



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

DIEGO IGOR ALVES FERNANDES DE ARAÚJO

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para
quantificação de compostos fenólicos e avaliação da
atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato de
Maytenus obtusifolia Mart. (Celastraceae)**

JOÃO PESSOA – PB

2015

DIEGO IGOR ALVES FERNANDES DE ARAÚJO

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para
quantificação de compostos fenólicos e avaliação da
atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato de
Maytenus obtusifolia Mart. (Celastraceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de Farmacoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva
Segundo orientador: Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

JOÃO PESSOA – PB

2015

A663d Araújo, Diego Igor Alves Fernandes de.
Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para
quantificação de compostos fenólicos e avaliação da atividade
antioxidante e antimicrobiana do extrato de *Maytenus
obtusifolia* Mart. (Celastraceae) / Diego Igor Alves Fernandes
de Araújo.- João Pessoa, 2015.
229f. : il.
Orientadores: Marcelo Sobral da Silva, Josean Fechine
Tavares
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. *Maytenus obtusifolia* Mart.
3. Controle de qualidade. 4. Desenvolvimento e validação
analítica. 5. Fotoestabilidade. 6. Atividade antioxidante.
7. Atividade antimicrobiana.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

DIEGO IGOR ALVES FERNANDES DE ARAÚJO

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para
quantificação de compostos fenólicos e avaliação da
atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato de
Maytenus obtusifolia Mart. (Celastraceae)**

COMISSÃO EXAMINADORA

Aprovado em: 21/08/2015



Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva
Universidade Federal da Paraíba – UFPB
Orientador

Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo
Universidade Federal da Paraíba – UFPB
Examinador Interno



Profa. Dra. Elisangela Afonso de Moura Mendonça
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
Examinador Externo

*Dedico este trabalho a minha família,
Francisco, Jacinta e Priscylla,
por todo amparo, educação e amor concedido;
À minha querida esposa **Anny Palloma,**
por todo carinho, amor e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ter me guiado até aqui, amparando e confortando minha alma nos momentos difíceis desta caminhada. Por me mostrar que é possível sonhar mais um sonho.

Ao meu pai **Francisco Alves** e minha mãe **Maria Jacinta Fernandes**, por serem meus exemplos de amor, afeto e dedicação. Por terem acreditado em meus sonhos e me dado todo suporte e incentivo que precisei para que eu não desistisse diante dos obstáculos.

À minha irmã **Priscylla Rayama**, que sempre esteve presente em minha caminhada, mesmo à distância, por meio de suas palavras amigas e encorajadoras. Por me proporcionar o verdadeiro amor fraterno.

À minha esposa **Anny Palloma**, que sempre esteve ao meu lado e soube acalantar-me com palavras ternas. Por me ensinar a viver um dia de cada vez e acreditar em um mundo melhor. Pela sua paciência e compreensão em todos os momentos que me ausentei do convívio familiar para a execução dos experimentos deste trabalho.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva**, pela confiança depositada, competência e hombridade. Por ser uma das minhas maiores referências acadêmicas. Meus sinceros agradecimentos pela orientação deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Josean Fechine Tavares**, pela orientação neste trabalho, por sua competência e preocupação.

Ao **Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho**, pela oportunidade que me foi dada de fazer parte do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF-UFPB) e por me iniciar na vida científica.

Ao **Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares**, pelos concessão dos padrões analíticos utilizados neste estudo.

À **Camila Figueiredo**, por ter me acompanhado e auxiliado nos primeiros passos da minha iniciação científica. Meu sincero agradecimento, por todos os ensinamentos, pelos conselhos e dedicação.

Aos meus amigos do setor de Pesquisa e Desenvolvimento da HEBRON, **Jaqueline Aragão, Hauana Maciel, Thiago Souza e Taysa Timóteo** pelo

companheirismo e convívio saudável. Em especial à **Tatiana Mirela**, pelos conselhos, pela paciência e disposição ao me ajudar.

Aos amigos farmacêuticos da HEBRON, por todos os momentos vivenciados, pela amizade e incentivo. **Berenyce Estevão, Priscilla Regina, Umberto Souza e Weverton Magno**.

Aos companheiros de laboratório de Controle de Qualidade, **Nelson, Max, Tina, Valdice, Erivânia, Maria, Welton, Ana, Dayana e Priscila**, pelas experiências que passamos no dia-a-dia, pela atenção e disposição para ajudar.

Aos amigos da turma de Mestrado, em especial a **Evandro Ferreira, Luciano Leite, Tatiana Kélvia, Rayssa Duarte, Tatiana Mota, Vivianne Manguiera, Priscilla Maciel, Flávio Vasconcelos, Kaio Aragão, Cris Husein, Márcio Cahino, Paula Benvindo, Rose Ramos e Ayala Nara**, pelos formidáveis momentos que passamos ao longo das disciplinas.

Ao meu amigo **Sandro Leal**, pela amizade, pelos conselhos e dicas da pós-graduação.

Aos professores do programa de pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, **Fátima Vanderlei, Emídio Cunha, Bagnólia Araújo, Mariana Sobral e Demétrius Araújo**, pelos ensinamentos que levarei comigo.

Obrigado!

*“Você nunca está velho demais
para ter um novo objetivo
ou sonhar um sonho novo.”*

Clive Staples Lewis

RESUMO

A utilização de produtos naturais para o tratamento de enfermidades é uma prática tradicional respaldada pela etnofarmacologia. A espécie *Maytenus obtusifolia* Mart (Celastraceae) é conhecida popularmente como carne de anta, congonha brava de folha miúda e lenha branca, e é bastante utilizada para tratamentos de úlcera gástrica e como antisséptico. Apresenta distribuição em regiões litorâneas ocorrendo desde o estado do Pará até São Paulo. Estudos anteriores da espécie relataram a presença de triterpenos pentacíclicos, flavonoides e alcaloides em sua composição química. E os estudos farmacológicos demonstraram atividade antimicrobiana do óleo essencial e atividade gastroprotetora e antiúlcera do extrato. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram realizar o controle de qualidade do material vegetal através dos ensaios farmacopéicos, desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação de compostos fenólicos no extrato etanólico de *M. obtusifolia* (EEMO), verificar a fotoestabilidade dos compostos em estudo e avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana do extrato. Foram avaliadas a determinação de água em drogas vegetais, determinação de cinzas totais e cinzas sulfatadas, ensaio limite de metais pesados, determinação de densidade aparente de sólidos, teor de flavonoides totais, taninos totais e determinação de contaminação microbiológica de acordo com as metodologias descritas na farmacopeia brasileira 5ª edição. A quantificação de fenólicos totais foi realizada por método espectrofotométrico utilizando o ácido ascórbico como padrão. Observou-se que a espécie apresenta riqueza de compostos polifenólicos visto que obteve-se (134,76 mg EAG/g \pm 0,377) no ensaio de compostos fenólicos totais, bem como (17,85% \pm 0,234) de taninos totais, (4,72% \pm 0,102) de flavonoides totais calculados como apigenina e (6,24% \pm 0,064) de flavonoides calculados como hiperosídeo. O método analítico foi desenvolvido e validado por CLAE-DAD para os marcadores (-)-Epigallocatequina (EGC), (+)-Catequina (CAT) e (-)-Epicatequina (EPI) e apresentou especificidade, linearidade, precisão, precisão intermediária, exatidão e robustez de acordo com as especificações exigidas pela ANVISA no Guia de Validação de métodos analíticos e bioanalíticos (RE nº 899/2003). O EEMO apresentou pequenas variações no teor do marcador CAT (7,594%) e seu isômero EPI (4,718%) quando exposto à luz visível, enquanto concentração da (-)-Epigallocatequina manteve-se inalterada. Quando avaliado sob radiação UVA, observou-se redução significativa de EGC (36,180%), CAT (17,293%) e EPI (29,878%). A atividade antioxidante foi realizada através do método indireto com radical DPPH e apresentou resultados tão eficientes (CI₅₀ 21,01 \pm 1,02 μ g/mL), quanto o padrão Ácido ascórbico (CI₅₀ 19,17 \pm 2,32 μ g/mL), cujo uso é consagrado como antioxidante. A avaliação da atividade antimicrobiana do EEMO foi realizada nas concentrações de 1024 até 32 μ g/mL, pela técnica de microdiluição em meio líquido frente a 4 cepas bacterianas e 8 fúngicas e observou-se que as concentrações de 1024, 512, 256 e 128 μ g/mL apresentaram atividade frente às bactérias e fungos.

Palavras-chave: *Maytenus obtusifolia* Mart.; Controle de qualidade; Desenvolvimento e validação analítica; Fotoestabilidade; Atividade antioxidante; Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The use of natural products for the treatment of diseases is a traditional practice supported by ethnopharmacology. The species *Maytenus obtusifolia* Mart (Celastraceae) is popularly known as carne de anta, congonha brava de folha miúda e lenha branca, and is often used for gastric ulcer treatments and as an antiseptic. It presents distribution in coastal regions occurring from the state of Pará to São Paulo. Previous studies of the species reported the presence of pentacyclic triterpenoids, flavonoids and alkaloids in its chemical composition. And the pharmacological studies have demonstrated antimicrobial activity of essential oil and gastroprotective activity and antiulcer for the extract. Thus, the objectives of this paper was to perform quality control of plant material through pharmacopeial trials, to develop and validate analytical methodology for quantification of phenolic compounds in ethanol extract of *M. obtusifolia* (EEMO), ascertain the photostability of the compounds under study and evaluate the antioxidant and antimicrobial activities from extract. The determination of water in vegetable drugs, determination of total ash and sulphated ash, heavy metals limit test, determination of bulk density solids, total flavonoid content, total tannin and determination of microbiological contamination were evaluated in accordance with the methods described in Brazilian pharmacopoeia 5th edition. The quantification of total phenolic was performed by spectrophotometric method using ascorbic acid as standard. It was observed that the species has a wealth of polyphenolic compounds since there was obtained (134,76 mg GAE / g \pm 0,377) in the assay of total phenolic compounds , as well as (17,85% \pm 0.234) of total tannins, (4,72 \pm 0,102 %) of total flavonoids and calculated as apigenin and (6,24% \pm 0,064) flavonoids calculated as hyperoside. The analytical method was developed and validated HPLC-PDA for markers (-)-Epigallocatechin (EGC), (+)-Catechin (CAT) and (-)-Epicatechin (EPI) and showed specificity, linearity, precision, intermediate precision, accuracy and robustness in accordance with the specifications required by ANVISA in the Guide to Validation of analytical and bioanalytical methods (RE nº 899/2003). The EEMO showed small variations in the CAT marker content (7,594 %) and its isomer EPI (4,718 %) when exposed to visible light, while the concentration of (-)-Epigallocatechin remained unchanged. When assessed under UVA radiation, there was a significant reduction EGC (36,180 %), CAT (17,293 %) and EPI (29,878 %). The antioxidant activity was performed using the indirect method with DPPH radical and presented efficient results (IC₅₀ 21,01 \pm 1,02 μ g/mL), as the standard ascorbic acid (IC₅₀ 19,17 \pm 2,32 μ g/mL) whose use is established as an antioxidant. The evaluation of the antimicrobial activity from EEMO was performed at concentrations from 1024 to 32 μ g/mL, using the technique of microdilution in liquid medium against 4 bacterial and 8 fungal strains and it was observed that the concentrations of 1024, 512, 256 and 128 μ g/mL showed activity against bacteria and fungi.

Palavras-chave: *Maytenus obtusifolia* Mart.; Quality control; Development and Analytical Validation; Photostability; Antioxidant activity; Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribuição da família Celastraceae no mundo.....	30
Figura 2. Mapa de distribuição do gênero Maytenus no mundo.....	33
Figura 3. Maytenus obtusifolia Mart. no local de coleta, município de Santa Rita....	45
Figura 4. Mapa de distribuição da espécie Maytenus obtusifolia Mart.....	47
Figura 5. Aspecto de um ramo de Maytenus obtusifolia Mart. (a) Ramo com flores. (b) Detalhe da inflorescência. (c) Ramo com frutos.....	48
Figura 6. Núcleo flavano.....	58
Figura 7. Esquema de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). (a) reservatório da fase móvel; (b) Bomba; (c) auto injetor; (d) coluna; (e) detector; (f) software de aquisição.....	70
Figura 8. Regiões da estrutura flavonoidica com potencial antioxidante.....	80
Figura 9. Estrutura do DPPH antes e após a reação com o antioxidante.....	81
Figura 10. Cromatógrafo líquido acoplado a detector DAD Young Lin®.....	99
Figura 11. Câmara de fotoestabilidade Mecalor® modelo EC/0,2/AR-F.....	119
Figura 12. Curva de calibração (5 – 200 µg/mL) para doseamento de fenólicos totais expressos em equivalentes de Ácido gálico.....	134
Figura 13. Cromatograma dos padrões detectáveis pela metodologia analítica desenvolvida em 280 nm. 1. Ácido clorogênico (12,3min); 2. Ácido trans-caféico (14,2 min); 3. (-)-Epicatequina (16,3 min); 4. Daidzina (20,1 min); 5. Glicitina (21,5 min); 6. Ácido ferrúlico (23,1 min); 7. Rutina (24,7 min); 8. Hyperosídeo (25,2 min); 9. Luteolina-7-glicosídeo (26,1 min); 10. Genistina (26,4 min); 14. Daidzeína (36,2 min); 15. Gliciteína (26,4 min).....	140
Figura 14. Espectros UV e bandas máximas de absorção dos marcadores (-)- Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina.....	140

Figura 15. Cromatograma do padrão (-)-Epigallocatequina avaliado no parâmetro especificidade.....	142
Figura 16. Cromatograma do padrão (+)-Catequina avaliado no parâmetro especificidade.....	142
Figura 17. Cromatograma do padrão (-)-Epicatequina avaliado no parâmetro especificidade.....	142
Figura 18. Cromatograma do extrato etanólico de <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart. avaliado no parâmetro especificidade.....	143
Figura 19. Cromatograma da fase móvel avaliada no parâmetro especificidade...	143
Figura 21. Cromatograma da solução extrativa (etanol 96%) avaliada no parâmetro especificidade.....	144
Figura 22. Pureza de pico dos marcadores (a) (-)-Epigallocatequina, (b) (+)-Catequina e (c) (-)-Epicatequina avaliadas no parâmetro especificidade.....	145
Figura 23. Regressão linear da curva de calibração (0,010 – 0,100 mg/mL) para o marcador (-)-Epigallocatequina.....	149
Figura 24. Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador (-)-Epigallocatequina.....	149
Figura 25. Regressão linear da curva de calibração (0,0040 – 0,0400 mg/mL) para o marcador (+)-Catequina.....	151
Figura 26. Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador (+)-Catequina.....	151
Figura 27. Regressão linear da curva de calibração (0,0033 – 0,0330 mg/mL) para o marcador (-)-Epicatequina.....	153
Figura 28. Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador (-)-Epicatequina.....	153

Figura 29. Intervalo do marcador (-)-Epigallocatequina.....	166
Figura 30. Intervalo do marcador (+)-Catequina.....	167
Figura 31. Intervalo do marcador (-)-Epicatequina.....	168
Figura 32. Fotoestabilidade do marcador (-)-Epigallocatequina.....	180
Figura 33. Fotoestabilidade do marcador (+)-Catequina.....	180
Figura 34. Fotoestabilidade do marcador (-)-Epicatequina.....	181

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. <i>Representação estrutural do alcaloide Maitansina e do triterpeno Tingenona.....</i>	31
Quadro 2. <i>Espécies do gênero Maytenus com atividades biológicas descritas.....</i>	34
Quadro 3. <i>Constituintes químicos isolados de espécies do gênero Maytenus.....</i>	37
Quadro 4. <i>Constituintes químicos isolados de Maytenus obtusifolia Mart.....</i>	49
Quadro 5. <i>Precusores, enzimas e produtos formados na via dos ácidos fenólicos.....</i>	55
Quadro 6. <i>Estruturas básicas das principais classes de flavonoides.....</i>	59
Quadro 7. <i>Classes de flavonoides e suas propriedades.....</i>	61
Quadro 8. <i>Enzimas envolvidas no processo de biossíntese de várias classes de flavonoides.....</i>	67
Quadro 9. <i>Marcadores utilizados na validação de Maytenus obtusifolia Mart. e suas respectivas estruturas.....</i>	97

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Representação geral da biossíntese dos ácidos fenólicos derivados da via do ácido chiquímico.....	54
Fluxograma 2. Representação geral da biossíntese de flavonoides.....	66
Fluxograma 3. Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas de <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ensaaios de controle de qualidade do material vegetal de <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	85
Tabela 2. Condições cromatográficas avaliadas no desenvolvimento do método.....	100
Tabela 3. Descrição das condições cromatográficas para análise do extrato etanólico de <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	101
Tabela 4. Parâmetros avaliados na validação analítica do Extrato Etanólico de <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	102
Tabela 5. Descrição dos parâmetros avaliados na robustez do extrato etanólico de <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	118
Tabela 6. Teores de água obtidos através das metodologias “Determinação de água em drogas vegetais”, “Determinação da perda por dessecação” e “Determinação de água em balança de infravermelho” (n = 5), na droga vegetal <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	125
Tabela 7. Teores de cinzas totais obtidos através das metodologias para “Determinação de cinzas totais” e “Determinação de cinzas sulfatadas” (n = 5), na droga vegetal <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	127
Tabela 8. Densidades aparente obtidas através da metodologia para “Determinação de densidade aparente de sólidos” (n = 5), na droga vegetal <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	129
Tabela 9. Índices de espuma obtidos através da metodologia para “Determinação do índice de espuma” (n = 5), na droga vegetal <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	129

Tabela 10. Teores de flavonoides totais obtidos através das metodologias para “Doseamento de flavonoides totais calculados como Apigenina” e “Doseamento de flavonoides totais calculados como Hiperosídeo” (n = 5), na droga vegetal e extrato etanólico de <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	131
Tabela 11. Teores de taninos totais obtidos através da metodologia para “Doseamento de taninos totais” (n = 5), na droga vegetal e extrato etanólico de <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	133
Tabela 12. Teores de compostos fenólicos totais obtidos através da metodologia para “Doseamento de compostos fenólicos totais” (n = 5), na droga vegetal e extrato etanólico de <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	135
Tabela 13. Teores de contaminação microbiana obtidos através das metodologias para “Contagem total de bactérias”, “Contagem total de fungos e leveduras”, na droga vegetal <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	136
Tabela 14. Pesquisa de patógenos “Bactérias gram-negativas bile tolerantes”, “ <i>Escherichia coli</i> ” e “ <i>Salmonella</i> ” segundo métodos farmacopéicos na droga vegetal <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	137
Tabela 15. Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador (-)-Epigallocatequina (n=33).....	148
Tabela 16. Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador (+)-Catequina (n=33).....	150
Tabela 17. Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador (-)-Epicatequina (n=33).....	152
Tabela 18. Equações das retas obtidas para cada marcador nas repetições do parâmetro linearidade.....	154

Tabela 19. Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrída do marcador (-)-Epigalocatequina para o Analista 1.....	155
Tabela 20. Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrída do marcador (-)-Epigalocatequina para o Analista 2.....	155
Tabela 21. Dados obtidos no parâmetro Precisão inter-corrída do marcador (-)-Epigalocatequina comparando-se os resultados das análises das Analistas 1 e 2.....	156
Tabela 22. Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrída do marcador (+)-Catequina para o Analista 1.....	157
Tabela 23. Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrída do marcador (+)-Catequina para o Analista 2.....	157
Tabela 24. Dados obtidos no parâmetro Precisão inter-corrída do marcador (+)-Catequina comparando-se os resultados das análises das Analistas 1 e 2.....	158
Tabela 25. Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrída do marcador (-)-Epicatequina para o Analista 1.....	159
Tabela 26. Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrída do marcador (-)-Epicatequina para o Analista 2.....	159
Tabela 27. Dados obtidos no parâmetro Precisão inter-corrída do marcador (-)-Epicatequina comparando-se os resultados das análises das Analistas 1 e 2.....	160
Tabela 28. Dados do parâmetro Exatidão para o marcador (-)-Epigalocatequina..	162
Tabela 29. Dados do parâmetro Exatidão para o marcador (+)-Catequina.....	163
Tabela 30. Dados do parâmetro Exatidão para o marcador (-)-Epicatequina.....	164
Tabela 31. Dados obtidos no parâmetro intervalo para o marcador (-)-Epigalocatequina (n=15).....	165

Tabela 32. <i>Dados obtidos no parâmetro intervalo para o marcador (+)-Catequina (n=15).....</i>	166
Tabela 33. <i>Dados obtidos no parâmetro intervalo para o marcador (-)-Epicatequina (n=15).....</i>	167
Tabela 34. <i>Dados obtidos para a robustez no parâmetro alteração de fluxo da fase móvel.....</i>	170
Tabela 35. <i>Dados obtidos para a robustez no parâmetro alteração da temperatura de forno de coluna.....</i>	171
Tabela 36. <i>Dados obtidos para a robustez no parâmetro alteração de pH da fase móvel.....</i>	172
Tabela 37. <i>Dados obtidos para a robustez no parâmetro alteração da composição da fase móvel.....</i>	173
Tabela 38. <i>Dados obtidos para a robustez no parâmetro alteração de coluna cromatográfica.....</i>	173
Tabela 39. <i>Dados obtidos para a robustez no parâmetro avaliação da estabilidade de soluções.....</i>	174
Tabela 40. <i>Resultados do estudo de fotoestabilidade com amostras de Maytenus obtusifolia Mart., submetidas a luz visível.....</i>	176
Tabela 41. <i>Resultados do estudo de fotoestabilidade com amostras de Maytenus obtusifolia Mart., submetidas ao UVA.....</i>	177
Tabela 42. <i>Resultados do estudo de fotoestabilidade com amostras de Maytenus obtusifolia Mart., variações entre as exposições à luz visível.....</i>	178
Tabela 43. <i>Resultados do estudo de fotoestabilidade com amostras de Maytenus obtusifolia Mart., variações entre as exposições ao UVA.....</i>	179

