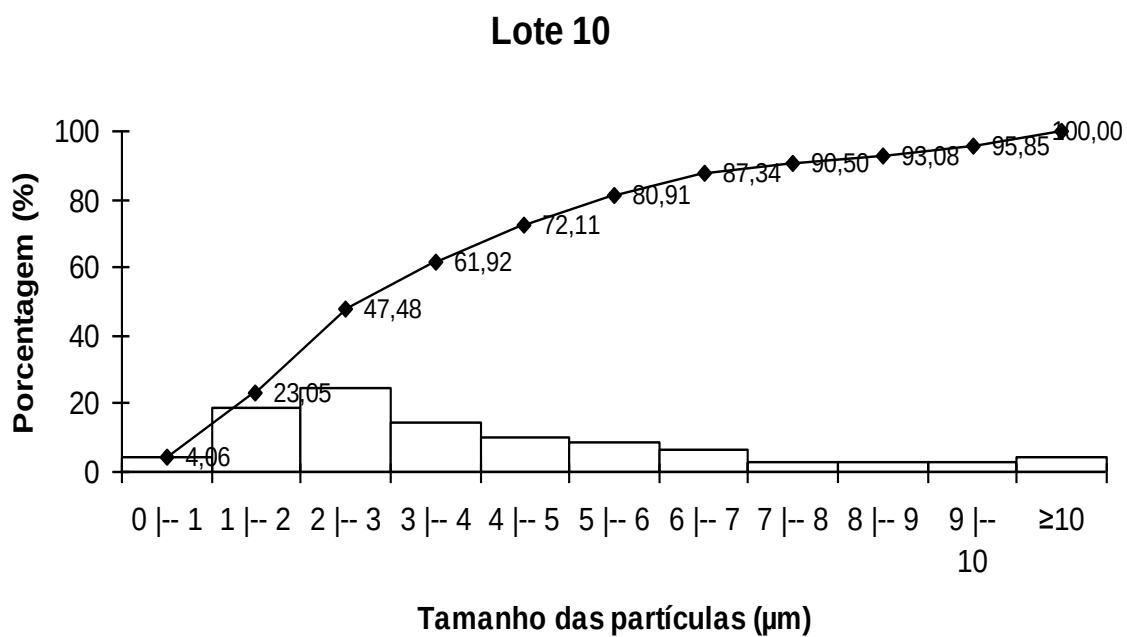


Figura E10. Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L10 (aerosil:lactose, 50:50, 20% sólidos totais) de *T. catigua*.

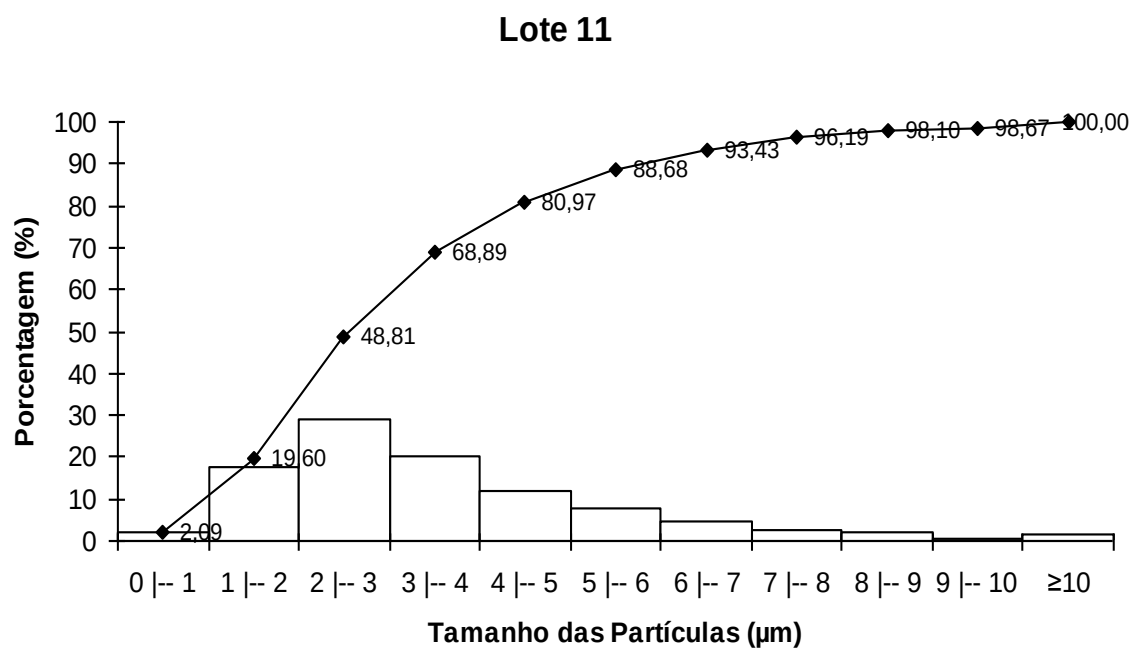


Figura E11. Distribuição granulométrica do extrato seco obtido por aspersão lote L11 (aerosil:lactose, 75:25, 20% sólidos totais) de *T. catigua*.

ANEXO F

Fotomicrografia dos extratos secos obtidos por aspersão

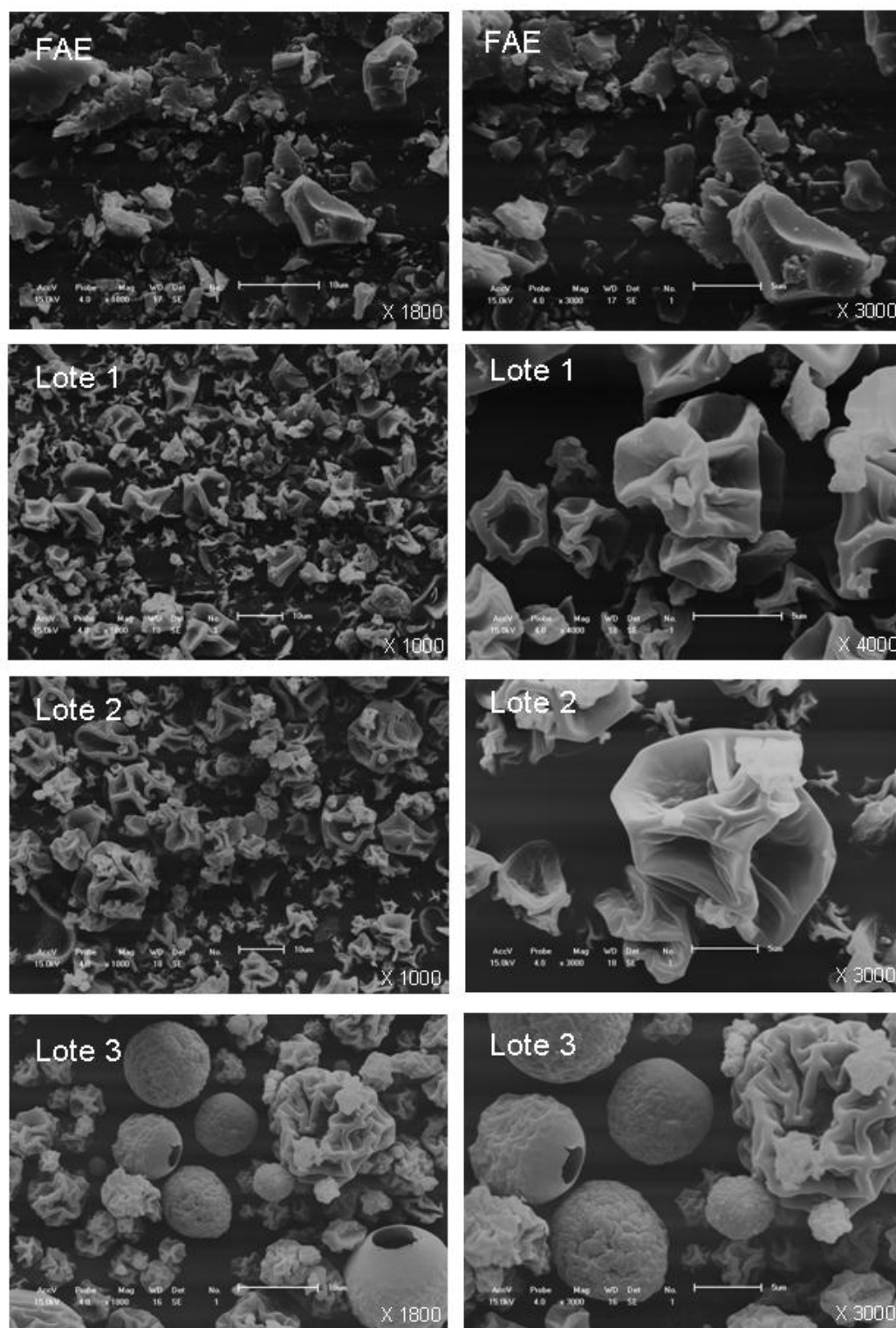


Figura F1. Fotomicrografia da fração acetato de etila (FAE), dos extratos secos obtidos por aspersão (L1-L11) e dos adjuvantes de secagem, referentes ao Capítulo 3.