Tabela 44. Resultados da avaliação da atividade antioxidante do extrato das folhas *Maytenus obtusifolia* Mart. pela técnica do DPPH utilizando ácido ascórbico como controle positivo..... 183

Tabela 45. Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima- CIM ($\mu\text{g/mL}$) do extrato de *M. obtusifolia* Mart. sobre bactérias - Técnica de microdiluição..... 184

Tabela 46. Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima - CIM ($\mu\text{g/mL}$) do extrato de *M. obtusifolia* Mart sobre fungos - Técnica de microdiluição..... 185

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Por cento; percentual

< - Menor que

± - Mais ou menos

® - Marca registrada

µg/ mL - Micrograma por mililitro

µS/cm - Microsiemens por centímetro

µL - Microlitro

µm - Micrômetro

µM - Micromolar

AA - Atividade Antioxidante

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHT - 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CG - Cromatografia Gasosa

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de Diodos

CAT – (+)-Catequina

cm - Centímetro

C8 - Octilsilano

CI50 - Concentração inibitória para se obter 50% de atividade antioxidante

C18 - Octadecilsilano

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DP - Desvio Padrão

DPR - Desvio Padrão Relativo

EEMO - Extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia*

EGC – (-)-Epigallocatequina

EPI – (-)-Epicatequina

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

et al. - E colaboradores

EUA - Estados Unidos da América

g - Gramas

g/L - Gramas por litro
h - Horas
ICH - International Conference on Harmonisation
IV - Infravermelho
L - Litro
LOD - Limit of detection
LOQ - Limit of quantification
m – Metro
Mart - Martius
MeCN – Acetonitrila
MeOH - Metanol
mg - Miligrama
min - Minuto
mL - Mililitro
mL/min - Mililitros por minuto
mg/mL - Miligrama por mililitro
mm - Milímetro
MA - Massachusetts
n - Número de amostras
n° - Número
nm - Nanômetro
°C - Grau Celsius
OH - Ohio
pH - Potencial hidrogeniônico
pKa - Constante de dissociação ácida
RNM – Ressonância nuclear magnética
r - Coeficiente de correlação
r² - Coeficiente de determinação
redox – Redução-oxidação
UFPB – Universidade Federal da Paraíba
UV - Ultravioleta
UV-VIS - Ultravioleta-visível
watt.horas/m² - watt.horas por metro quadrado
WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1. Introdução	25
2. Objetivos	28
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	28
2.2 <i>Objetivo Específico</i>	28
3 Fundamentação teórica	30
3.1 <i>Considerações sobre a família Celastraceae</i>	30
3.2 <i>Considerações sobre o gênero Maytenus</i>	33
3.3 <i>Maytenus obtusifolia Mart.</i>	44
3.4 <i>Compostos fenólicos</i>	51
3.4.1 <i>Ácidos fenólicos</i>	52
3.4.2 <i>Flavonoides</i>	58
3.4.2.1 <i>Propriedades biológicas dos flavonoides</i>	61
3.4.2.2 <i>Biossíntese de flavonoides</i>	62
3.5 <i>Cromatografia</i>	68
3.5.1 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	68
3.6 <i>Controle de qualidade de produtos naturais</i>	70
3.7 <i>Validação de metodologia analítica</i>	72
3.7.1 <i>Seletividade / Especificidade</i>	73
3.7.2 <i>Linearidade</i>	73
3.7.3 <i>Precisão</i>	74
3.7.4 <i>Exatidão</i>	75
3.7.5 <i>Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)</i>	75
3.7.6 <i>Robustez</i>	75
3.8 <i>Estudos de fotoestabilidade</i>	76
3.9 <i>Atividades biológicas</i>	77
3.9.1 <i>Atividade antimicrobiana</i>	77
3.9.2 <i>Atividade antioxidante</i>	78
4. Parte experimental	83
4.1 <i>Material Botânico</i>	83
4.2 <i>Processamento das folhas de Maytenus obtusifolia Mart.</i>	83
4.3 <i>Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas</i>	83

4.4 Controle de qualidade do material vegetal.....	84
4.4.1 Determinação de água em drogas vegetais.....	85
4.4.2 Determinação de cinzas.....	87
4.4.2.1 Determinação de cinzas totais.....	87
4.4.2.2 Determinação de cinzas sulfatadas.....	87
4.4.3 Ensaio limite de metais pesados.....	88
4.4.4 Densidade aparente de sólidos.....	89
4.4.5 Determinação do índice de espuma.....	90
4.4.6 Doseamento de flavonoides totais.....	90
4.4.7 Doseamento de taninos totais.....	93
4.4.8 Doseamento de compostos fenólicos totais.....	95
4.4.9 Determinação da contaminação microbiológica.....	95
4.5 Padronização química.....	97
4.5.1 Substâncias químicas de referência.....	97
4.6 Solventes e reagentes.....	98
4.7 Desenvolvimento de metodologia analítica.....	98
4.8 Validação de metodologia analítica.....	101
4.8.1 Especificidade.....	103
4.8.2 Linearidade.....	103
4.8.3 Precisão.....	109
4.8.4 Repetibilidade.....	110
4.8.5 Precisão Intermediária.....	110
4.8.6 Exatidão.....	111
4.8.7 Intervalo.....	113
4.8.8 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	116
4.8.9 Robustez.....	117
4.9 Estudo de fotoestabilidade do EEB de <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	118
4.10 Avaliação das atividades biológicas.....	120
4.10.1 Avaliação da atividade antioxidante com radical DPPH.....	120
4.10.1.1 Análise estatística.....	120
4.11 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico de <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	121
5. Resultados e Discussão.....	125

5.1	Controle de qualidade do material vegetal.....	125
5.1.1	Determinação de água em drogas vegetais.....	125
5.1.2	Determinação de cinzas.....	127
5.1.3	Ensaio limite de metais pesados.....	128
5.1.4	Densidade aparente de sólidos.....	128
5.1.5	Determinação do índice de espuma.....	129
5.1.6	Doseamento de flavonoides totais.....	130
5.1.7	Doseamento de taninos totais.....	132
5.1.8	Doseamento de compostos fenólicos totais.....	134
5.1.9	Determinação da contaminação microbiológica.....	136
5.1.10	Desenvolvimento de metodologia analítica.....	138
5.2	Validação de metodologia analítica.....	141
5.2.1	Especificidade.....	141
5.2.2	Linearidade.....	145
5.2.3	Precisão.....	154
5.2.4	Exatidão.....	161
5.2.5	Intervalo.....	164
5.2.6	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	168
5.2.7	Robustez.....	168
5.3	Estudo de fotoestabilidade do EEB de <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	174
5.4	Avaliação das atividades biológicas.....	181
5.4.1	Avaliação da atividade antioxidante com radical DPPH.....	181
5.4.2	Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico de <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	183
6.	Conclusões	187
	Referências	191

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas e produtos naturais com fins terapêuticos é uma prática antiga, fundamentada na medicina popular. A partir da experimentação e aplicação das plantas medicinais para prevenir e tratar diversas doenças, o homem percebeu o potencial das substâncias naturais, que apresentavam importantes atividades biológicas (DREWS, 2000).

A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas, entretanto, o reino vegetal contribui com a maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura. A variedade e a complexidade das moléculas que constituem os metabólitos secundários de plantas e organismos marinhos ainda é inalcançável por métodos laboratoriais. Isto seria a consequência direta de milhões de anos de evolução, atingindo um refinamento elevado de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 2003).

Segundo Calixto e colaboradores (2001), estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microrganismos e 3% de animais.

O Brasil é o país que apresenta a maior floresta tropical e a maior biodiversidade vegetal do mundo. Estima-se a existência de aproximadamente dois milhões de espécies distintas entre animais, vegetais e microrganismos (RIBEIRO et al., 1999). Desta forma, nosso país desponta com grande potencial no desenvolvimento de medicamentos oriundos de produtos naturais.

No entanto, o aproveitamento dessa biodiversidade para a produção de medicamentos à base de plantas ainda é muito escasso, constituindo-se numa tarefa complexa, devido à dificuldade de integração das diversas áreas do conhecimento necessárias para completar a cadeia de produção dos fitomedicamentos. A falta de tecnologias apropriadas, a dificuldade de obtenção de matérias-primas com a qualidade desejada e a inexistência de metodologias e

especificações de controle de qualidade para a maioria das espécies conhecidas ameaçam a segurança do consumo destes produtos (BASSANI et al., 2005).

O processamento de insumos vegetais para a produção de medicamentos exige conhecimentos além dos acumulados com a etnofarmacologia, demandando pesquisas de metodologias analíticas, padronização do controle de qualidade e boas práticas de fabricação para a garantia da qualidade do produto (SIMÕES et al, 2007).

Visando regular a produção de medicamentos que utilizem produtos naturais no país, a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde elaborou requisitos legais para a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos e uso de insumos de origem vegetal através da portaria SVS nº 6 de 31 de janeiro de 1995. Desde então outras resoluções foram publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com objetivo de padronizar as técnicas de análise destes insumos. Atualmente, a resolução em vigor é a RDC nº 26 de 13 de maio de 2014, que estabelece os requisitos mínimos para o registro e renovação de registro de medicamentos fitoterápicos.

A qualidade de um medicamento fitoterápico é assegurada através da qualidade de seus insumos, das técnicas utilizadas para a produção e do uso de métodos analíticos validados que assegurem a padronização das especificações para o controle de qualidade do produto final (SOARES, 2001; FARIAS, 2004). A necessidade de produzir fitomedicamentos seguros para o consumo constitui um desafio para o controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos, pois, as metodologias validadas e descritas nas literaturas oficiais são bastante escassas, principalmente no que concerne às plantas nativas do país.

Com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos, bem como elucidar a composição química de espécies nativas do nordeste brasileiro, tomou-se como objeto de estudo a espécie *Maytenus obtusifolia* Mart., pertencente ao gênero *Maytenus* e à família Celastraceae. Estudos com esta espécie relataram a ocorrência de flavonoides, alcaloides, terpenóides, entre outros, com registro de relevante atividade gastroprotetora, antimicrobiana e depressora do sistema nervoso central, destacando o potencial farmacológico da espécie. (GONZALEZ et al., 1989; ITOKAWA et al., 1994; GUNATILAKA, 1996; SOUSA & ALMEIDA, 2005; MOTA, 2009; MEDEIROS, 2010; DEEPA & BAI, 2010).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Contribuir com o estudo farmacognóstico do gênero *Maytenus* da família Celastraceae por meio do estudo fitoquímico e farmacológico de *Maytenus obtusifolia* Mart.

2.2 Específicos

Realizar controle de qualidade do material vegetal seco, com padronização de metodologias e especificações;

Desenvolver metodologia analítica para determinação quantitativa dos marcadores fitoquímicos (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina em extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Validar o método desenvolvido segundo Resolução nº 899/2003 (ANVISA);

Avaliar a fotoestabilidade do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. por exposição da amostra em câmara de fotoestabilidade;

Avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. por método DPPH;

Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. frente às cepas;

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações sobre a família Celastraceae

A família Celastraceae é composta por 98 gêneros e aproximadamente 1.264 espécies, apresentando-se geralmente como árvores ou arbustos (MEDEIROS et al., 2010; MOSSI et al., 2010). As plantas desta família são amplamente encontradas em regiões tropicais e subtropicais, incluindo o norte da África, América do Sul e algumas partes do leste da Ásia, particularmente na China (SPIVEY et al., 2002). São pouco representadas nas zonas temperadas (Figura 1, p. 30) (RIBEIRO et al., 1999; JUDD et al., 2002; CARVALHO-OKANO et al., 2004). No Brasil são encontrados predominantemente quatro gêneros: *Maytenus* Juss., *Austroplenckia* Lund., *Franhofera* Mart. e *Salacia* Mart. (SIMMONS et al., 2008).

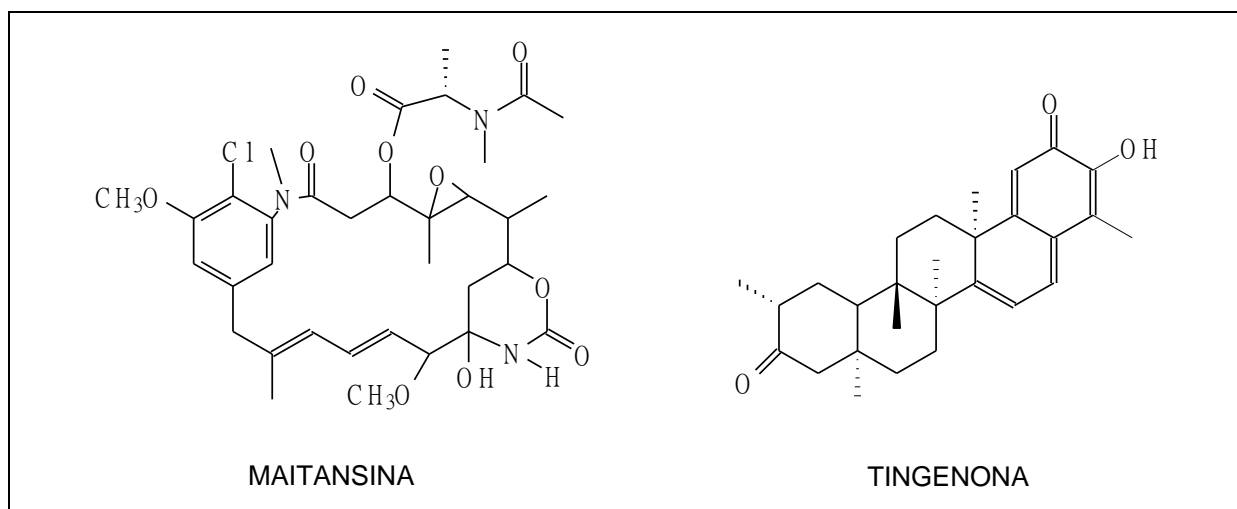


Figura 1. Mapa de distribuição da família Celastraceae no mundo.
(<http://www.tropicos.org/Name/42000222?tab=maps&usenonflash=1#>)

As plantas desta família apresentam-se como árvores ou arbustos, armados ou inermes, com folhas simples, alternas ou opostas, com ou sem estípulas. Flores, geralmente, pequenas, ordenadas em inflorescências axilares racemosas ou cimosas. Flores andróginas ou unissexuadas por aborto, com pétalas imbricadas, livres entre si. Quanto a cinco estames; epissépalos, dispostos nos bordos ou sob os

bordos de um disco carnosos; anteras rimosas. Ovário súpero, formado de dois a cinco carpelos bi ou pentalocular, assentado sobre o disco ou envolvido por ele; cada lóculo do ovário, com um a dois óvulos, raramente mais, com intertegumentos. Fruto capsular, drupáceo, samaróide ou bacáceo; semente, em geral, com arilo de colorido vivo, com ou sem endosperma carnosos; embrião axial, reto, com cotilédones membranosos, brancos, lineares ou oblongos e eixo radícula-hipocólito mais ou menos curvos (BARROSO, 1984).

Os primeiros estudos químicos das Celastráceas datam do fim do século XIX, a partir do isolamento da maitansina, um alcaloide ansamacrolídeo presente no lenho de plantas do gênero *Maytenus sp.* provenientes da África Oriental e que exibe atividade antitumoral (KUPCHAN et al., 1972). O interesse farmacológico por esta família intensificou-se com a descoberta da ação antitumoral apresentada pela tingenona, um quinonametídeo de natureza triterpênica pentacíclica (MARINI-BETTOLO, 1974). No Quadro 1 (p. 31) estão representadas as estruturas das primeiras moléculas isoladas do gênero *Maytenus*.



Quadro 1. Representação estrutural do alcaloide Maitansina e do triterpeno Tingenona.

O aprimoramento tecnológico e a descoberta de técnicas mais refinadas permitiram a descoberta de outros tipos de metabólitos secundários biologicamente ativos, dentre os quais destacam-se flavonoides (VILEGAS et al., 1999; SANNOMIYA et al., 1998; SILVA et al., 2008), alcaloides (CORSINO et al., 1998), derivados agarofurânicos, terpenoides, taninos condensados (GONZALEZ et al.,

1982; SHIROTA et al., 1994), catequinas, proantocianidinas, glicosídeos (FONSECA et al, 2007) e triterpenos quinonametídeos (CORSINO et al., 2000; BUFFA FILHO et al., 2002), entre outros.

Existem inúmeras propriedades atribuídas aos extratos de representantes da família Celastraceae na medicina tradicional, dentre elas destacam-se a estimulante, a supressora do apetite, sedativa, emética, purgativa, antitumoral (PERESTELO et al., 2010), antimicrobiana (LUO et al., 2005; ESTEVAM et al., 2009), anti-inflamatória (SOSA et al., 2007), inseticida e repelente de insetos (KALIX e BRAENDEN, 1985; DEEPA & BAI, 2010), anti-HIV (FERREIRA et al., 2010) e antioxidante (SILVA et al., 2009).

Destaca-se, a atividade antiulcerogênica que já foi reportada em várias espécies desta família, como *Maytenus ilicifolia* (JORGE et al., 2004), *Maytenus aquifolium* (GONZALEZ et al., 2001), *Maytenus truncata* (SILVA et al., 2005), *Maytenus obtusifolia* (MOTA, 2009) e *Austroplenckia populnea* (ANDRADE et al., 2006).

3.2 Considerações sobre o gênero *Maytenus*

O gênero *Maytenus* é o maior gênero da família Celastraceae e o mais representativo em espécies na América do Sul em relação ao continente americano (GENTRY, 1993; JOFFILY & VIEIRA, 2005). Atualmente são descritas cerca de 225 espécies das quais 80 são encontradas no território brasileiro ocorrendo em diferentes habitats, desde as florestas amazônica e atlântica ao cerrado (Figura 2, p. 33) (CARVALHO-OKANO & LEITÃO-FILHO, 2005; NIERO et al., 2011).

Espécies deste gênero foram reportadas em ambientes com vegetação de Caatinga como a *M. truncata* Reiss., *M. imbricata* Mart. ex Reiss., *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss., *M. catingarum* Reiss., *M. impressa* Reiss., *M. obtusifolia* Mart., distribuídas predominantemente entre a Bahia e o Ceará (ROCHA et al., 2004).



Figura 2. Mapa de distribuição do gênero *Maytenus* no mundo.

(<http://www.tropicos.org/Name/40015252?tab=maps&usenonflash=1>)

De acordo com a etnofarmacologia sul-americana, várias espécies de *Maytenus* apresentam usos terapêuticos para o tratamento de problemas gástricos, tais como gastrite e úlcera (BAGGIO et al., 2007; NIERO et al., 2011). Um exemplo clássico consiste na utilização de medicamento fitoterápico registrado junto à ANVISA e produzido a partir das folhas de *Maytenus ilicifolia*, popularmente

conhecido como espinheira-santa. Este medicamento é prescrito para o tratamento de gastrites e como protetor gástrico.

Diferentes espécies de *Maytenus* têm sido investigadas por suas propriedades terapêuticas. Estes estudos sugeriram que a maioria das atividades biológicas são devido à presença de compostos fenólicos, particularmente dos flavonoides, glicosídeos, terpenos, esteroides e alcaloides (NIERO et al., 2011). O Quadro 2 (p. 34) apresenta algumas espécies do gênero *Maytenus* com atividades biológicas descritas na literatura.

Espécie	Atividade	Referências
<i>M. ilicifolia</i>	Antiúlcera, Diurética, Laxante, Antitumoral, Digestiva, Abortiva, Antiséptica, Antiasmática, Analgésica, Anti-inflamatória e Emenagoga	Arenas & Azorero, 1977; Corrêa, 1984; Montanari & Bevilacqua, 2002; Jorge et al., 2004; Pessuto et al., 2009; Velloso, 2006; Teixeira, 2013; Nogueira 2009.
<i>M. truncata</i>	Antiúlcera, Anti-inflamatória	Silva et al., 2005; Fonseca et al., 2007; Salazar et al., 2001.
<i>M. robusta</i>	Antiúlcera	Andrade et al., 2007; Niero et al., 2006; Andrade et al., 2008; Brasil, 2013.
<i>M. aquifolium</i>	Antiúlcera, Analgésica e Antioxidante	Souza-Fomigoni et al., 1991; Coelho et al., 2003; Tiberti et al., 2007; Gonzalez et al., 2001; Corsino et al., 2003.

Quadro 2. Espécies do gênero *Maytenus* com atividades biológicas descritas.