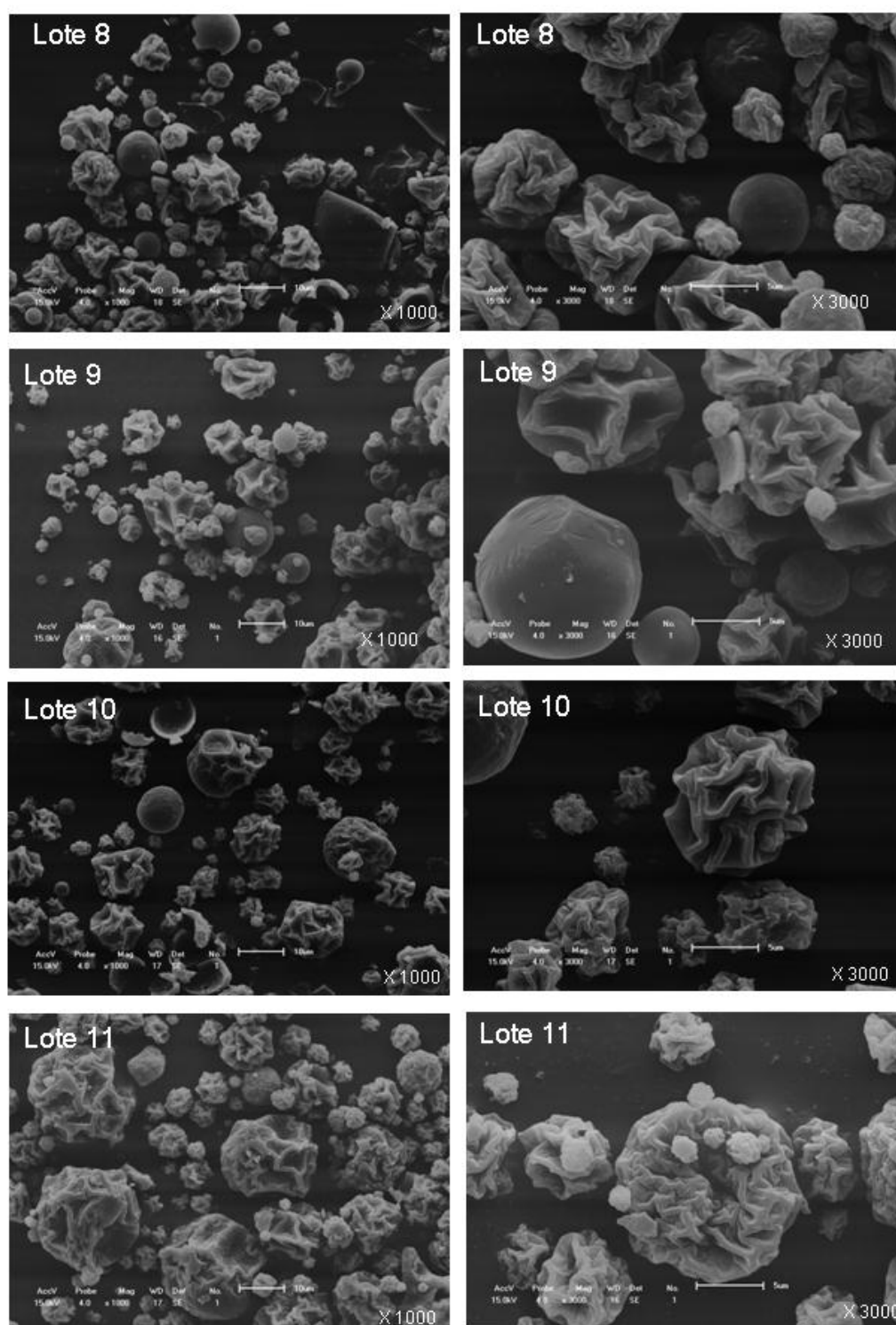


Figura F1. Fotomicrografia da fração acetato de etila (FAE), dos extratos secos obtidos por aspersão (L1-L11) e dos adjuvantes de secagem, referentes ao Capítulo 3 (Continuação).

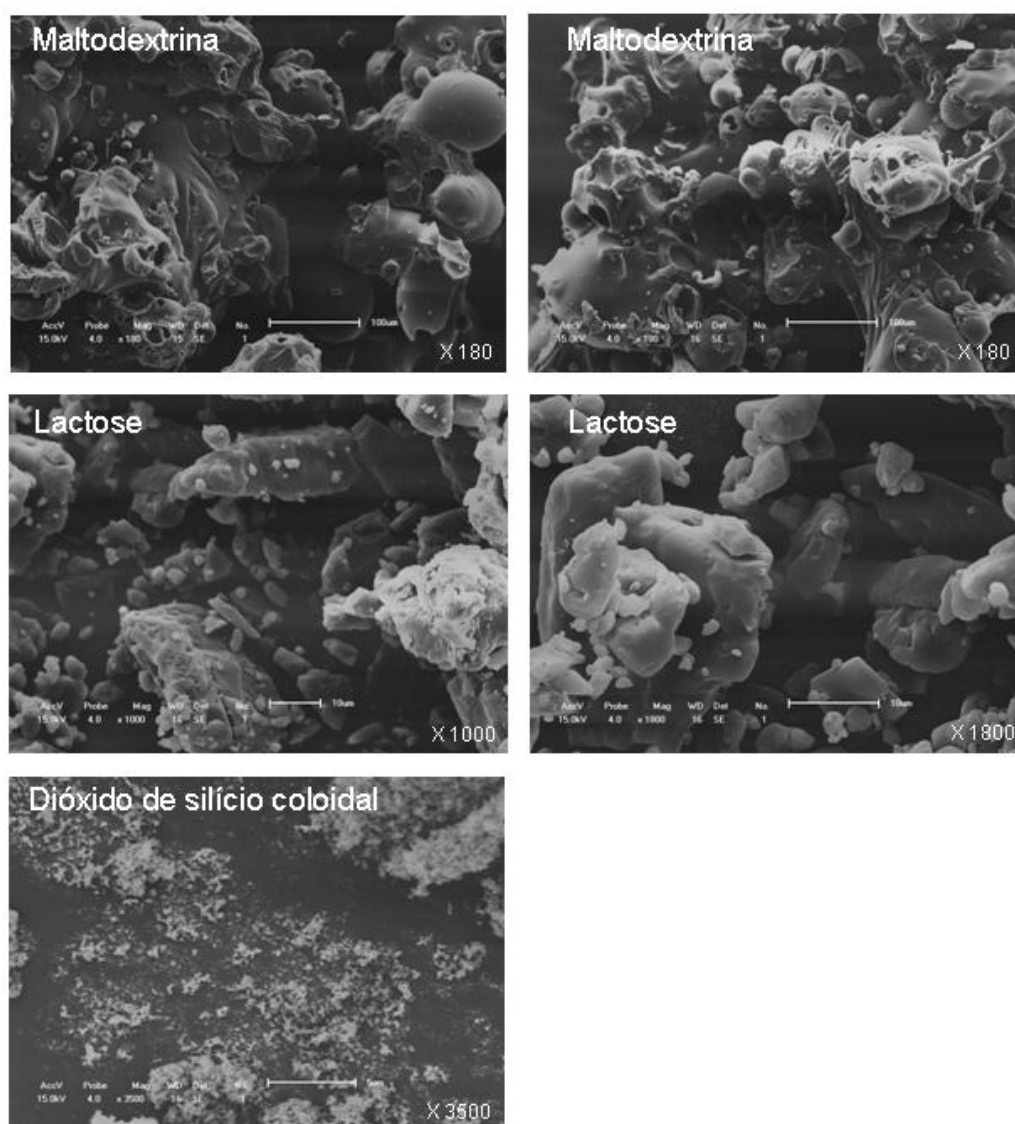


Figura F1. Fotomicrografia da fração acetato de etila (FAE), dos extratos secos obtidos por aspersão (L1-L11) e dos adjuvantes de secagem, referentes ao Capítulo 3 (Continuação).

ANEXO G**Avaliação da capacidade antioxidante em plasma de camundongos**

A camundongos Swiss macho foi administrada oralmente por gavagem a dose de 400 mg/kg de FAE. O tratamento foi realizado uma vez ao dia durante 14 dias consecutivos, conforme Bonassoli e colaboradores (2012). Após o sacrifício o sangue foi coletado e encaminhado ao Laboratório PALAFITO.