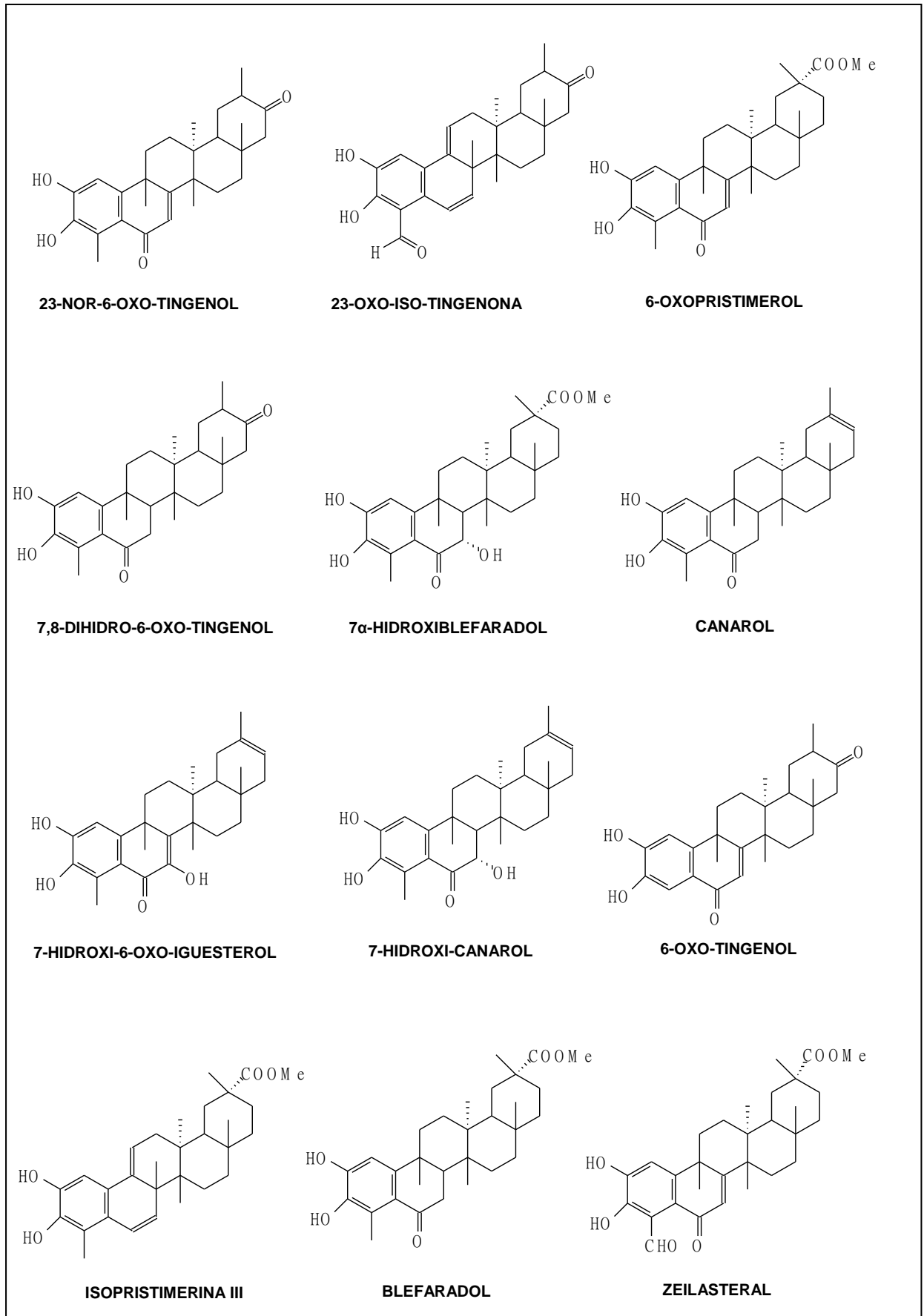
<i>M. chuchuhuasca</i>	Antimitótica, Citotóxica	Morita et al., 2008; Shirota et al., 1994.
<i>M. rigida</i>	Analgésica, Antiinfeciosa, Anti-inflamatória, Antiúlcera, Antidiarréico	Dias et al., 2007; Estevam et al., 2009; Santos et al., 2007.
<i>M. salicifolia</i>	Antialérgica, Antioxidante	Magalhães et al., 2011; Valladão et al., 2009.
<i>M. senegalensis</i>	Anti-inflamatória, Antibacteriana, Antitumoral e Anti-HIV	Sosa et al., 2007; Lindsay et al., 2006; Hussein et al., 1999; Tin-Wa et al., 1971.
<i>M. boaria</i>	Anti-inflamatória, Antipirética, Purgativa	Alarcon et al., 1995; Blackhouse et al., 1994.
<i>M. obtusifolia</i>	Antiúlcera, Anti-inflamatória, Antitumoral, Antimicrobiana, Depressora do sistema nervoso central	Medeiros et al., 2010; Mota, 2009; Corrêa, 1984; Sousa & Almeida, 2005.
<i>M. canariensis</i>	Antimicrobiana	Gonzalez et al. 1996; Herrera et al., 1996.
<i>M. gonoclada</i>	Antimicrobiana, Antiprotozoário	Silva et al., 2011; Silva et al., 2012.
<i>M. evonymoids</i>	Antifúngica	Shemer, 2007.
<i>M. distichophylla</i>	Antioxidante, Antimicrobiana, Anticolinesterásica	Ferreira, 2014.
<i>M. ovatus</i>	Antitumoral	Kupchan et al., 1972.
<i>M. forsskoaliana</i>	Antihipertensiva, Antimicrobiana, Antipirética, Citotóxica	Deeb et al., 2003.
<i>M. imbricata</i>	Antimicrobiana, Antinociceptiva	Carvalho Veloso et al., 2014; Rodrigues et al., 2012.

Continuação do Quadro 2. Espécies do gênero *Maytenus* com atividades biológicas descritas.

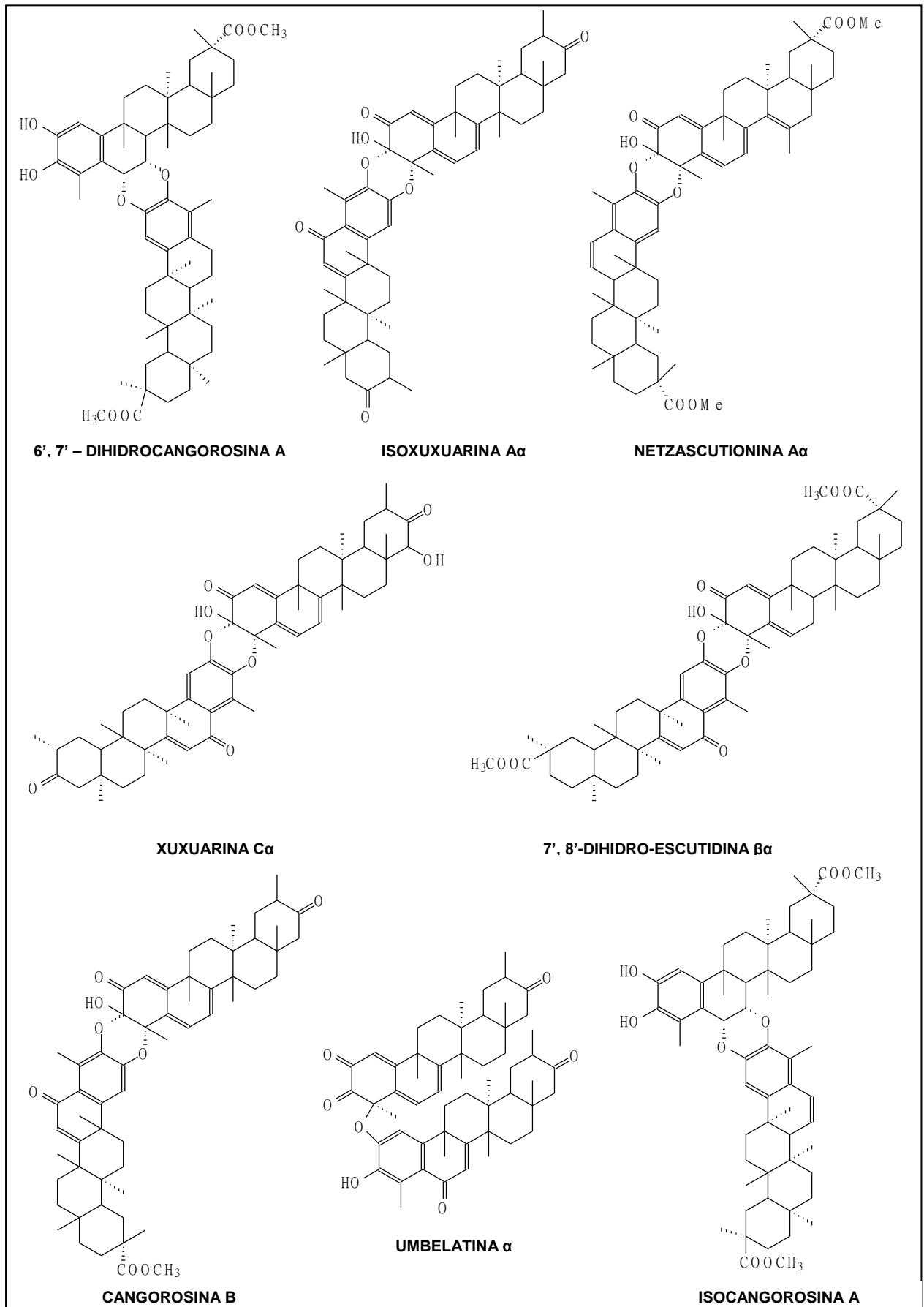
<i>M. serrata</i>	Antitumoral	Kupchan et al., 1977.
<i>M. guianensis</i>	Antiagregante plaquetária	Maia et al., 2009.
<i>M. diversifolia</i>	Antitumoral	Lee et al., 1982; Nozaki et al., 1986; Nakao et al., 2004.
<i>M. nemerosa</i>	Antitumoral, Citotóxica	Hecht, 1983; Sheng-Ding et al., 1984.
<i>M. vitis-idaea</i>	Antitumoral	De Almeida et al., 2010.
<i>M. heterophylla</i>	Antimicrobiana, Anti-inflamatória, Anticitomegalovírus	Orabi et al., 2001; Murayama et al., 2007; Da Silva et al., 2010.
<i>M. rothiana</i>	Antiúlcera	Jain & Surana, 2010.

Continuação do Quadro 2. Espécies do gênero *Maytenus* com atividades biológicas descritas.

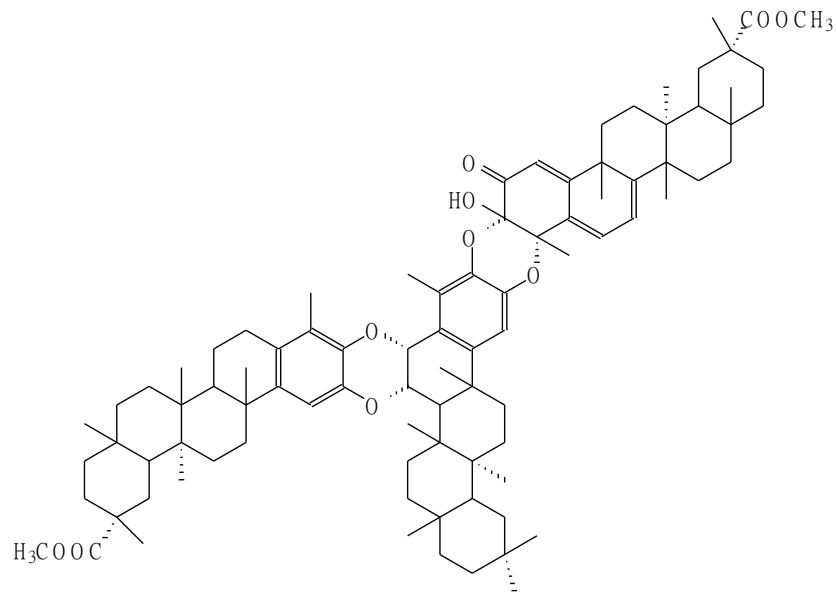
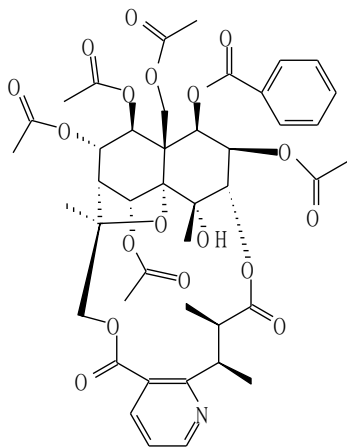
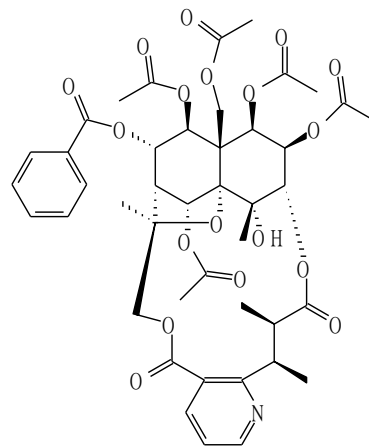
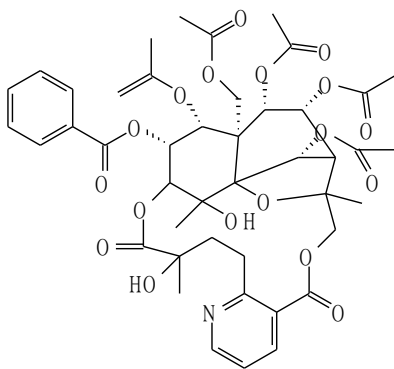
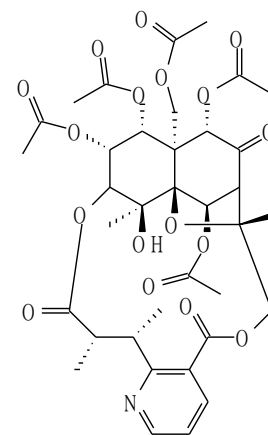
O Quadro 3 (p. 37), apresenta alguns constituintes químicos isolados deste gênero com suas respectivas estruturas.



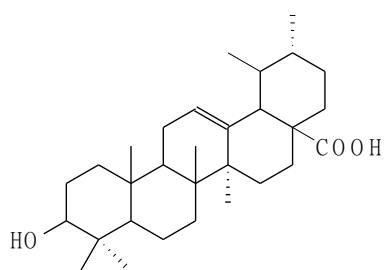
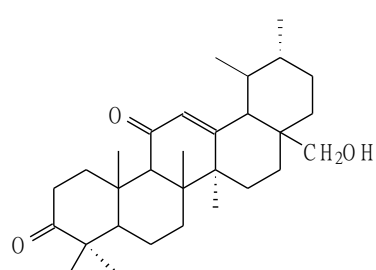
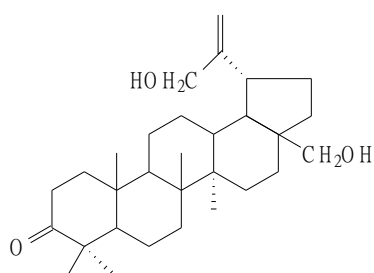
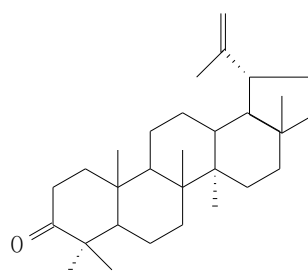
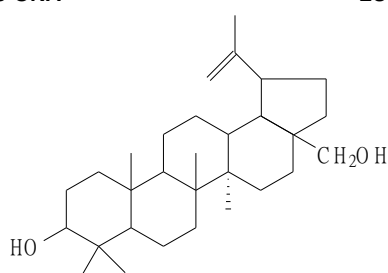
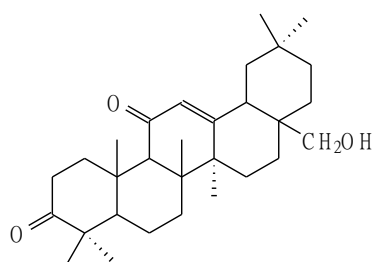
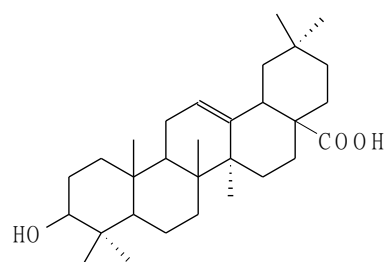
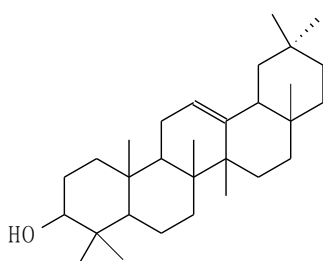
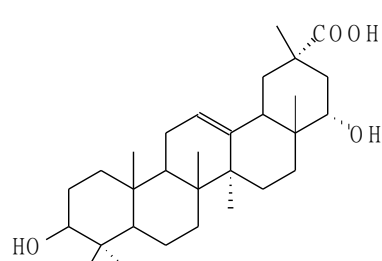
Quadro 3. Constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Maytenus*.



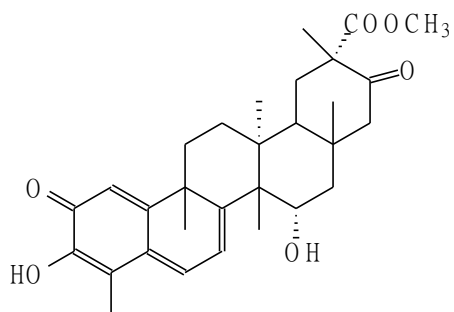
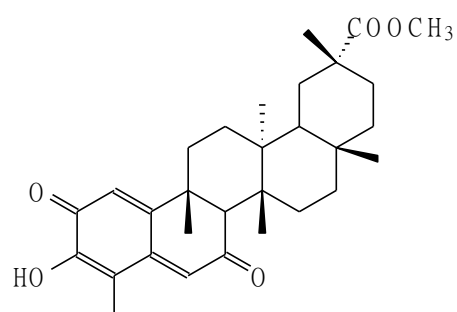
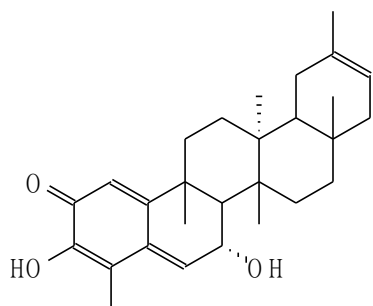
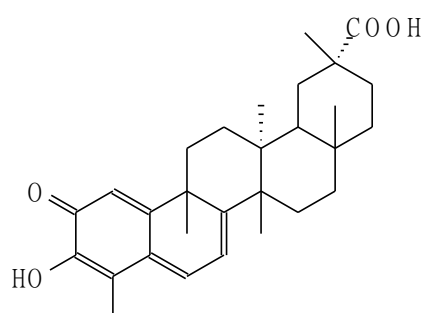
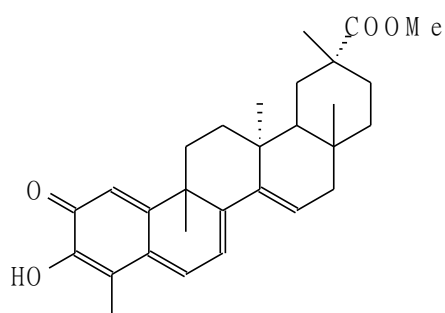
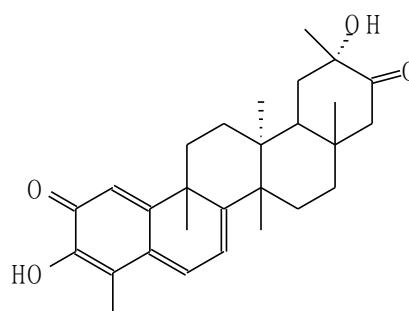
Continuação Quadro 3. Constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Maytenus*.

**TRIESCUTINA A****MAITEÍNA****AQUIFOLIUNINA E-I****WILFORDINA****EVONINA**

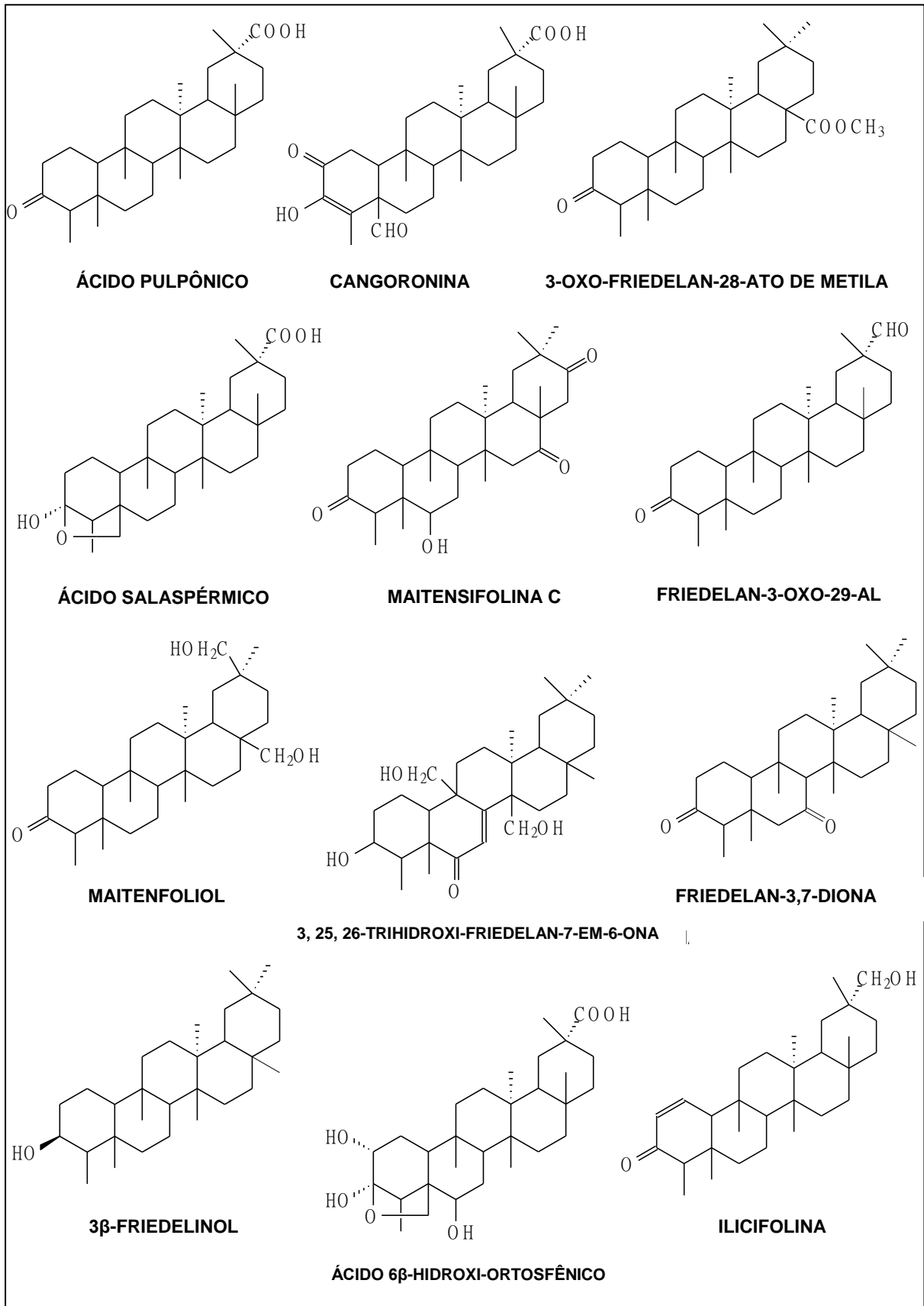
Continuação Quadro 3. Constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Maytenus*.

**ÁCIDO URSÓLICO****KRUKOVINA B****28.30-DIHIIDROXI-LUPAN-20(29)-EM-3-ONA****LUPAN-20(29)-EM-3-ONA****BETULINA****KRUKOVINA A****ÁCIDO OLEANÓLICO****β-AMIRINA****ÁCIDO MAITENFÓLICO**

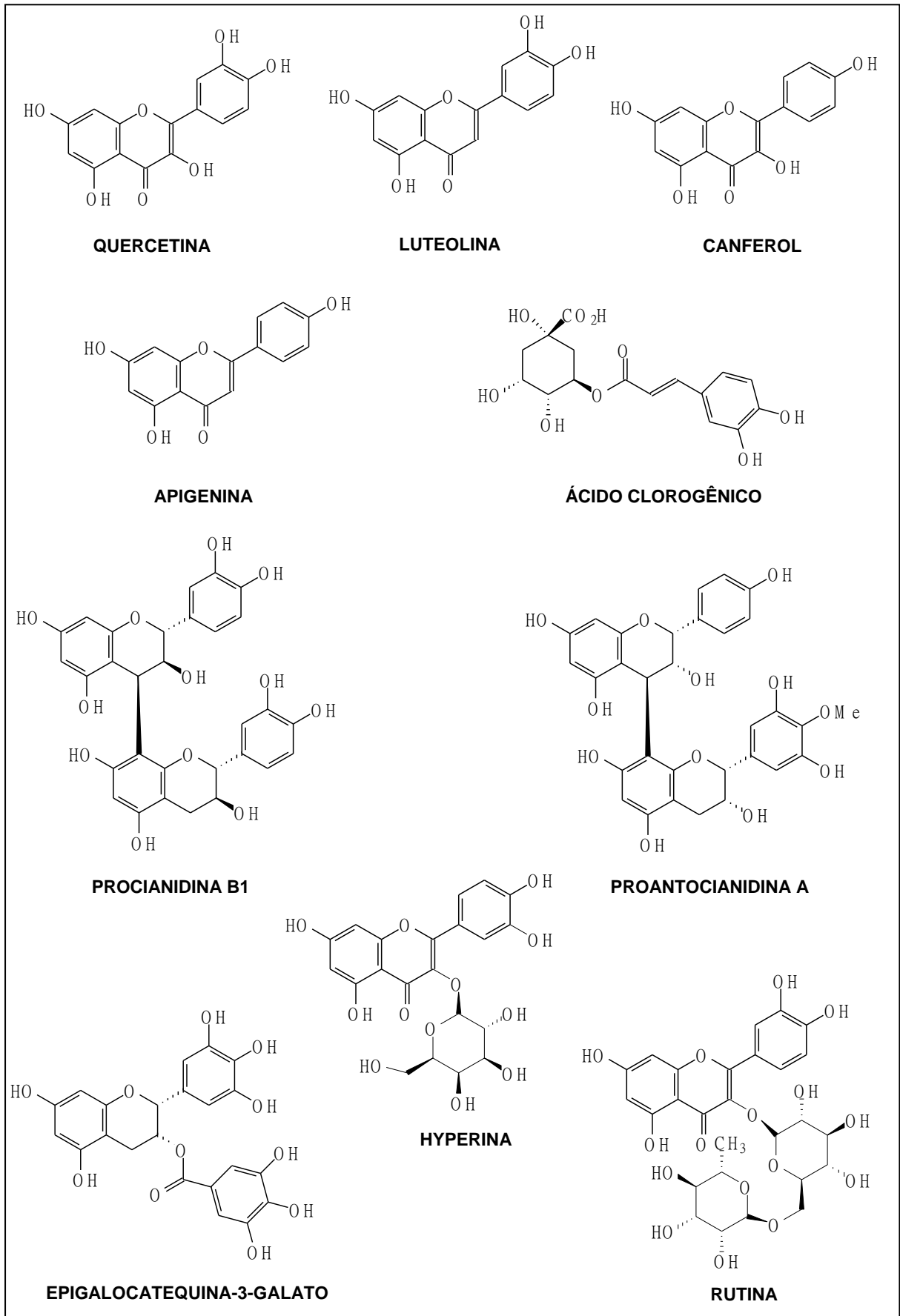
Continuação Quadro 3. Constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Maytenus*.

**15α-HIDROXI-21-OXO-PRISTIMERIN****DISPERMOQUINONA****7α-HIDROXI-7,8-DIHIDROIGUESTERIN****CELASTROL****NETZAHUALCOIENO****20α-HIDROXITINGENONA**

Continuação Quadro 3. Constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Maytenus*.



Continuação Quadro 3. Constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Maytenus*.



Continuação Quadro 3. Constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Maytenus*.

3.3 *Maytenus obtusifolia* Mart.

Popularmente conhecida como carne de anta, congonha brava de folha miúda e lenha branca (Figura 3, p. 45), a espécie em estudo, *Maytenus obtusifolia* Mart. é utilizada na medicina popular para o tratamento de úlceras estomacais, como antisséptico e tratamento de câncer. Apresenta distribuição em regiões litorâneas ocorrendo desde o estado do Pará até São Paulo. É abundante na restinga, principalmente do estado do Rio de Janeiro, embora também seja encontrada em regiões de maior altitude (Figura 4, p. 47)

Maytenus obtusifolia Mart. é uma árvore ou arbusto medindo até 5,0 metros de altura. Ramos novos glabros, cilíndrico-achatados. Folhas coriáceas, glabras, ásperas; pecíolo curto, medindo de 0,2-0,4 cm de comprimento; estípulas inconspícuas; limbo medindo de 3,0-11,0 cm de comprimento e 2,0-6,5 cm de largura; nervura primária saliente na face abaxial e nervuras secundárias capilares, não salientes, muitas vezes inconspícuas; forma elíptica, oval, obovada, orbicular; base cuneada a obtusa; ápice agudo, obtuso, truncado; margem geralmente inteira, às vezes subrevoluta, subrepando-crenada. Inflorescências em cimeiras paniculiformes; pedúnculo principal medindo até 3,5 cm de comprimento. Sépala obtusas, medindo cerca de 0,1 cm de comprimento. Pétalas obovais, medindo cerca de 0,2 cm de comprimento e 0,15 cm de largura. Estames com filetes achatados na base. Estigma capitado, séssil ou com estilete distinto; ovário imerso no disco pateliforme, às vezes saliente. Fruto capsular, bivalvar, orbicular, ligeiramente apiculado; pericarpo maduro de coloração alaranjada (Figura 5, p. 48) (CARVALHO-OKANO, 1992).



Figura 3. *Maytenus obtusifolia* Mart. no local de coleta, município de Santa Rita.
(Foto: Josean Fechine Tavares, 2007).

Estudos fitoquímicos realizados com as raízes desta espécie resultaram na descoberta de celastróides na espécie, como a pristimerina, tingenona e 22-hidroxitingenona (LUCA et al., 1978). Freire (1998) relatou a presença de triterpenos pentacíclicos da série friedelano, oleanano e ursano, como a friedelina, 7-oxofriedelina, 3-oxo-29-hidroxifriedelano, 3-oxo-11 α -hidroxi-20(29)-lupeno, 3 β -11 α -dihidroxi-20(29)-lupeno.

Em adição aos achados anteriores, Silva (2008) relatou o isolamento e identificação do ácido 3,4-seco-fridelan-3-óico, dos flavonoides (-)-epicatequina, (+)-catequina, (-)-4'-O-metil-epigalocatequina e ouratea-proantocianidina A e do alcaloide maitenina.

Sousa (1998) relatou o isolamento de triterpenos pentacíclicos e alcaloides como o 3 β -hidroxi-9,12-en-oleanano, 3 β -hidroxi-9,12-en-ursano, 3 β -hidroxi-11,13-en-oleanano e a N-metil-flindersina.

Também foram investigadas as propriedades farmacológicas da espécie, onde Sousa & Almeida (2005) avaliaram o extrato clorofórmico das raízes de *Maytenus obtusifolia* Mart. e verificaram que o mesmo apresentou ação depressora do sistema nervoso central confirmado pelo ensaio de atividade locomotora espontânea, bem como efeito neuroléptico possivelmente via ação dopaminérgica central.

O extrato etanólico e a fase acetato de etila das folhas apresentaram atividade gastroprotetora envolvendo possivelmente a participação de grupos

sulfidrilas, bem como estimularam o processo de cicatrização da úlcera gástrica (MOTA, 2009).

Medeiros e colaboradores (2010), relataram atividade antimicrobiana do óleo essencial obtido das folhas de *Maytenus obtusifolia* Mart. O óleo inibiu o crescimento de todas as estirpes das bactérias quando testado in natura. Dentre os fungos testados, cinco foram sensíveis ao material.

No Quadro 4 (p. 49), são exemplificados alguns constituintes químicos isolados desta espécie com suas respectivas estruturas.



Figura 4. Mapa de distribuição da espécie *Maytenus obtusifolia* Mart. representada por (●) (CARVALHO-OKANO, 1992)

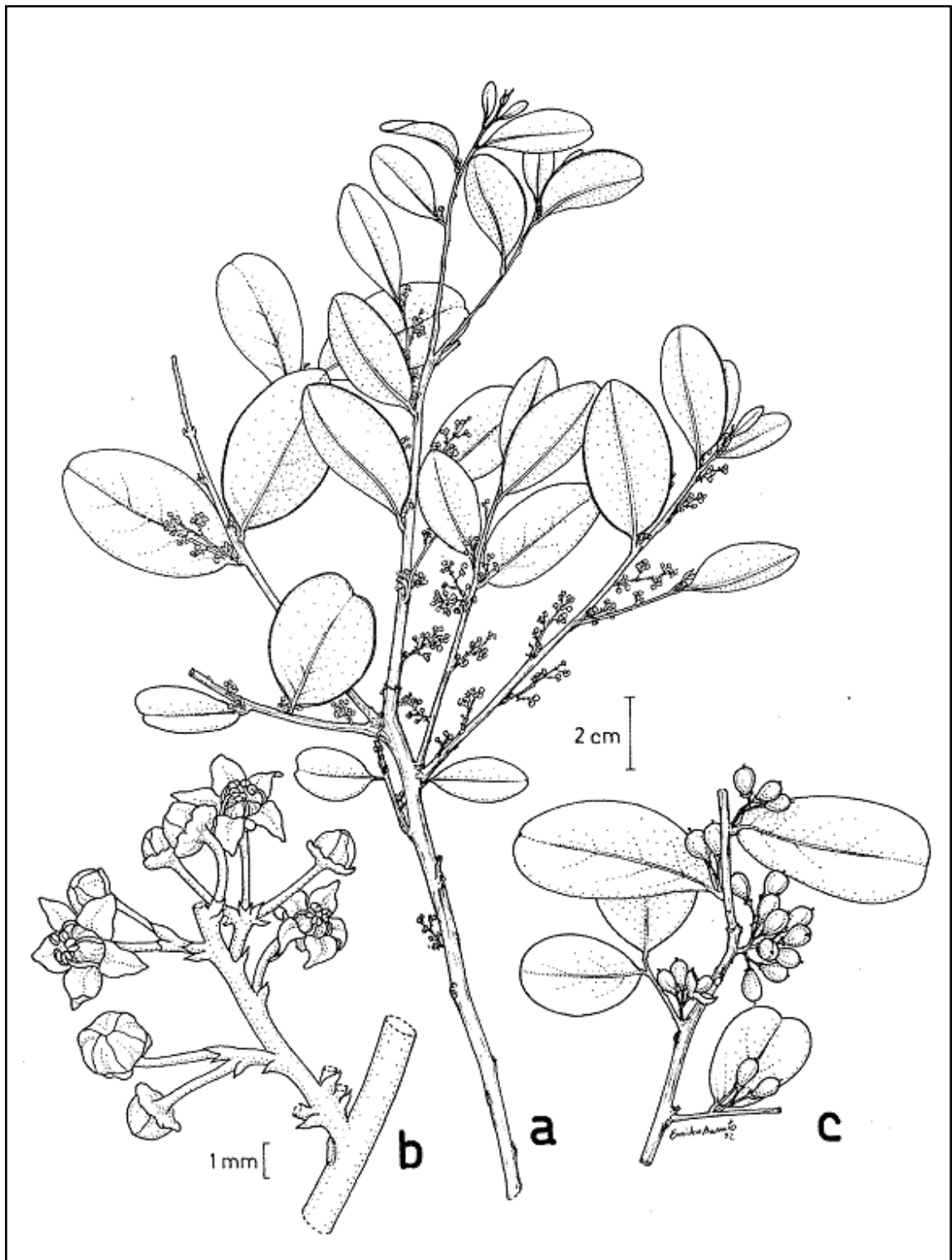
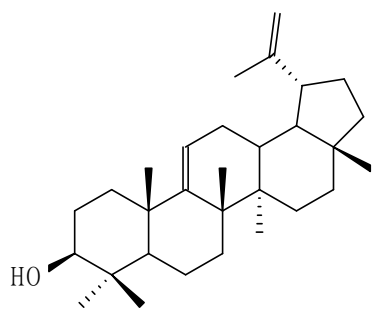
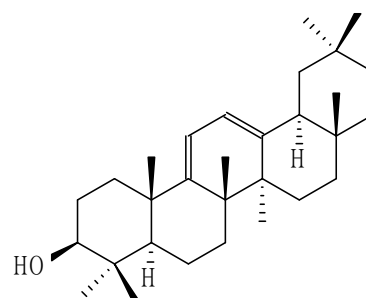


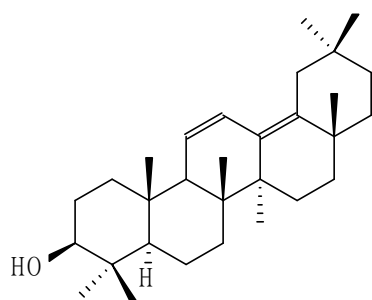
Figura 5. Aspecto de um ramo de *Maytenus obtusifolia* Mart. (a) Ramo com flores. (b) Detalhe da inflorescência. (c) Ramo com frutos. (CARVALHO-OKANO, 1992)



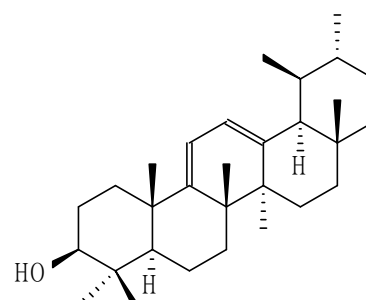
3β-11α-DIHIĐROXI-20(29)-LUPENO



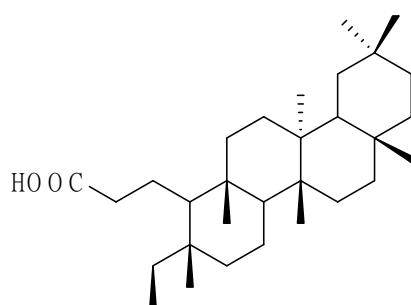
3β-HIĐROXI-9,12-EM-OLEANANO



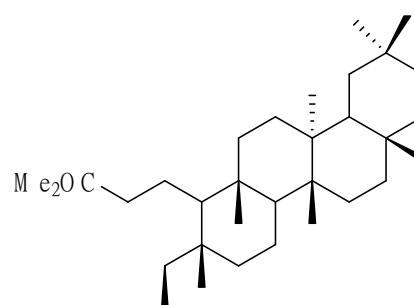
3β-HIĐROXI-11,13-EN-OLEANANO



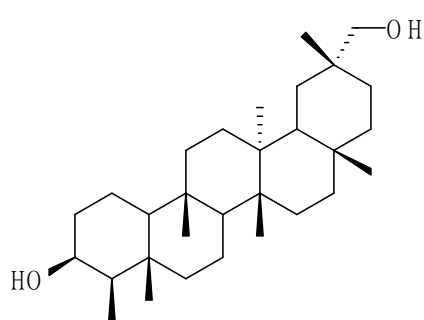
3β-HIĐROXI-9,12-EN-URSANO



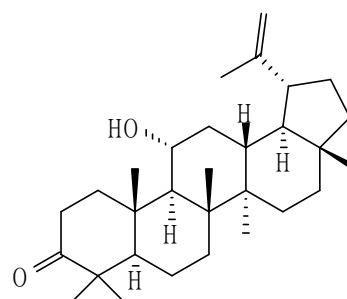
ÁCIDO 3,4-SECO-FRIEDELAN-3-ÓICO



3,4-SECO-FRIEDELAN-3-ATO

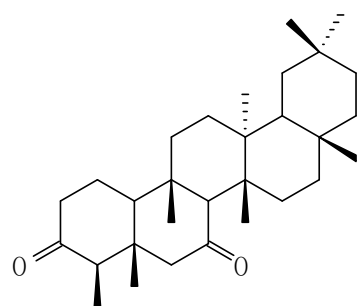
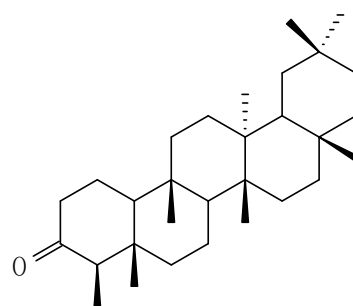
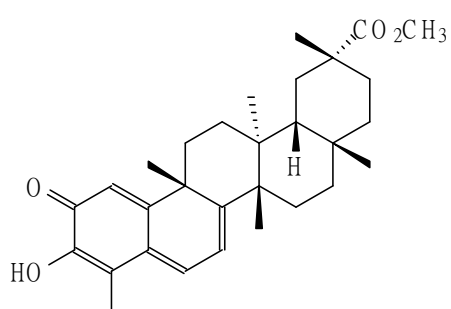
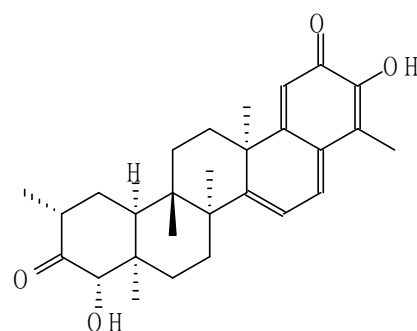
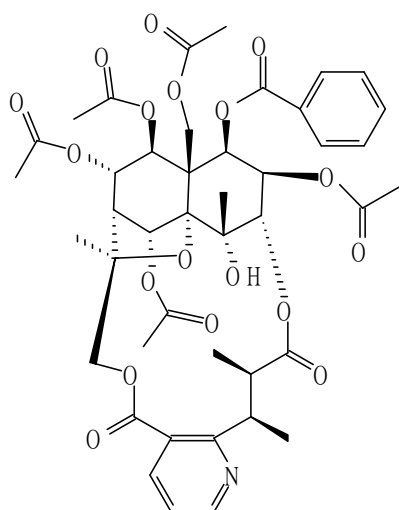
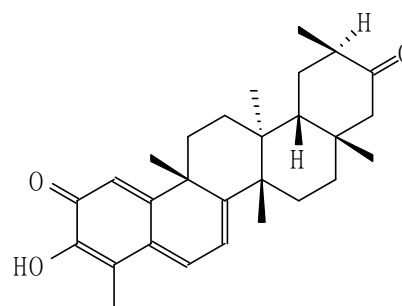
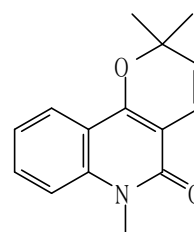