As amostras de sangue foram centrifugadas em microcentrífuga refrigerada (Eppendorf, Centrífuga 5415R) a 23 °C, a 4000 rpm, por 15 min.

G1. Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical ABTS – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) – em plasma de camundongos Swiss machos (SENEVIRATNE et al., 2009)

A solução estoque de ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico), Sigma] 8 mmol/L foi obtida através da dissolução de 10 mg/comprimido de ABTS em 2,43 mL de água destilada, a solução foi homogeneizada e estocada em frasco de vidro âmbar e armazenado em temperatura ambiente.

A solução estoque de persulfato de potássio (Synth) foi obtida dissolvendo-se 10,5 mg de persulfato de potássio em 13 mL de água destilada, gerando uma solução de 3 mmol/L. A amostra foi homogeneizada e guardada em frasco de vidro âmbar e armazenada em temperatura ambiente. O radical ABTS^{•+} foi misturado com a solução de persulfato de potássio. A mistura foi protegida da luz e armazenada em temperatura ambiente por 12 a 16 h. A formação do radical ABTS^{•+} foi avaliada pela absorvância a 734 nm. A solução de ABTS^{•+} foi diluída com água até obter absorvância de 0,70 (± 0,02) em 734 nm. A amostra de plasma (20 µL) foi adicionada a solução de ABTS^{•+} (2,9 mL) e solução salina tampão fosfato (80 µL, 5 mmol/L, pH = 7,4). A redução da absorvância foi medida a 734 nm após 5 min, contra branco de solução salina

O Trolox foi utilizado como substância padrão para a comparação da atividade antioxidante. Uma curva de calibração descrevendo a porcentagem de inibição da absorvância como uma função da concentração de Trolox foi preparada. A curva de calibração variou na concentração de 1 a 7 µg/mL de Trolox. A 1 mL de solução de ABTS^{•+} foram adicionados 10 µL de cada concentração de trolox. Os resultados foram expressos como equivalente a µg/mL de Trolox.

A Figura G1 representa a reação colorida e o descolorimento do radical ABTS^{•+} em presença de Trolox e os resultados dos experimentos estão demonstrados na Tabela G1.

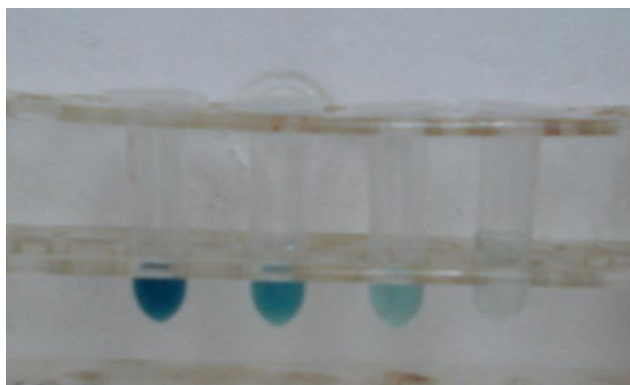


Figura G1. Descoramento do radical $ABTS^{•+}$ quando adicionado de diferentes concentrações de Trolox.

Tabela G1. Capacidade antioxidante em plasma da fração acetato de etila (FAE), imipramina e solução salina após 14 dias de tratamento via oral por gavagem.

Grupos de Amostra	IC ₅₀
	Média (µg/ml) ± dp (CV%)
FAE	5,12 ± 0,17 (2,27)
Imipramina	7,19 ± 0,75 (10,4) ^a
Salina	6,82 ± 0,19 (2,79) ^a

dp = desvio padrão; CV% = coeficiente de variação, letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras

Os resultados indicam a possibilidade de determinar a concentração das substâncias antioxidantes disponíveis no plasma. Pode-se observar que a FAE mantém sua atividade antioxidante, mesmo após 14 dias de tratamento crônico, indicando continuidade de sua ação dentro do organismo. Os animais tratados com imipramina e salina também apresentaram uma boa capacidade antioxidante, porém não tão boa quanto da FAE, além do mais, não houve diferença significativa entre elas (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Esta técnica tem alguns limitantes. Primeiro, quando é necessário fazer cortes histológicos do cérebro é importante não retirar o sangue do animal, para que não comprometa os cortes sequenciais. Como os camundongos são pequenos, consegue-se extrair pouco sangue e algumas amostras se perderam, isto justifica o alto coeficiente de variação encontrado para a imipramina. Para este teste conseguiu-se coletar amostras de sangue de apenas 2 animais.