3-OXO-29-HIĐROXIFRIEDELANO

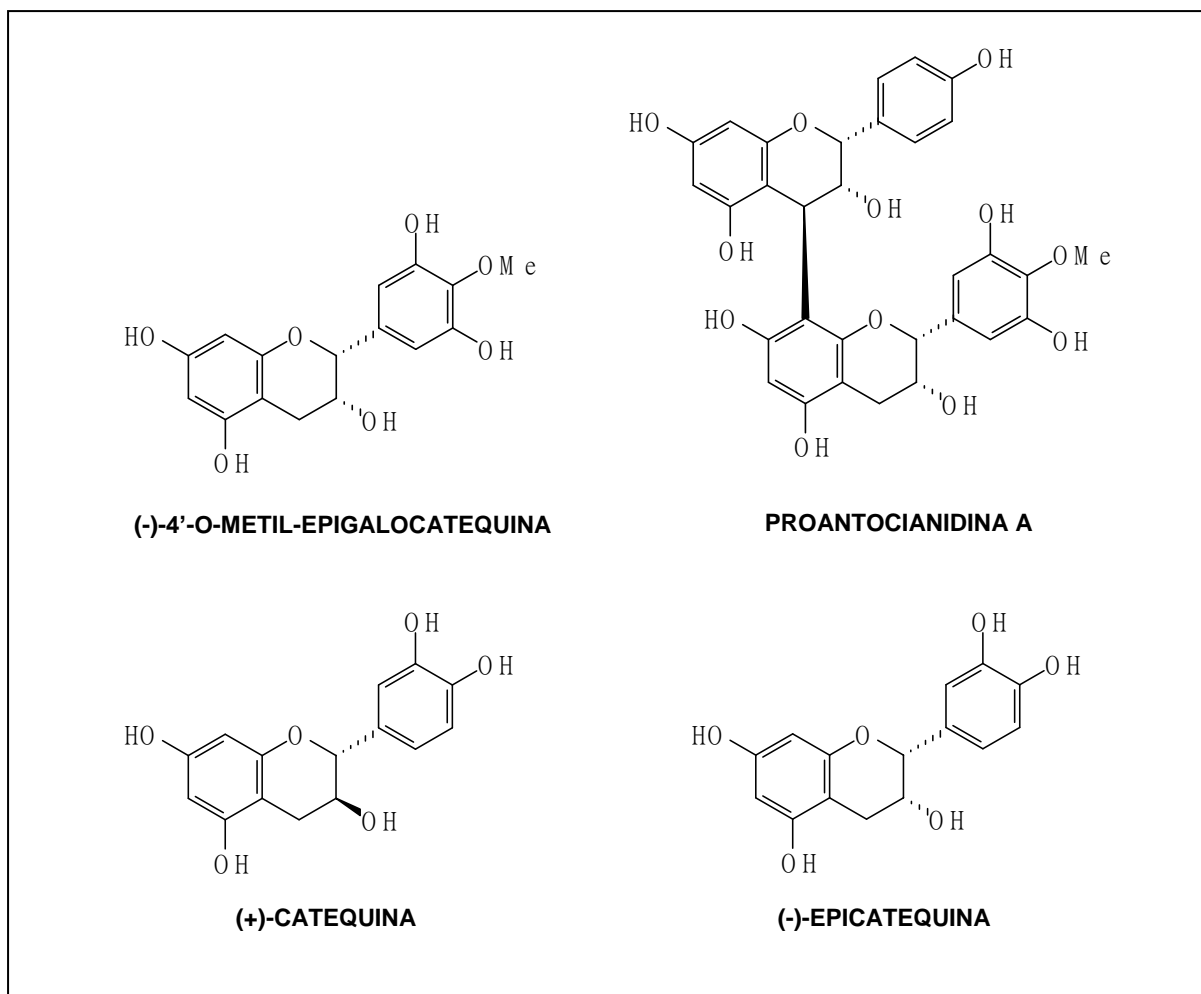


3-OXO-11α-HIĐROXI-20(29)-LUPENO

Quadro 4. Constituintes químicos isolados de *Maytenus obtusifolia* Mart.

**7-OXFRIEDELINA****FRIEDELINA****PRISTIMERINA****22-HIDROXITINGENONA****MAITEÍNA****TINGENONA****N-METILFLINDERSINA**

Continuação Quadro 4. Constituintes químicos isolados de *Maytenus obtusifolia* Mart.



Continuação Quadro 4. Constituintes químicos isolados de *Maytenus obtusifolia* Mart.

3.4 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são um conjunto de substâncias químicas que apresentam anéis aromáticos contendo hidroxilas ligadas nas formas simples ou de polímeros. Esses compostos podem ser obtidos de fontes naturais ou através de síntese (BALASUNDRAM et al., 2006). Quando presentes em vegetais podem estar na forma livre ou complexados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998).

A biossíntese destes compostos ocorre principalmente pela via do ácido chiquímico, que dá origem aos taninos hidrolisáveis, ácidos fenólicos, lignanas, ligninas e cumarinas. Mas também conta com a participação da rota do acetato via ácido malônico originando os flavonoides (SOUSA, 2007).

A produção dos compostos fenólicos pode ser influenciada pelo componente genético da planta e pelo ambiente. Além da variedade genética, fatores ambientais,

tais como disponibilidade de água, composição do solo, irradiação solar e intensidade luminosa, diferenças de temperaturas entre dias e noites, empregos de fertilizantes, de herbicidas e de pesticidas, podem afetar substancialmente o conteúdo de fenólicos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Estes metabólitos secundários ocorrem em tecidos ou células especializadas, de acordo com o grau de desenvolvimento e diferenciação. São importantes para a fisiologia e morfologia do vegetal, embora não participem das funções vitais do organismo. Atuam na proteção contra fungos e bactérias, contribuem com o processo de pigmentação, conferem características anti-herbivoria e protegem contra radiação ultravioleta (BRAVO, 1998; NACZK & SHAHIDI, 2006; POPA et al., 2008).

Muitos estudos estão sendo realizados com o objetivo de caracterizar cada vez mais fenólicos. A presença destes compostos em plantas tem chamado a atenção da comunidade científica para a investigação das suas propriedades farmacológicas, visto que já foram relatadas atividade anti-hipertensiva, antiulcerogênica, antimicrobiana, antitumoral e neuroléptica, entre outras (GORDON, 1996; TUCKMANTEL et al., 1999).

3.4.1 Ácidos fenólicos

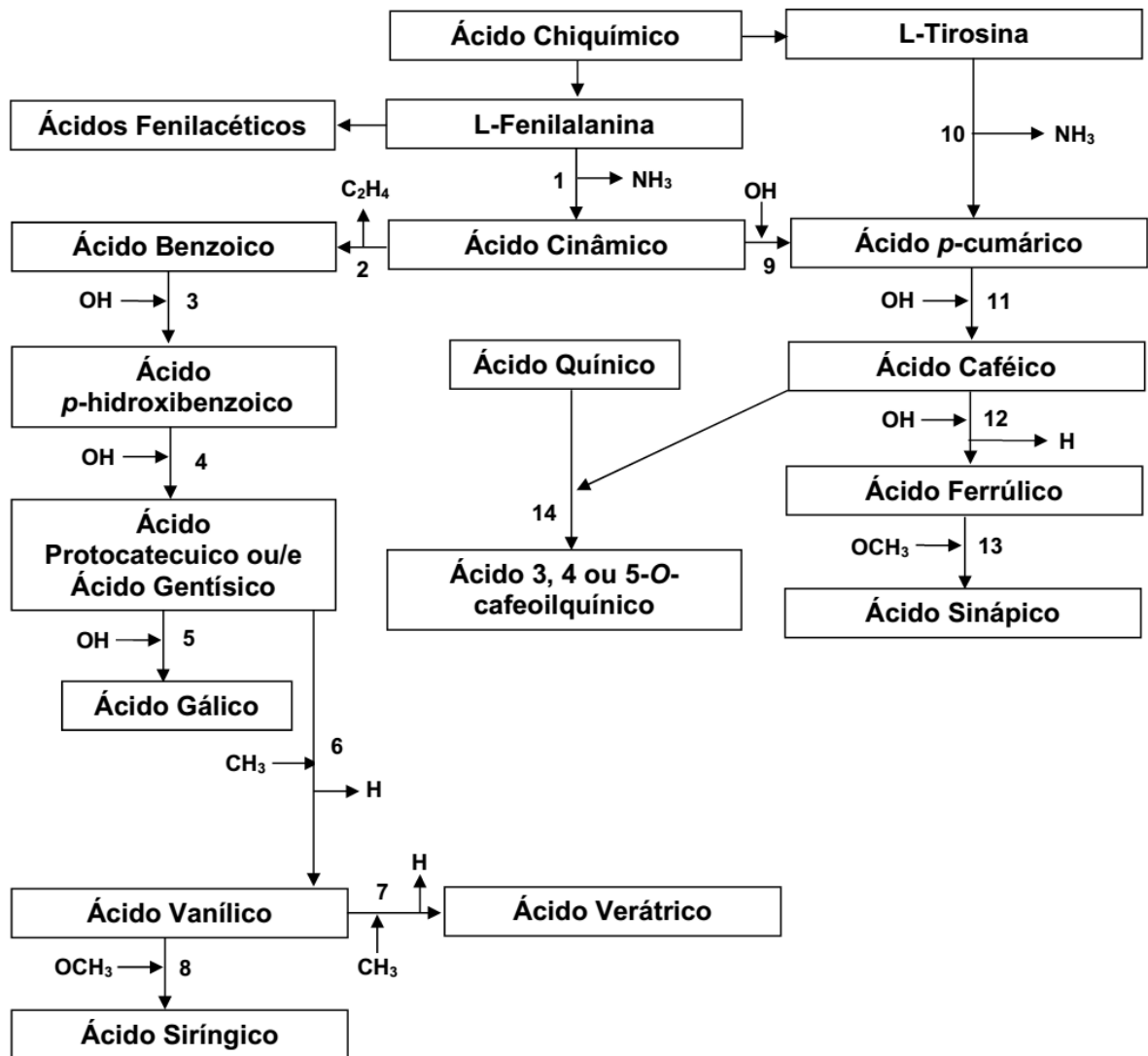
Os ácidos fenólicos são uma classe importante de compostos fenólicos e dividem-se em 2 grandes grupos, os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos. Derivam de moléculas não fenólicas: ácido benzóico e cinâmico, respectivamente conforme demonstrado no Fluxograma 1 (p. 54) (HELENO et al., 2015). Os passos das reações, compostos iniciais, enzimas e compostos formados nesta via são exemplificados no Quadro 5 (p. 55).

Inicialmente, ocorre desaminação do aminoácido fenilalanina e/ou tirosina originando o ácido cinâmico e/ou p-cumárico, respectivamente. Os anéis dos ácidos recém-formados são hidroxilados e metilados para formar seus derivados. A desaminação, hidroxilação e metilação são as três principais reações envolvidas na formação dos ácidos fenólicos (GROSS, 1985).

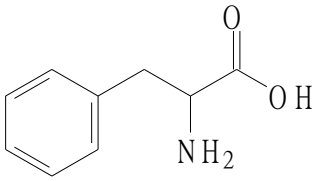
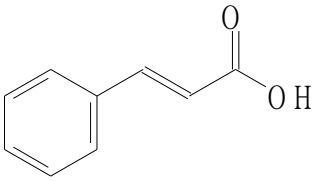
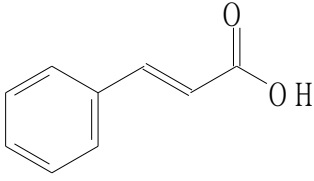
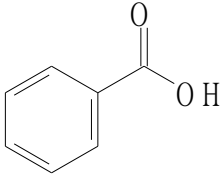
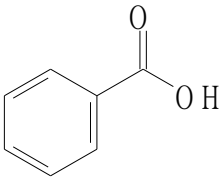
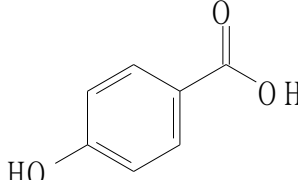
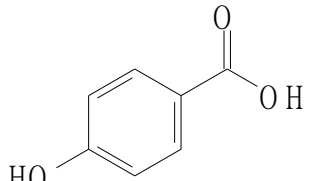
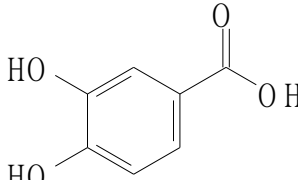
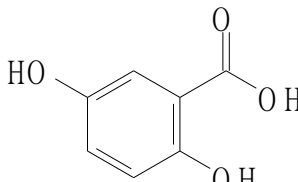
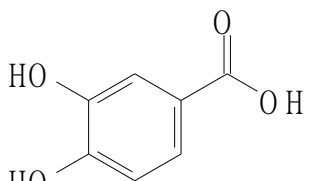
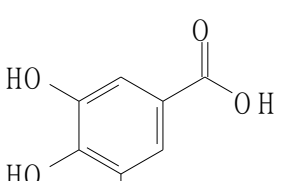
A formação do ácido benzoico também pode resultar da degradação da cadeia lateral do ácido cinâmico. E em seguida sofrer hidroxilação e metilação do anel aromático originando seus derivados. (GROSS, 1985).

Os ácidos hidroxibenzoicos são caracterizados pela presença de um grupo carboxila substituído em um fenol, conferindo esqueleto C6-C1. Exemplos desta classe incluem o ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido salicílico e ácido vanílico (VERMERRIS & NICHOLSON, 2006).

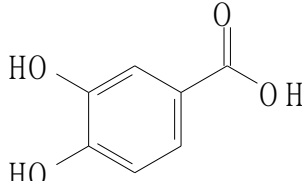
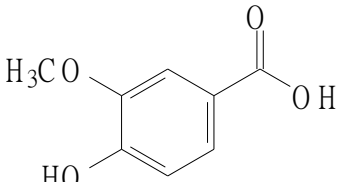
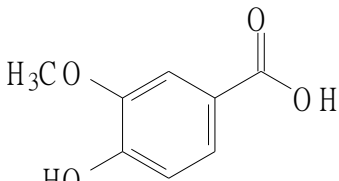
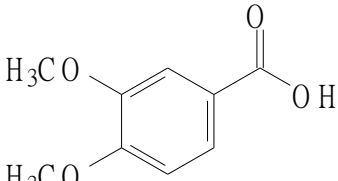
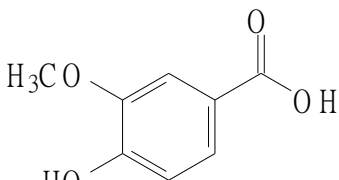
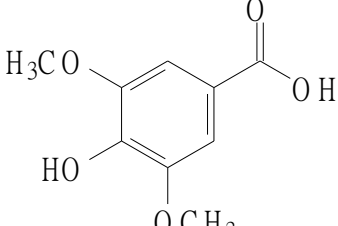
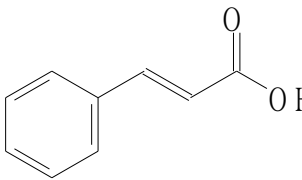
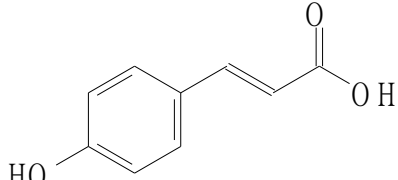
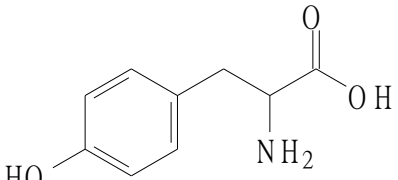
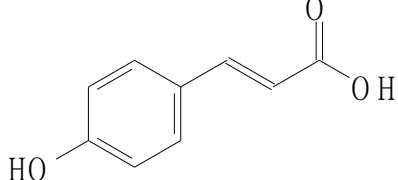
Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam esqueleto básico composto por 9 átomos de carbono em configuração C6-C3. Os principais exemplos encontrados na natureza são o ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido caféico, ácido ferrúlico e ácido sinápico. Estes ácidos são comumente encontrados na natureza na forma de ésteres do ácido quínico, ácido chiquímico ou ácido tartárico. Como por exemplo o ácido clorogênico que corresponde ao éster do ácido caféico e ácido quínico (VERMERRIS & NICHOLSON, 2006).



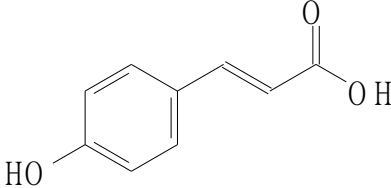
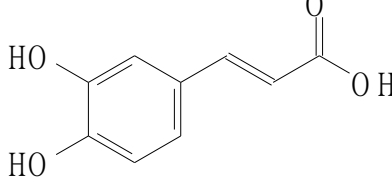
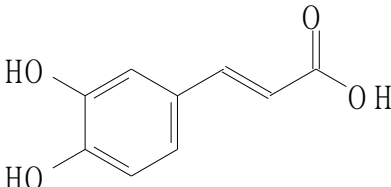
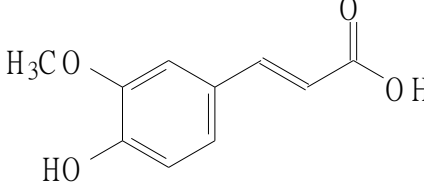
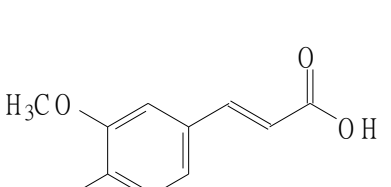
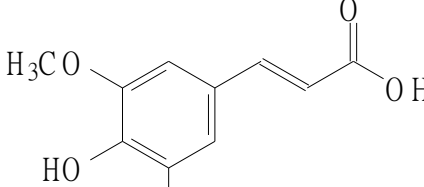
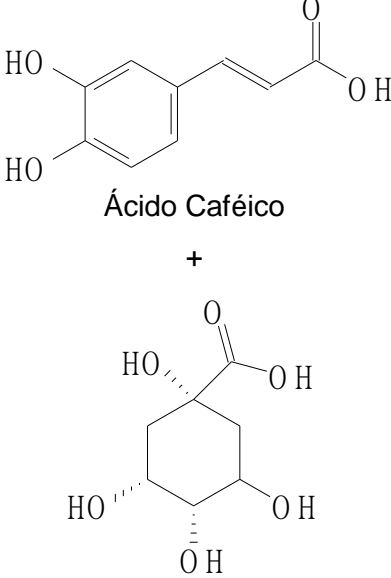
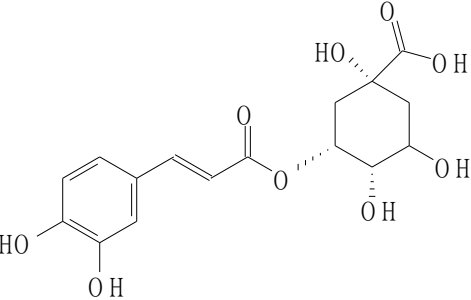
Fluxograma 1. Representação geral da biossíntese dos ácidos fenólicos derivados da via do ácido chiquímico.

	COMPOSTO INICIAL	ENZIMA	COMPOSTO FINAL
1	 <p>L-Fenilalanina</p>	Fenilalanina Amônia Liase	 <p>Ácido Cinâmico</p>
2	 <p>Ácido Cinâmico</p>	Oxidase	 <p>Ácido Benzoico</p>
3	 <p>Ácido Benzoico</p>	Ácido Benzoico 4-hidroxilase	 <p>Ácido p-hidroxibenzoico</p>
4	 <p>Ácido p-hidroxibenzoico</p>	Ácido p- hidroxibenzoico 3-hidroxilase	 <p>Ácido Protocatecuico</p>  <p>Ácido Gentísico</p>
5	 <p>Ácido Protocatecuico</p>	Ácido Protocatecuico 5-hidroxilase	 <p>Ácido Gálico</p>

Quadro 5. Precursores, enzimas e produtos formados na via dos ácidos fenólicos.

6	 Ácido Protocatecuico	Ácido Protocatecuico 3-O-metiltransferase	 Ácido Vanílico
7	 Ácido Vanílico	Ácido Vanílico 4-O-metiltransferase	 Ácido Verátrico
8	 Ácido Vanílico	Ácido Vanílico 5-hidroxilase e Ácido Vanílico 5-O-metiltransferase	 Ácido Sirínico
9	 Ácido Cinâmico	Ácido Cinâmico 4-hidroxilase	 Ácido p-cumárico
10	 L-Tirosina	Tirosina Amônia Liase	 Ácido p-cumárico

Continuação Quadro 5. Precusores, enzimas e produtos formados na via dos ácidos fenólicos.

11	 Ácido p-cumárico	Ácido p-cumárico 3-hidroxilase	 Ácido Caféico
12	 Ácido Caféico	Ácido Caféico 3-O-metiltransferase	 Ácido Ferrúlico
13	 Ácido Ferrúlico	Ácido Ferrúlico 5-hidroxilase e Ácido Caféico/5-hidroxiferrúlico O-metiltransferase	 Ácido Sinápico
14	 Ácido Caféico + Ácido Quínico	4-Cafeato-CoA ligase e Quinato-O-hidroxicinamitransferase	 Ácido 3,4 ou 5-O-caffeoilquínico

Continuação Quadro 5. Precusores, enzimas e produtos formados na via dos ácidos fenólicos.

3.4.2 Flavonoides

Os flavonoides constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários dos vegetais (CARVALHO et al., 2003). A capacidade destes compostos em atuar como agentes antioxidantes nos sistemas biológicos talvez seja sua atividade mais importante e a que mais atrai atenção dos pesquisadores nas últimas décadas (WU et al., 2015; CHENG et al., 2015).

Os flavonoides absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível e, desta maneira, apresentam papel importante na defesa das plantas frente à radiação UV. A antocianina presente nas flores confere cor e contribui com a polinização de espécies vegetais. Além disso estão envolvidos na fotossíntese, transferência de energia, respiração, morfogênese, determinação do sexo e representam uma barreira química contra microrganismos, insetos e outros animais (HAVSTEEN, 2002; HEIM et al., 2002; CUSHNIE & LAMB, 2005; ADEROGBA et al., 2006).

A estrutura básica flavonoídica é o núcleo flavano ou 2-fenil-benzo- γ -pirano, que consiste em 15 átomos de carbono organizados em três anéis (C6-C3-C6), denominados A, B e C representado na Figura 6 (p. 58). As várias classes de flavonóides diferem aos níveis de oxidação e padrão de substituição do anel C, enquanto que os compostos individuais dentro de uma classe diferem no padrão de substituição dos anéis A e B (PIETTA, 2000).

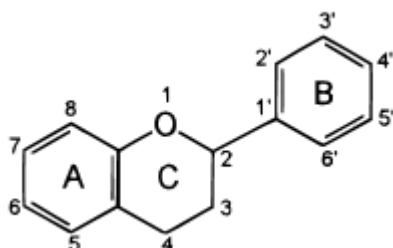
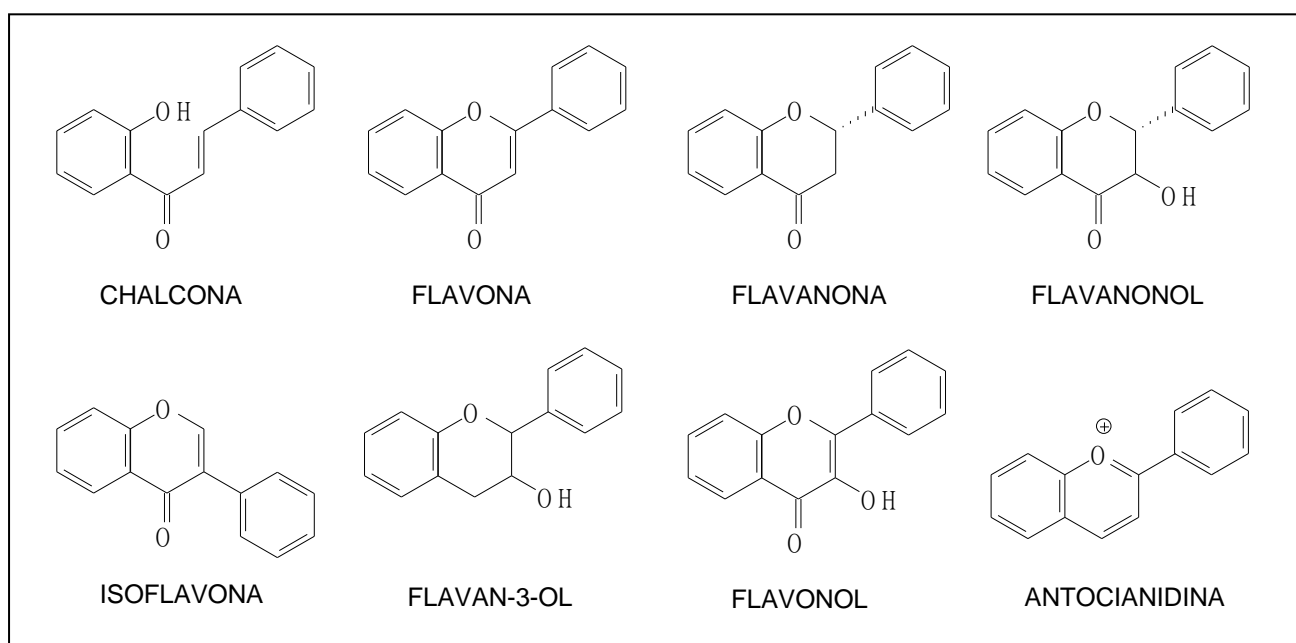


Figura 6. Núcleo flavano.

A pesquisa original dos flavonóides aparentemente começou em 1936, quando o cientista húngaro Albert Szent-Gyorgi descobriu uma sinergia entre a vitamina C pura e cofatores ainda não identificados a partir de cascas de limões, que

ele nomeou inicialmente de citrin e, em seguida, vitamina P que corresponde ao flavonoide rutina (3-o-rutinosídeo-quercetina) da classe dos flavonóis (MURRAY, 1998).

Mais de oito mil flavonoides foram relatados e esse amplo espectro de moléculas é devido às várias substituições dos grupos hidroxila nos anéis A e B, que são alvos de metilação, glicosilação e outras reações (HODEK et al., 2002). E de acordo com sua estrutura molecular dividem-se em: flavonas, flavanonas, flavonóis, isoflavonas, antocianidinas, catequinas, dihidroflavanonóis e chalconas. No quadro 6 (p. 59), são apresentadas as estruturas básicas das principais classes de flavonoides.



Quadro 6. Estruturas básicas das principais classes de flavonoides.

Nas plantas, os flavonoides podem ser encontrados na forma livre de aglicona ou conjugada a açúcares como O-glicosídeos e C-glicosídeos. Os O-glicosídeos possuem açúcares ligados às substituições hidroxila da aglicona, geralmente na posição 3 ou 7, enquanto os C-glicosídeos se ligam ao carbono 6 ou 8 (RIJKE et al., 2006).

No Quadro 7 (p. 61) são relatadas algumas classes de flavonoides e suas propriedades (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007).

Estudos espectroscópicos dos flavonoides revelaram que a maioria das flavonas e flavonóis exibem duas bandas de absorção máxima. A banda 1 (320-385 nm) representa a absorção do anel B, enquanto a banda 2 (250-285 nm) corresponde à absorção do anel A. A presença de alguns grupos funcionais ligados ao esqueleto podem alterar as absorções tradicionais como por exemplo do Canferol (3, 5, 7, 4' hidroxil) em 367 nm para 371 nm na quercetina (3, 5, 7, 3', 4' hidroxil) e para 374 nm na miricetina (3, 5, 7, 3', 4', 5' hidroxil) (YAO et al., 2004).

A ausência do grupo hidroxil na posição 3 em flavonas as distingue dos flavonóis. Flavanonas apresentam anel heterociclíco saturado C sem conjugação entre os anéis A e B, tal como determinado pelas suas características espectrais. As flavanonas exibem uma absorção máxima da banda 2 muito forte entre 270 e 295 nm a exemplo da naringenina em 288 nm e taxifolina em 285 nm e apenas um ombro para a banda 1 em 326 e 327 nm.

Os compostos com mono substituição do anel B, apresentam a segunda banda em 270 nm, porém podem exibir duas bandas ou uma banda em 258 nm com ombro em 272 nm quando ocorre di, tri ou orto substituição do anel B. As antocianinas apresentam absorção de banda 1 distinto na região de 450-560 nm devido ao sistema hidroxicinamil do anel B e absorções da banda 2 na região de 240 a 280 nm graças ao sistema benzoil do anel A. As cores das antocianinas variam de acordo com o número e a posição dos grupos hidroxil (WOLLENWEBER & DIETZ, 1981).

CLASSES	CARACTERÍSTICAS
Flavonas, flavonóis e seus heterosídeos	Co-pigmentação em flores; Proteção contra raios ultravioleta
Antocianinas	Pigmentação do vermelho ao azul
Chalconas	Pigmentação amarela
Auronas	Pigmentação amarela
Dihidroflavanonóis	Presentes em tecidos de madeira
Flavanonas	Apresentam sabor amargo
Dihidrochalconas	Apresentam sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas	Substâncias adstringentes com propriedades tanantes
Isoflavonas	Propriedades estrogênicas e antifúngicas
Biflavonóides	Propriedades antifúngicas

Quadro 7. Classes de flavonoides e suas propriedades.

3.4.2.1 Propriedades biológicas dos flavonoides

Um grande número de grupos de pesquisa vem contribuindo significativamente para o desenvolvimento da química de produtos naturais de plantas, através da interação com a farmacologia. A descoberta de alvos terapêuticos no processo de etiologia das doenças e estudos de modelagem molecular relacionando a estrutura-atividade apresentam-se como importantes

ferramentas na busca e na avaliação das novas moléculas (COUTINHO et al., 2009).

Os estudos relacionando a estrutura-atividade dos flavonoides são importantes no processo de busca de novos agentes anti-inflamatórios. Eles objetivam identificar os grupos funcionais responsáveis pela ação farmacológica e entender melhor como se dá a interação do flavonoide com o receptor, de forma a poder aperfeiçoar a molécula original em termos de atividade (THEOHARIDES et al., 2001; LÄTTIG et al., 2007).

Os compostos polifenólicos, de modo geral, estão inseridos na dieta dos seres humanos (OVASKAINEN et al., 2008). Os flavonoides têm sido reportados por exercer uma ampla variedade de atividades biológicas. Estas incluem: anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antialérgica (COOK & SAMMAN, 1996; MURRAY, 1998; CUSHNIE & LAMB, 2005; PAN et al., 2010; MISHRA et al., 2013), citotóxica, antitumoral, e vasodilatação (WILLIAMS et al., 2004; CHEBIL et al., 2006; TSUCHIYA, 2010). São capazes de inibir a peroxidação lipídica, agregação plaquetária, fragilidade capilar, a atividade das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase (GRYGLEWSKI et al., 1987; SCHEWE et al., 2002; PENG & KUO, 2003). Eles também atuam como antioxidantes, neutralizantes de radicais livres e quelantes de cátions divalentes (KELLY et al., 2002; PANDEY et al., 2012).

As atividades no trato gastrointestinal também foram relatadas, principalmente a antiúlcera, antiespasmódica, antidiarreica e anti-secretória (GHAYUR et al., 2007; MOTA, 2009; VELÁZQUEZ et al., 2009; PRASAD et al., 2013).

Catequinas, apigenina, quercetina, naringenina, rutina e rutosídeo apresentaram atividade hepatoprotetora. (TAPAS et al., 2008).

Alguns compostos deste grupo foram capazes de inibir várias enzimas como hidrolases, hialuronidase, fosfatase alcalina, arilsulfatase, cAMP fosfodiesterase, lipase, kinase e α -glucosidase (NARAYANA et al., 2001).

3.4.2.2 Biossíntese de flavonoides

O esqueleto básico dos flavonoides, dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três carbonos (C6-C3-C6), resulta de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato via ácido malônico (SOUSA, 2007). A via dos fenilpropanóides fornecem o *p*-cumaril-CoA ou 4-cumaril-CoA que consiste em um

éster do ácido hidroxicinâmico e dá origem ao anel B e a parte heterocíclica do esqueleto flavônico. A via acetato é responsável pelo alongamento da cadeia utilizando o malonil-coA como unidade de condensação (C2) (MAEDA & DUDAREVA, 2012).

A via fenilpropanóide inicia dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, que são produzidos na via do chiquimato. A fenilalanina amonialiase (PAL) é a primeira enzima comprometida com a via dos fenilpropanoides levando à produção das ligninas, lignanas e flavonoides. Esta enzima catalisa a formação do ácido trans-cinâmico a partir da fenilalanina. Em seguida, a cinamato-4-hidroxilase (C4H) catalisa a hidroxilação do ácido trans-cinâmico na posição C4 para formar o ácido p-cumarico ou ácido 4-cumarico.

O ácido p-cumarico necessita ser transformado em seu tioéster CoA para facilitar a conversão seguinte. Esta reação é catalisada pela 4-cumarato-CoA ligase (4CL) que utiliza ATP como forma de energia. A formação da molécula de malonil-CoA ocorre pela ação da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC) que é Mg^{2+} -ATP dependente (SASAKI & NAGANO, 2004).

Os esqueletos flavonoídicos são formados pela união de blocos oriundos dos fenilpropanóides e unidades condensadas da via acetato por uma série de reações de condensação, isomerização, oxidação e redução. A chalcona sintase (CHS) é a principal enzima envolvida na formação de todos os flavonoides (AUSTIN & NOEL, 2003). Ela catalisa a formação de um intermediário pela condensação de três unidades de acetato malonil-CoA ao 4-cumaril-CoA originando o composto (E)-3-(4-hidroxifenil)-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-prop-2-en-1-ona ou chalcona naringenina. O composto 6'-deoxichalcona ou isoliquiritigenina pode ser formado a partir do malonil-CoA e 4-cumaril-CoA via CHS, envolvendo a participação de outra enzima, a policetídeo redutase (PKR).

A chalcona isomerase (CHI) catalisa a ciclização estereoespecífica da chalcona naringenina à (2S)-naringenina, este composto apresenta o esqueleto tradicional de um flavonóide a flavanona (WINKEL-SHIRLEY, 2001; LEPINIEC et al., 2006).

As flavonas são biossintetizadas a partir de flavanonas pela introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3. Dois tipos de enzimas, a flavona sintase I-2-oxoglutarato dioxigenase dependente (FNS I) e a flavona sintase II (FNS II) são catalizadores desta reação (CABRAL, 2009).

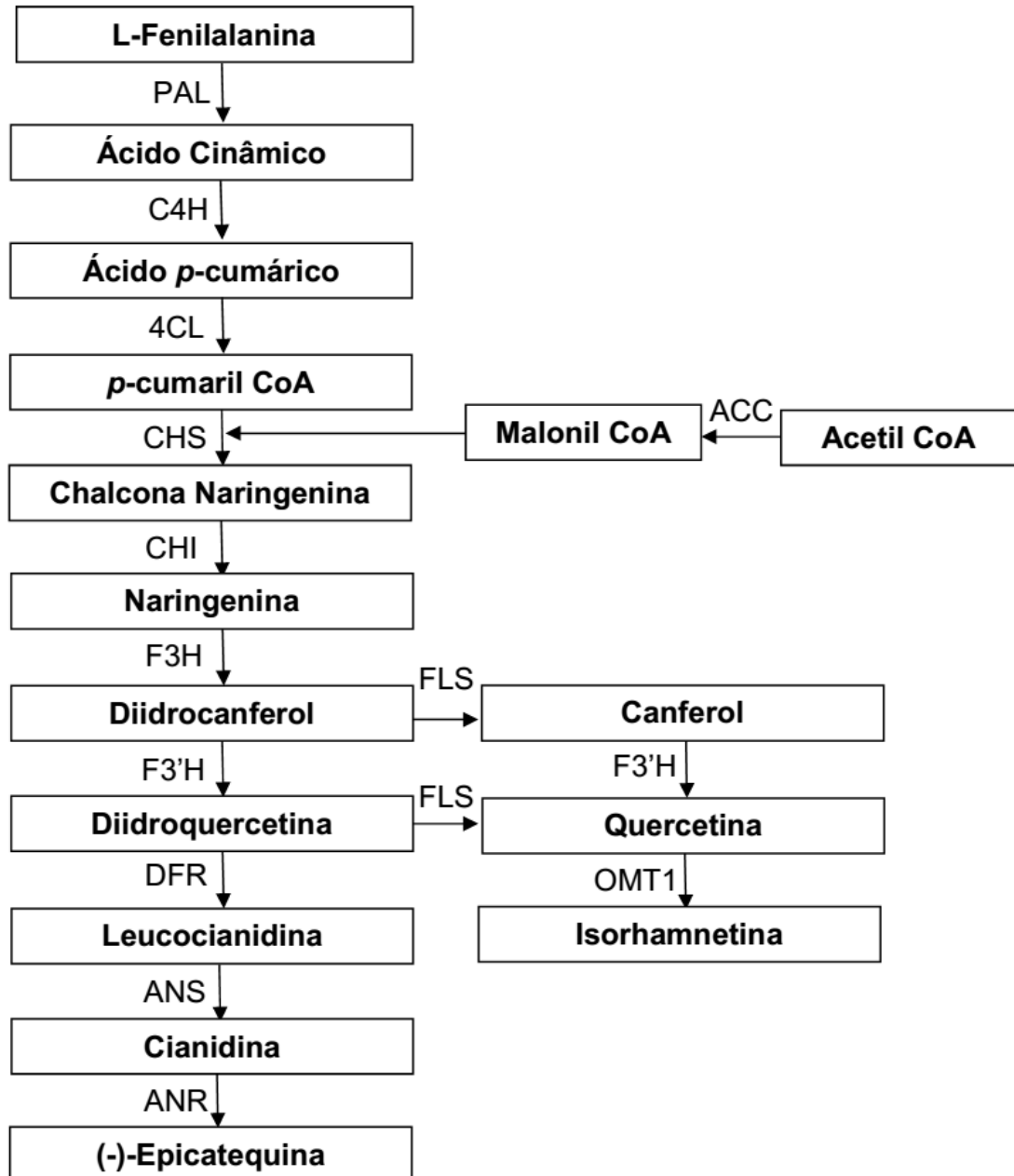
A formação de isoflavonas a partir de flavanonas se dá pela participação de uma enzima monoxigenase citocromo P450 mista denominada 2-hidroxiisoflavanona sintase (IFS). Ela tem como substrato a 5-hidroxi e 5-deoxiflavanona. A reação em questão envolve um rearranjo oxidativo da flavanona, incluindo a troca do anel da posição 2 para a 3. (DEWICK, 1994). Ainda segundo o autor, a síntese de pterocarpanos procede das isoflavonas, através de intermediário pterocarpeno. O processo é mediado pela enzima pterocarpano sintase (PTS). A transformação de pterocarpanos hidroxilados na posição 6a se dá a partir de ação específica da enzima pterocarpano 6a-hidroxilase (P6aH). As prenilações nesta classe de isoflavonóides são bem frequentes e ocorrem pela presença de enzima específica, a pterocarpano prenil transferase (PTP).

A enzima flavanona 3-hidroxilase (FHT) é uma 2-oxoglutarato dioxigenase dependente que catalisa a oxigenação na posição 3 da flavanona (2S-naringenina) para formar o diidroflavonol (diidrocanferol) que é intermediário na rota biossintética de flavanóis, catequinas, procianidinas e antocianidinas. A flavonoide 3'-hidroxilase (F3'H) é uma monoxigenase citocromo P450 que hidroxila a posição 3' do anel B dos flavonoides. Esta enzima pode ter como substrato o canferol ou diidrocanferol e convertê-los em quercetina e diidroquercetina, respectivamente.

A flavonol sintase (FLS) é responsável pela produção de flavanóis e catalisa a formação de uma dupla ligação entre os carbonos C2 e C3. A diidroflavonol redutase (DFR) promove a redução de diidroflavonóis para formação de antocianina e proantocianidina através da redução do grupo 4-ceto do diidroflavonol para a leucoantocianidina correspondente. O primeiro composto colorido na via biossintética das antocianinas é a antocianidina que exibe um sistema de dupla ligação conjugada englobando os anéis A, B e C. A enzima leucoantocianidina dioxigenase/antocianidina sintase (LDOX/ANS) catalisa a formação da antocianidina e da leucoantocianidina consumindo 2-oxoglutarato e oxigênio como substrato. O mecanismo de reação desta enzima foi investigado e foi possível concluir que a conversão realizada pela LDOX/ANS 2-oxoglutarato dependente da leucoantocianidina (flavan-3,4-cis-diol) à pseudobase (3-flaven-2,3-diol), provavelmente ocorre via 3-oxidação, 2,3-dessaturação e isomerização seguida de estabilização por glicosilação na posição C-3 (NAKAJIMA et al., 2001; WELFORD et al., 2001).

Para a formação das proantocianidinas, a antocianidina redutase (ANR) catalisa a redução NADPH dependente da cianidina à (-)-epicatequina (cisflavan-3-ol). A enzima similar leucoantocianidina redutase (LAR) é responsável pela redução de leucoantocianidina à catequina (trans-flavan-3-ol) e foi descrita em legumes, parreiras e álamo (TANNER et al., 2003; BOGS et al., 2005; YUAN et al., 2012).

No fluxograma 2 (p. 66) é possível ver uma ilustração esquemática da biossíntese de flavonoides. O Quadro 8 (p. 67) contém uma lista de enzimas envolvidas no processo de biossíntese de várias classes de flavonoides.



Fluxograma 2. Representação geral da biossíntese de flavonoides.