O outro fator limitante é a instabilidade do radical $ABTS^{•+}$, a solução sofre um clareamento com o passar do tempo, devido à reação química, eletroquímica ou enzimática, onde o radical é capturado, passando de uma coloração verde-escura para verde-clara (RUFINO et al., 2007).

G1. Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH em plasma de camundongos Swiss machos (MARTINEZ et al., 2006)

Para as amostras de plasma, foi aliquotado 0,1 mL de plasma e adicionaram-se 0,9 mL de metanol, e cada amostra foi submetida ao vortex por 30 s e centrifugada a 10000 rpm durante 30 min. Após centrifugação, 0,6 mL do sobrenadante foi coletado e adicionado a 2,4 mL de DPPH 0,115 mmol/L. A absorvância foi lida após 1 h a 517 nm, em espectrofotômetro de ultravioleta (Shimadzu UV/Vis PC-1650), contra o branco preparado da mesma forma, porém, sem adição da amostra.

A técnica foi padronizada, mas os resultados obtidos por ela não foram satisfatórios, pois quando os protocolos foram estabelecidos não foi possível repetir os testes para verificar a funcionalidade da técnica, por falta de amostras. O que se pode dizer é que o trolox apresentou 60% de inibição do radical DPPH. Os grupos tratados com FAE, imipramina e solução salina apresentaram porcentagem de inibição menor que 6%. Não foi possível determinar a concentração de IC₅₀, pois a curva de trolox não foi realizada. Assim, foi verificado que a coleta de sangue prejudicava os testes subsequentes, por este motivo não foi dada continuidade aos ensaios, ficando em aberto para estudos futuros.

Recentemente, a capacidade antioxidante em plasma foi determinada através de parceria com a Universidade Estadual de Londrina, na pessoa do professor Doutor Décio Sabbatini e da mestrande Chiara Bortalasci. A técnica utilizada é a TRAP (*total plasma antioxidant capacity*), onde a capacidade antioxidante é medida por quimioluminescência (REPETTO et al., 1996). Os resultados apresentados não demonstraram atividade antioxidante no plasma, pois as amostras de plasma que foram analisados são da prole masculina cujas mães foram submetidas ao tratamento crônico com extrato bruto de *T. catigua*. Outros estudos devem ser desenvolvidos futuramente para determinar a concentração de FAE no plasma de animais tratados.

Referências

- BONASSOLI, V.T.; CHASSOT, J.M.; LONGHINI, R.; MILANI, H.; MELLO, J.C.P.; OLIVEIRA, R.M.W. Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice, *Journal of Ethnopharmacology*, n. 143, p. 179-184, 2012.
- MARTINEZ, S.; VALEK, L.; REŠETIĆ, J.; FERENEC RUŽIĆ D. Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity – comparison with the DPPH and TAS spectrophotometric methods. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, n. 588, p. 68-73, 2006.
- REPETTO M.; REIDES, C.; CARRETERO, M.L.G.; COSTA, M.; GRIEMBERG, G.; LLESUY, S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clinica Chimica Acta*, v. 255, p. 107-117, 1996.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. *Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela caputra do radical livre ABTS^{•+}*. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical, 4p, 2007. (Comunicado Técnico online: 128). Disponível em: http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Cot_128.pdf

SENEVIRATNE, K.N.; HAPUARACHCHI, C.D.; EKANAYAKE, S. Comparison of the phenolic-dependent antioxidant properties of coconut oil extracted under cold and hot conditions. *Food Chemistry*, v. 114, p. 1444-1449, 2009.

RENATA LONGHINI



Nascimento	20 de julho de 1979 Maringá/PR – Brasil
1999-2004	Graduação em Farmácia com habilitação em Farmácia Industrial na Universidade Estadual de Maringá - PR
2004-2006	Mestrado em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFRGS – Sob a orientação do Prof. Tit. Dr. Pedro Ros Petrovick
2008-2013	Doutorado em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UEM – Sob a orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Produção científica relacionada a esta tese:

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*, n. 137, p. 1143– 1148, 2011.

BONASSOLI, V.T.; CHASSOT, J.M.; LONGHINI, R.; MILANI, H.; MELLO, J.C.P.; OLIVEIRA, R.M.W. Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, n. 143, p. 179-184, 2012.

LONGHINI, R.; KLEIN, T.; SILVA JUNIOR, W.V. da; RODRIGUES, J.; LOPES, N.P.; MELLO, J.C.P. de. 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*, v. 36, p. 1247-1254, 2013.