Enzima	Sigla
<i>Acetil-CoA carboxilase</i>	ACC
<i>Fenilalanina amônia liase</i>	PAL
<i>Cinamato-4-hidroxilase ligase</i>	C4H
<i>4-Cumarato-CoA ligase</i>	4CL
<i>4-Cumaril-CoA 3-hidroxilase</i>	CC3H
<i>Chalcona sintase</i>	CHS
<i>Policetídio redutase</i>	PKR
<i>Chalcona isomerase</i>	CHI
<i>2-Hidroxiisoflavanona sintase</i>	IFS
<i>2-Hidroxiisoflavanona desidrase</i>	IFD
<i>Flavona sintase I</i>	FNS I
<i>Flavona sintase II</i>	FNS II
<i>Flavanona 4-redutase</i>	FNR
<i>Flavanona 3-hidroxilase</i>	FHT
<i>Flavonol sintase</i>	FLS
<i>Dehidroflavonol 4-redutase</i>	DFR
<i>Leucoantocianidina 4-redutase</i>	LAR
<i>Antocianidina sintase</i>	ANS
<i>Flavonoide 3-O-glucosiltransferase</i>	AGT
<i>Pterocarpano sintase</i>	PTS
<i>Pterocarpano 6a-hidroxilase</i>	P6aH
<i>Prenil-pterocarpano transferase</i>	PTP
<i>Prenil transferase</i>	PT
<i>2'-Hidroxiliase isoflavona</i>	2'H
<i>Isoflavona redutase</i>	IFR
<i>S-Adenosil metionina</i>	SAM
<i>2- Hidroxiisoflavanona desidrase</i>	2HFR
<i>3', 5'-hidroxilase</i>	3', 5'-H
<i>O-metiltransferase</i>	OMT1
<i>Antocianidina redutase</i>	ANR

Quadro 8. Enzimas envolvidas no processo de biossíntese de várias classes de flavonoides.

3.5 Cromatografia

A cromatografia é uma técnica de separação na qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fixa e de grande área superficial, denominada fase estacionária, e outra, denominada fase móvel, um fluido que percola através da fase estacionária (LANÇAS, 2009). Esta separação fundamenta-se na migração diferencial dos componentes da mistura condicionada por interações físico-químicas entre os analitos e as fases (PERES, 2002).

Os componentes que são fortemente retidos na fase estacionária movem-se muito lentamente no fluxo da fase móvel. Ao contrário, os componentes que se ligam fracamente à fase estacionária movem-se mais rapidamente. Como consequência dessa diferença na mobilidade, os componentes da amostra separam-se em bandas ou zonas discretas que podem ser analisadas qualitativa e/ou quantitativamente (SKOOG et al., 2002).

A invenção da técnica é atribuída ao russo Mikhael Tswett, no início do século XX, o qual foi capaz de separar pigmentos coloridos em extratos de folhas verdes de plantas, utilizando um tubo preenchido com carbonato de cálcio, daí o termo cromatografia ser utilizado para descrever o fenômeno responsável pelo movimento das zonas coloridas dentro do tubo de vidro. Até o final da década de 60, a cromatografia líquida era praticada, com pequenas modificações, de modo similar àquela proposta por Tswett. A partir da década de 70, várias modificações foram introduzidas nesta área, onde o termo cromatografia líquida moderna foi proposto por Snyder e Kirkland. (LANÇAS, 2009).

3.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

Dentre as modificações que ocorreram a partir da década de 70, a cromatografia adquiriu seu grau de automação. Foram implementados computadores para o monitoramento dos parâmetros experimentais, além do uso de tecnologias mais sofisticadas, como o emprego de fases estacionárias mais eficientes e bombas para líquidos de alta pressão, o que contribuiu para o surgimento de uma nova técnica, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (LANÇAS, 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC – High Performance Liquid Chromatography) utiliza instrumentos muito sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados, e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de promover separações dos constituintes e análises qualitativas e quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS et al., 1997).

A CLAE é a técnica analítica de separação mais usada. As razões para a popularidade do método são a sua sensibilidade, a fácil adaptação para determinações quantitativas, a sua adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, a sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria, para muitos campos da ciência e para o público. Exemplos desses materiais incluem: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, hidratos de carbono, drogas, terpenoides, pesticidas, antibióticos, esteroides, espécies organo-metálicas e muitas substâncias inorgânicas (SKOOG et al., 2002).

Nos últimos doze anos foram desenvolvidos vários detectores espectrofotométricos, bem como acoplamento com o espectrômetro de massas, tornando possível a detecção da maioria dos compostos e análise de traços em amostras complexas, como sangue, urina, solo, alimentos, petróleo, etc (MALDANER & JARDIM, 2009).

De acordo com a figura 7 (p. 70), o solvente que se encontra no reservatório é bombeado com o auxílio da bomba através do sistema de introdução da amostra até a coluna cromatográfica, situada dentro de um forno para colunas. Nela, efetua-se a separação dos componentes da mistura de acordo com a natureza da fase móvel, fase estacionária e dos componentes analisados. A fase móvel sai da coluna e passa por um sistema de detecção, onde são identificadas alterações de alguma propriedade física específica. Esta variação é transformada num sinal elétrico, que é convenientemente registado e tratado matematicamente por um software. O gráfico obtido chama-se cromatograma.

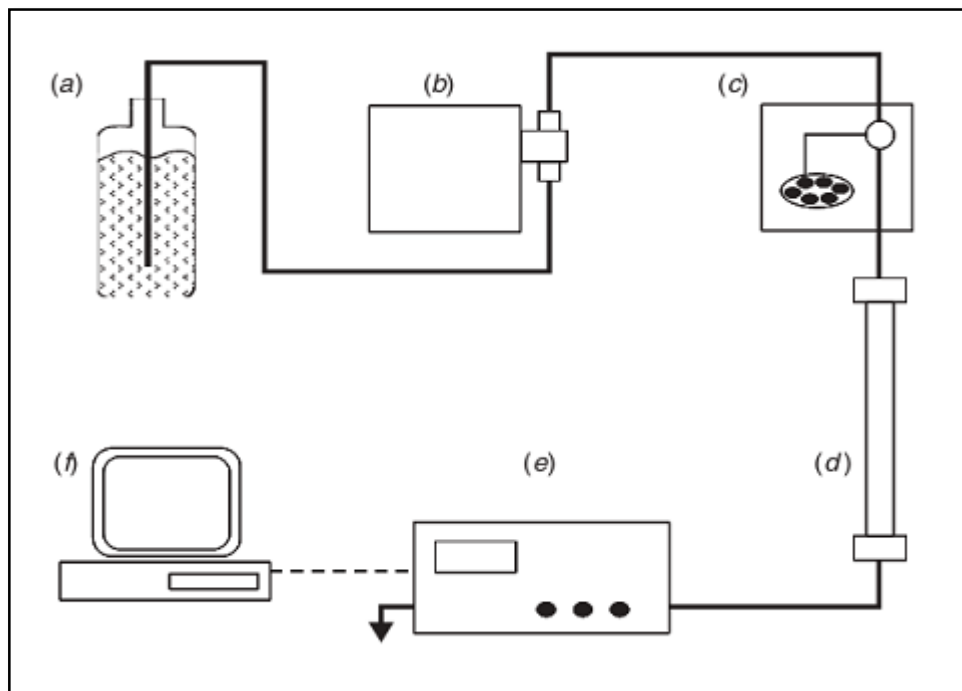


Figura 7. Esquema de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). (a) reservatório da fase móvel; (b) Bomba; (c) auto injetor; (d) coluna; (e) detector; (f) software de aquisição (SNYDER et. al., 2010).

3.6 Controle de qualidade de produtos naturais

O consumo de plantas medicinais “in natura” ou sob a forma de produtos derivados, cresce de maneira significativa no Brasil e em todo o mundo. Esta demanda é muito influenciada pela propaganda e divulgação nos meios de comunicação. Comumente, estes produtos são veiculados como recursos terapêuticos alternativos, isentos de efeitos indesejáveis e desprovidos de toxicidade. Logo, observa-se uma comercialização descontrolada em locais públicos, e na venda de formas derivadas simples em farmácias, supermercados e outros estabelecimentos comerciais (SILVEIRA et al., 2008).

De forma geral, os fatores da expansão da fitoterapia devem-se aos efeitos adversos de fármacos sintéticos, à preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”, crescente validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, desenvolvimento de novos métodos analíticos para o controle de

qualidade, desenvolvimento de novas formas de preparações e administração dos produtos e relativo baixo custo (MELO et al., 2007).

Cordeiro e colaboradores (2005) concluíram que o consumo e a utilização indiscriminada de produtos naturais acarretam no desenvolvimento de vários efeitos adversos quando são associados a alimentos ou outros medicamentos e enfatizam que o ditado popular “produto natural não faz mal” é um erro grave.

Foram realizados vários estudos envolvendo controle de qualidade de produtos naturais e foi possível observar que na grande maioria dos estudos, os materiais analisados sempre apresentavam um ou mais dos parâmetros avaliados fora dos valores preconizados pela monografia oficial, evidenciando-se a baixa qualidade das drogas vegetais comercializadas (NUNES et al., 2003; MELO et al., 2007; ALVARENGA et al., 2009; BARBOSA et al., 2010).

No que diz respeito ao controle microbiológico dos produtos naturais, é de suma importância a realização da quantificação de microrganismos devido à segurança e eficácia dos produtos. As falhas nas medidas preventivas e de controle do manuseio e processo de fabricação podem levar ao comprometimento do desempenho do produto como a quebra da estabilidade da formulação, a alteração das características físicas (cor, viscosidade) e químicas (inativação do princípio ativo) do produto, com graves consequências à saúde do consumidor, pelo uso de produtos em desacordo com suas características de qualidade estabelecidas, ocasionando danos aos pacientes (YAMAMOTO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2005; SIMÕES et al., 2007).

Sendo assim, é necessária a realização do controle de qualidade das matérias-primas vegetais, visando a obtenção de drogas vegetais e medicamentos fitoterápicos padronizados, eficientes e seguros, segundo as normas estabelecidas pela legislação brasileira.

Visando regular o registro de novos medicamentos fitoterápicos no país a ANVISA publicou a RDC 26 de 13 de maio de 2014 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Esta legislação busca padronizar os ensaios necessários para a garantia da qualidade dos produtos originados de produtos naturais.

Em relação à droga vegetal, deve ser apresentado laudo de análise da droga vegetal, indicando o método utilizado, especificação e resultados obtidos para os seguintes testes: avaliação organoléptica; identificação macroscópica e

microscópica; determinação de matérias estranhas, teor de água, cinzas totais, metais pesados, contaminação microbiológica; descrição da coleta e condições de cultivo; métodos de secagem e conservação descritos; perfil cromatográfico e quantificação dos marcadores (BRASIL, 2014).

Para o derivado vegetal, devem ser avaliados os solventes residuais; relação aproximada droga vegetal: derivado vegetal; determinação de metais pesados, perfil cromatográfico, teor dos marcadores e contaminação microbiológica. Caso apresente-se na forma de extratos fluidos devem ser analisadas as características organolépticas, resíduo seco, pH, teor alcoólico e densidade relativa. Já no caso dos extratos secos, determinar o teor de água, solubilidade e densidade aparente. E para os produtos acabados são avaliados o perfil cromatográfico comparado ao perfil da droga vegetal que o originou, teor dos marcadores e controle da qualidade do fitoterápico de acordo com a forma farmacêutica apresentada (BRASIL, 2014).

3.7 Validação de metodologia analítica

A validação consiste em um conjunto de procedimentos que devem garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Através de estudos experimentais, a validação deve demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise (BRASIL, 2003).

Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método, os quais dividem-se em quatro categorias: (I) testes quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matéria-prima; (II) testes quantitativos ou ensaio-limite para determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos ou matéria-prima; (III) teste de performance e (IV) testes de identificação (RIBANI et al., 2004; ICH, 2005).

3.7.1 Seletividade / Especificidade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa como ativos, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

É o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método analítico e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra. Uma segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão, utilizando-se isto como uma indicação da presença do composto puro (RIBANI et al., 2004).

3.7.2 Linearidade

De acordo com a RE 899/2003, a linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes (BRASIL, 2003).

O tratamento dos dados da linearidade caso haja correlação linear, baseia-se em um conjunto de medições experimentais como a regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes

de regressão estimados. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (RIBANI et al., 2004).

A faixa de aplicação da linearidade corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão. A ANVISA especifica um intervalo compreendido entre 80-120% da concentração teórica para fármacos (SWARTZ & KRULL, 1998).

3.7.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A partir dos resultados obtidos, calcula-se a média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV%), expresso em termos de percentagem. A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A repetibilidade ou precisão intra-corrída representa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. É verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003; SHABIR, 2003).

A Precisão intermediária ou precisão inter-corrídas corresponde à concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003; VIAL & JARDY, 2009).

E a Reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial representa a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica (THOMPSON et al., 2002; BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

3.7.4 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita (RIBANI et al., 2004).

O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. O ICH e a ANVISA estabelecem que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração devem ser obedecidos (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

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

3.7.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) corresponde a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificado, sob condições experimentais estabelecidas. Em métodos instrumentais como a CLAE, esta estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas. Pode ser determinado por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível que apresente precisão e exatidão aceitáveis. Ou ainda, através da relação sinal: ruído, considerando a concentração que produza uma relação de 10:1 (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

3.7.6 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez.

Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em HPLC, programação da temperatura, bem como o tempo de extração, agitação, etc. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos.

De acordo com a legislação vigente o “Guia para validação de métodos analíticos”, para avaliar a robustez em um método em CLAE é necessário variar condições como a composição da fase móvel, pH, fluxo da fase móvel em CLAE, temperatura da coluna, coluna de fabricantes diferentes e/ou lotes diferentes, além dos procedimentos de preparo das amostras.

3.8 Estudos de fotoestabilidade

Os guias disponíveis e estabelecidos pelo ICH (International Conference on Harmonisation) preconizam testes de fotoestabilidade tanto para a substância ativa como para os produtos acabados (ICH, 2003). O teste tem como objetivo demonstrar que uma exposição à luz não resulta em alterações significantes no produto (BRASIL, 2012).

De acordo com a Anvisa, existem duas opções para fontes de luz. A primeira opção, utiliza-se fonte de luz similar ao padrão de emissão D65/ID65, como uma lâmpada fluorescente artificial combinando emissão visível e UV. D65 é o padrão internacional reconhecido para luz do dia, como definido na ISO 10977:1993. ID65 é o equivalente ao padrão de luz indireta de interiores. Para fonte de luz emitindo radiação significativa abaixo de 320nm, deve ser utilizado filtro(s) para eliminar tais radiações. Para a segunda opção, a amostra deve ser exposta à uma combinação das seguintes lâmpadas: a) Lâmpada branca fluorescente fria similar à ISO 10977:1993 b) Lâmpada fluorescente UV com espectro distribuído entre 320nm e 400nm, e emissão máxima de energia entre 350nm e 370nm.

Para realização do teste de fotoestabilidade, as amostras devem ser expostas a não menos que 1,2 milhões de lux.hora, integrados a uma energia de ultravioleta próxima de não menos que 200 watt.horas/m² (BRASIL, 2012).

3.9 Atividades biológicas

3.9.1 Atividade antimicrobiana

Substâncias antimicrobianas ou antibióticas constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações, devem possuir atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, e, além de prevenir o desenvolvimento de microrganismos resistentes devem apresentar ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro e estabilidade química, entre outras características (COWAN, 1999).

As doenças infecciosas representam uma das principais causas de morte no mundo com predominância em regiões tropicais. Nos países em desenvolvimento, o tratamento de tais doenças é difícil não só devido à ocorrência de microrganismos resistentes, mas também por causa da baixa renda da população, que reduz a acessibilidade a medicamentos adequados (KUETE et al, 2011).

Como alternativa ao crescente desenvolvimento de resistência e patogenicidade desenvolvido pelos microrganismos, são desenvolvidas muitas pesquisas cujos objetivos são avaliar os efeitos farmacológicos de extratos vegetais como estratégia para a descoberta de novos medicamentos de origem vegetal. O Brasil é o país com maior potencial para pesquisa com plantas medicinais por ter a mais rica biodiversidade do planeta, distribuído em seis biomas distintos (NOLDIN et al., 2006).

As plantas produzem uma variedade de metabólitos secundários com potencial antimicrobiano e imunomodulador na tentativa de se adaptarem às agressões geradas pelo meio ambiente. Essas substâncias são isoflavonoides, indóis, fitosteróis, polissacarídeos, sesquiterpenos, alcaloides, glucanas, e taninos (WILLIAMS, 2001).

Atribui-se aos flavonoides e taninos a capacidade de inibir o crescimento ou provocar a morte de microrganismos. Os flavonoides podem inibir importantes enzimas virais como a transcriptase reversa e diversas proteases, bem como

destruir protozoários patogênicos, trazendo baixa toxicidade às células animais (HAVSTEEN, 2002). Já os taninos são os componentes que apresentam a maior toxicidade em relação aos microrganismos, em especial os taninos condensados. Atuam sobre inibição de enzimas extracelulares, privação de substratos, comprometimento do metabolismo e ação sobre a membrana celular (SCALBERT, 1991).

Desta forma, é necessário buscar alternativas de fármacos que possam ser usados no tratamento de infecções ou adaptar as drogas existentes para que elas possam voltar a ter a ação esperada. Nesse contexto, numerosas pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de plantas contra bactérias, fungos, protozoários e vírus têm sido realizadas, e as plantas medicinais podem ser empregadas como fonte de novos agentes antimicrobianos.

3.9.2 Atividade antioxidante

A presença do oxigênio, essencial ao funcionamento das células do organismo, caracteriza-se pela contínua produção de radicais livres que é equilibrada pela atividade de agentes antioxidantes não enzimáticos e pela atividade das enzimas antioxidantes. Assim, em condições fisiológicas, há equilíbrio entre agentes oxidantes e as defesas antioxidantes. Quando esse equilíbrio é rompido em favor dos agentes oxidantes, diz-se que a célula ou organismo se encontra sob estresse oxidativo, com potenciais danos ao sistema biológico (BARREIROS et al., 2006).

Os radicais livres e algumas espécies não radicalares, são moléculas muito reativas, derivadas de oxigênio e nitrogênio e formadas fisiologicamente no corpo humano. Esta formação envolve, por exemplo, o combate aos microrganismos invasores e à modulação celular de certos processos (BHoola et al., 2003).

Considera-se um radical livre qualquer espécie química capaz de existir independentemente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. A presença destes elétrons desemparelhados confere a esta espécie um caráter paramagnético, ou seja, uma alta reatividade e um pequeno tempo de meia-vida. Os principais radicais livres envolvidos no processo de estresse oxidativo são os radicais de oxigênio ou espécies reativas de oxigênio (EROs). Entre as EROs encontram-se os radicais: hidroxila (-OH); superóxido (O^{2-}); peroxil (ROO-); alcóxil

(RO-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2 – não radicalar). Existem também outros radicais que participam do processo oxidativo, tais como os radicais de nitrogênio e alguns metais de transição (LLESUY, 2002; MARRONI, 2002).

No organismo, a produção de radicais livres está envolvida em vários processos fisiológicos como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas. Porém, se a produção de radicais livres supera a capacidade antioxidante em um sistema vivo, espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) podem reagir com lipídios, proteínas, enzimas e com o DNA, conduzindo a dano estrutural e/ou funcional nas células (BARREIROS et al., 2006).

Os flavonóides e outros derivados fenólicos são conhecidos por atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes, como o ânion superóxido, radical hidroxila ou radical peróxido (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007).

Quimicamente, existem três características que conferem aos flavonoides suas importantes propriedades antioxidantes (RICE-EVANS et al., 1997). A primeira ocorre devido aos substituintes doadores de hidrogênio, grupos hidroxilas vicinais no anel B (grupamento catecol) que permitem aos flavonoides sofrerem uma reação redox ajudando-os a capturar radicais livres mais facilmente. O segundo trata-se de um sistema de deslocamento estável entre anéis aromáticos, heterociclicos e múltiplas uniões insaturadas pela presença de dupla ligação na posição C2-C3 conjugada com um grupamento 4-oxo. Além disso, a presença da hidroxila na posição 3 no anel heterocíclico (C) e as hidroxilas 5 e 7 do anel (A) aliadas ao grupamento 4-oxo também aumentam a atividade antioxidante (SICHEL et al., 1991; FIRUZI et al., 2005; SANDHAR et al., 2011). A molécula do flavonoide quercetina (Figura 8, p. 80) possui este arranjo estrutural o que favorece seu emprego como substância padrão em estudos de avaliação da atividade antioxidante (PASCOAL et al., 2011).

A atividade antirradicalar utilizando o radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), tem sido muito utilizado para verificar a capacidade sequestradora de radicais livres de muitos produtos naturais (ASSIMOPOULOU et al., 2005). O DPPH é um radical cromóforo estável, com absorção máxima em 518 nm, em meio etanólico, apresentando solução de coloração violeta intensa e ao ser reduzido forma a 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com consequente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada

pelo decréscimo da absorbância (ARNAO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2009). Na Figura 9 (p. 81) é possível observar a estrutura química do DPPH antes e após a reação com o antioxidante.

A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante) ou sequestradora de radicais e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional.

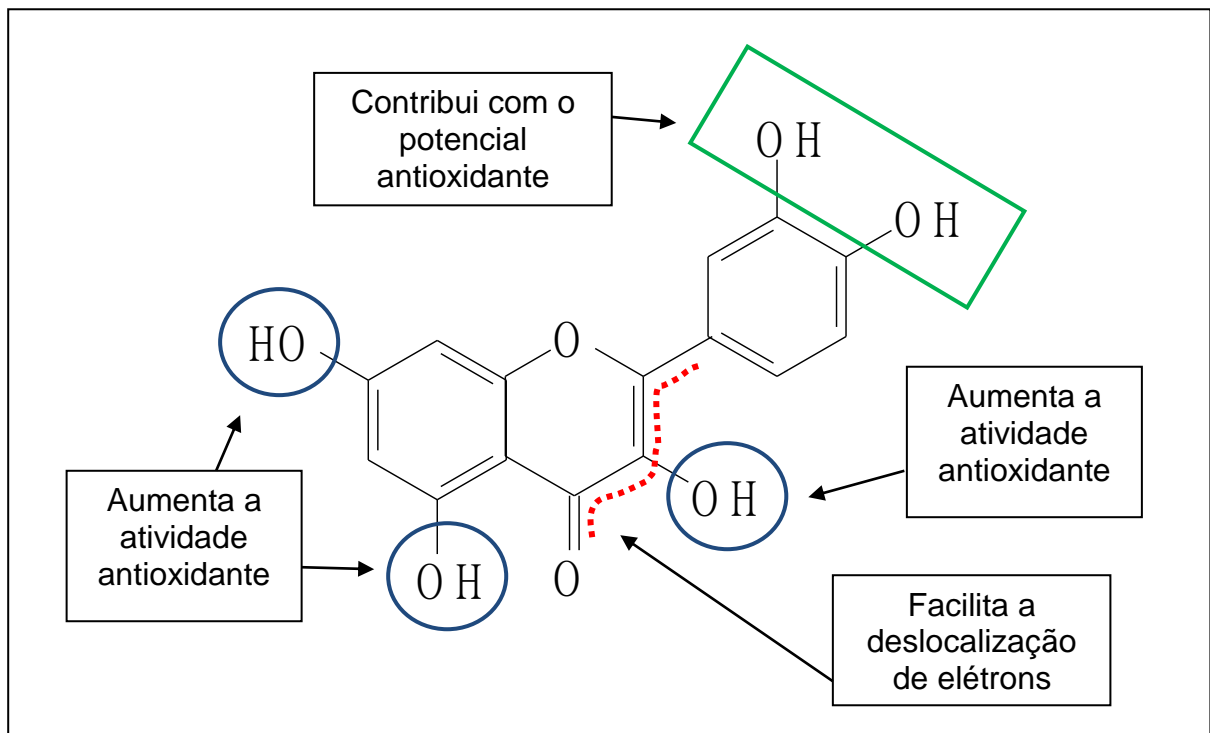


Figura 8. Regiões da estrutura flavonoidica com potencial antioxidante.

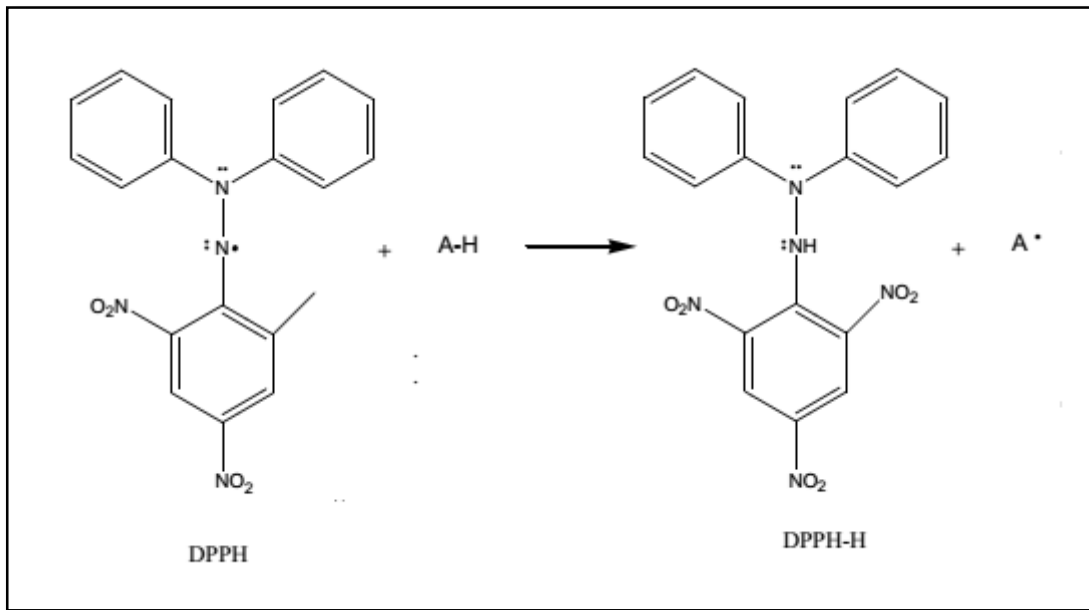


Figura 9. Estrutura do DPPH antes e após a reação com o antioxidante (RUFINO et al., 2007).

Diante do exposto, de modo a avaliar o potencial do material vegetal seco e do extrato etanólico obtido a partir das folhas de *Maytenus obtusifolia* Mart., faz-se necessário a execução de um rigoroso controle de qualidade para a padronização de especificações do material. Bem como garantir o teor e a pureza dos marcadores com vistas a torná-lo um promissor medicamento fitoterápico.

PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material Botânico

O material vegetal utilizado foi coletado no município de Santa Rita, Estado da Paraíba, em junho de 2014, e identificado pela botânica Profa. Maria de Fátima Agra do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB). Uma exsicata desta espécie encontra-se catalogada no Herbário JPB/UFPB. Coleção de M. F. Agra et al., 3230.

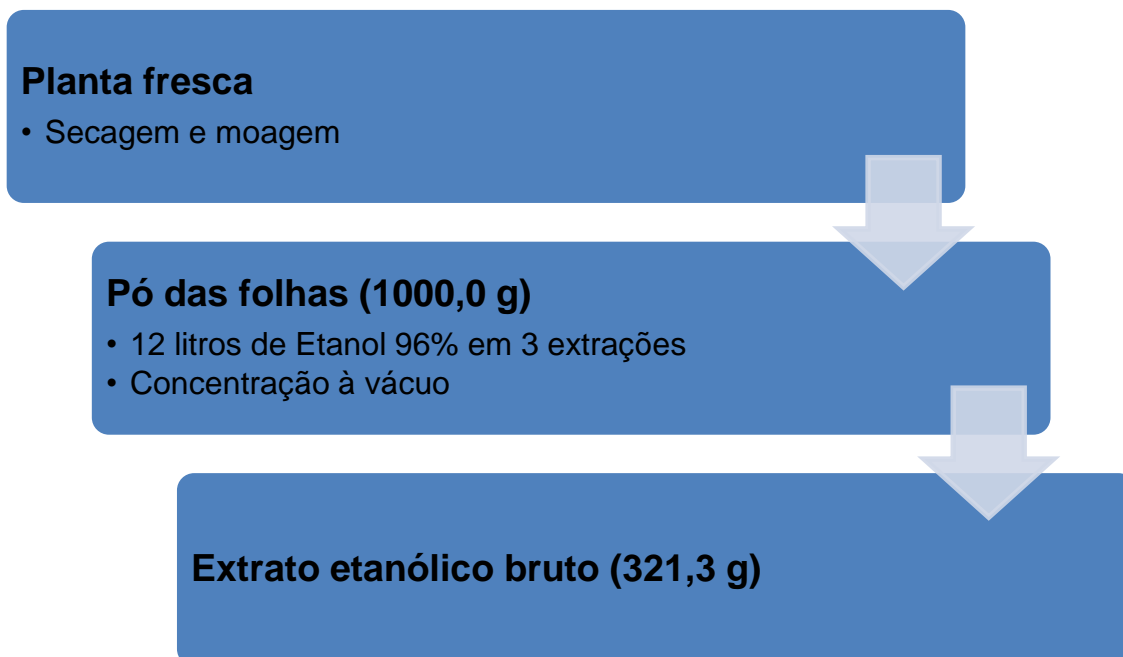
4.2 Processamento das folhas de *Maytenus obtusifolia* Mart.

As folhas de *Maytenus obtusifolia* Mart. foram secas em estufa com ar circulante à temperatura de 40 °C durante 96 horas. Em seguida, o material vegetal foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico tipo Harley, obtendo-se 1.512,1 g de pó seco das folhas.

4.3 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas

O material vegetal seco e pulverizado foi pesado (1.000 g) e submetido à maceração exaustiva com etanol a 96% em recipiente de aço inoxidável. Foram realizados três processos de extração contendo 4 litros de solvente em cada repetição e intervalos de 72 horas entre eles, com objetivo de extrair a maior quantidade de constituintes químicos. As soluções extrativas foram filtradas e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida a temperatura de 45 °C.

Após a evaporação do solvente, obteve-se o extrato etanólico bruto (EEB), de coloração verde escura e que pesou 321,3 g de extrato bruto das folhas (32,13 % em relação ao peso seco da planta). O fluxograma 3 (p. 84) esquematiza o processo descrito acima.



Fluxograma 3. Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas de *Maytenus obtusifolia* Mart.

4.4 Controle de qualidade do material vegetal

O pó obtido das folhas de *Maytenus obtusifolia* Mart. foi submetido a vários testes de controle de qualidade para assegurar a qualidade do material vegetal. Os ensaios foram realizados de acordo com os métodos gerais descritos no volume 1 da Farmacopéia Brasileira 5ª edição e estão disponíveis na Tabela 1 (p. 85).

Tabela 1. Ensaio de controle de qualidade do material vegetal de *Maytenus obtusifolia* Mart.

Ensaio	Referência
Determinação de água em drogas vegetais	Farmacopéia Brasileira 5 ^a edição, vol. 1
Determinação de cinzas totais	
Determinação de cinzas sulfatadas	
Ensaio limite de metais pesados	
Determinação da densidade aparente de sólidos	
Flavonóides totais	
Taninos totais	
Determinação da contaminação microbiológica	
Compostos fenólicos totais	
	SINGLETON et al., 1999.

4.4.1 Determinação de água em drogas vegetais

Três métodos são empregados para a determinação de água em drogas vegetais: método gravimétrico (dessecação), método azeotrópico (destilação com tolueno) e método volumétrico (Karl Fischer). Os métodos escolhidos para o ensaio foram o gravimétrico e o volumétrico (Karl Fischer) e em adição foi realizada a quantificação do teor de água por balança de infravermelho. Todos foram realizados em triplicata.

4.4.1.1 Método gravimétrico

Transferiu-se cerca de 2 g, exatamente pesados, de amostra para pesa-filtro tarado, previamente dessecado nas mesmas condições a serem adotadas para a amostra, durante 30 minutos. Em seguida, a amostra foi dessecada a 100-105 °C durante 5 horas, até peso constante. Calculou-se a porcentagem de água de acordo com a equação:

$$\% \text{ Água} = \frac{(Pa + Pf)_{inicial} - (Pa + Pf)_{final}}{Pa} \times 100$$

Onde: Pa – Peso da amostra (g)

Pf – Peso do pesa filtro (g)

4.4.1.2 Método volumétrico

Baseia-se na reação quantitativa entre a água e solução anidra de iodo e dióxido de enxofre dissolvidos em piridina e metanol. A amostra pode tanto ser titulada diretamente (método direto) quanto por retorno (método indireto). No ensaio foi utilizado o reagente de Karl Fischer padronizado obtido da Merck® (Combititrant 5®, Lote , Validade 08/2016).

Admite-se o emprego de qualquer equipamento que permita a exclusão adequada da umidade atmosférica e a determinação do ponto final da titulação. Para substâncias incolores, é possível detectar-se o ponto de equivalência pela mudança de cor do reagente, de amarelo canário para âmbar. Viragem inversa observada ao se adotar a titulação por retorno. Todavia é mais freqüente e preciso determinar-se o final da titulação eletrometricamente. Compreende o uso de dispositivo elétrico capaz de gerar diferença de potencial de 200 mV entre dois eletrodos de platina (área e distanciamento da ordem de 5 mm² e 2,5 cm, respectivamente) imersos na solução a titular. Ao ser atingido o ponto de equivalência, ligeiro excesso de reagente provoca elevação brusca do fluxo de corrente para 50 a 150 µA durante 30 segundos a 30 minutos, dependendo da natureza da amostra (o período é menor quando a substância é solúvel no reagente).

Transferiu-se 35 a 40 mL de metanol seco, para o recipiente de titulação e foi titulado com o reagente padronizado até viragem visual ou eletrométrica, com o

intuito de eliminar toda a umidade que poderia estar presente. Rapidamente, adicionou-se ao recipiente de titulação quantidade, exatamente pesada da amostra e foi misturada e titulada até viragem visual ou eletrométrica (BRASIL, 2010).

4.4.1.3 Determinação de água em balança de infravermelho

Transferiu-se cerca de 1,00 g, exatamente pesados, de amostra para o prato metálico previamente tarado. Em seguida a amostra foi dessecada a 100-105 °C até peso constante.

4.4.2 Determinação de cinzas

4.4.2.1 Determinação de cinzas totais

Para a realização do ensaio de cinzas, pesou-se, exatamente, 3,0000 g da amostra pulverizada e transferiu-se para o cadinho de platina previamente calcinado, resfriado e tarado. A amostra foi distribuída uniformemente no cadinho e foi incinerada aumentando, gradativamente, a temperatura até, no máximo, 600 ± 25 °C, até que todo o carvão fosse eliminado.

Após resfriamento em dessecador, o material foi pesado. A porcentagem de cinzas foi calculada pela equação:

$$\% \text{ Cinzas totais} = 1 - \left[\frac{(Pa + Pc)_{inicial} - (Pa + Pc)_{final}}{Pa} \right] \times 100$$

Onde: Pa – Peso da amostra (g)

Pc – Peso do cadinho (g)

4.4.2.2 Determinação de cinzas sulfatadas

Em cadinhos previamente calcinados, resfriados e tarados, pesou-se, exatamente, 1,0000 g da droga vegetal pulverizada. A amostra foi distribuída uniformemente no cadinho, ao qual foram adicionados 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida, a amostra foi carbonizada em bico de Bunsen até que não se observasse o desprendimento de fumaça branca. Após a carbonização, o cadinho foi incinerado na mufla, aumentando-se a temperatura gradativamente até a temperatura de 800°C, até que não fosse detectada a presença de partículas

negras. Após a primeira incineração, adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico concentrado ao resíduo. Os resíduos foram secos até peso constante.

Após resfriamento em dessecador, o material foi pesado. A porcentagem de cinzas sulfatadas foi calculada pela equação:

$$\% \text{ Cinzas sulfatadas} = 1 - \left[\frac{(Pa + Pc)_{inicial} - (Pa + Pc)_{final}}{Pa} \right] \times 100$$

Onde: Pa – Peso da amostra (g)

Pc – Peso do cadinho (g)

4.4.3 Ensaio limite de metais pesados

O ensaio limite consiste na formação de partículas sólidas dos sulfetos de metais pesados, em suspensão, e posterior comparação visual da intensidade da cor nas preparações amostra e padrão em tubo de Nessler. O ensaio é semiquantitativo e possibilita inferir se a amostra passa ou não no teste, representando o somatório da concentração dos elementos contaminantes na amostra.

No preparo da *Solução estoque de nitrato de chumbo*, dissolveu-se exatamente 159,8 mg de nitrato de chumbo em 100 mL de água adicionada de 1 mL de ácido nítrico. Em seguida diluiu-se com água para 1000 mL e homogeneizou-se. A solução foi preparada e armazenada em recipientes de vidro isentos de sais solúveis de chumbo.

A *Solução padrão de chumbo (10 ppm Pb)* foi preparada no dia do uso. Foram diluídos 10 mL da solução estoque de nitrato de chumbo para 100 mL com água. Cada mililitro dessa solução contém o equivalente a 10 µg de chumbo (10 ppm Pb).

Para o preparo do *Tampão acetato pH 3,5*, foram dissolvidos 25,0 g de acetato de amônio em 25 mL de água e adicionou-se 38 mL de ácido clorídrico 6 M. O pH foi ajustado em 3,5 com hidróxido de amônio 6 M e ácido clorídrico 6 M. Em seguida, foi diluído para 100 mL com água e posteriormente homogeneizado.

O reagente de tioacetamida foi preparado pela dissolução de 4 g de tioacetamida em água, em seguida o volume foi completado para 100 mL com água.

Foram transferidos 0,2 mL da solução reagente à 1 mL da mistura de hidróxido de sódio M, 5 mL de água e 20 mL de glicerina. O material foi aquecido em banho-maria por 20 s, resfriado e utilizado imediatamente.

No preparo da amostra, foram transferidos 2 g do pó das folhas de *Maytenus obtusifolia* Mart. para tubo adequado e diluiu-se com água para 25 mL. O pH foi ajustado para a faixa de 3,0 – 4,0 com ácido acético 1 M. Em seguida, a amostra foi diluída com água para aproximadamente 40 mL e foi, posteriormente, homogeneizada.

No preparo do padrão, foram transferidos 2 mL de solução padrão de chumbo (10 ppm Pb) para o tubo, em seguida foi diluído para 25 mL com água. O pH foi ajustado para a faixa de 3,0 – 4,0 com ácido acético 1 M. O padrão foi diluído novamente com água para aproximadamente 40 mL e, posteriormente, homogeneizado.

Para o preparo do controle transferiu-se, para um terceiro tubo, 2g da amostra e adicionou-se 2 mL de solução padrão de chumbo (10 ppm Pb). O pH foi ajustado para a faixa de 3,0 – 4,0 com ácido acético 1 M. Em seguida, o controle foi diluído com água para aproximadamente 40 mL e homogeneizado.

A cada uma das preparações, foram adicionados 2 mL de tampão acetato pH 3,5 e 1,2 mL de tioacetamida. Em seguida, foram realizadas novas diluições com água para 50 mL, homogeneizou-se e ficaram em repouso por 2 minutos. Após 2 minutos, uma coloração que varia do amarelo ao preto foi desenvolvida. Os tubos foram observados de cima para baixo, segundo o eixo vertical do tubo, sobre fundo branco.

4.4.4 Densidade aparente de sólidos

Para avaliação da densidade aparente de sólidos sem compactação, adicionou-se, cuidadosamente, quantidade do pó das folhas de *Maytenus obtusifolia* Mart. equivalente a 50 mL de uma proveta vazia previamente tarada na balança. O valor foi calculado segundo a equação:

$$\text{Densidade aparente (g/mL)} = \frac{m}{v}$$

Onde: m – massa da amostra (g)

v – volume ocupado pela amostra (mL)

4.4.5 Determinação do índice de espuma

Pesou-se, exatamente, 1 g do material vegetal reduzido a pó fino e transferiu-se para um erlenmeyer contendo 50 mL de água fervente. O conteúdo foi mantido sob fervura moderada por 30 minutos. Em seguida, após o resfriamento, foi filtrado para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado, através do filtro, até 100 mL.

O decocto obtido foi distribuído em 10 tubos de ensaio com tampa (16 mm de diâmetro por 16 cm de altura), em série sucessiva de 1 a 10 mL, e o volume do líquido foi ajustado em cada tubo para 10 mL com água. Os tubos foram agitados com movimentos verticais por 15 segundos, com duas agitações por segundo.

O material ficou em repouso por 15 minutos e a altura da espuma foi aferida. O índice de espuma foi calculado segundo a equação $1000/A$, sendo A o volume, em mililitros, do decocto usado para preparação da diluição no tubo onde a espuma foi observada.

4.4.6 Doseamento de flavonoides totais

O pó das folhas de *Maytenus obtusifolia* Mart. foi submetido aos dois testes disponíveis na 5ª edição da farmacopeia Brasileira, para quantificação de flavonoides totais.

4.4.6.1 Flavonoides totais calculados como Apigenina

Para o preparo da solução estoque, pesou-se, exatamente, cerca de 0,5 g da droga pulverizada e o material foi transferido para um balão de fundo redondo de 100 mL. Em seguida foram acrescentados à droga, 1 mL de solução aquosa de metenamina a 0,5% (p/v), 30 mL de solução de etanol a 50% (v/v) e 2 mL de ácido clorídrico.

O material foi aquecido em manta de aquecimento por 30 minutos, sob refluxo. A mistura foi filtrada através de algodão para balão volumétrico de 100 mL e o resíduo da droga juntamente ao algodão utilizado foram recolocados no balão de

fundo redondo. Adicionou-se mais 30 mL de solução de etanol a 50% (v/v) e foi aquecida novamente, sob refluxo, durante 15 minutos.

O material foi novamente filtrado através de algodão para o mesmo balão volumétrico de 100 mL. A operação foi repetida mais uma vez. Após resfriamento, o volume do balão volumétrico de 100 mL foi completado com solução de etanol a 50% (v/v).

Para o preparo da solução amostra, foram adicionados 10 mL da solução estoque em balão volumétrico de 25 mL contendo 2 mL de solução de cloreto de alumínio a 5% (p/v) em solução de etanol a 50% (v/v). Em seguida, o volume foi completado com solução de etanol 50% (v/v). Após 30 minutos foi realizada a leitura da amostra em espectrofotômetro. A solução branco foi preparada com 10 mL da Solução estoque em balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com solução de etanol a 50% (v/v). Na ausência do cloreto de alumínio.

As absorvâncias das amostras e do branco foram medidas a 425 nm, após 30 minutos do preparo das soluções, utilizando o branco para ajuste do zero. O teor de flavonoides totais, expressos em apigenina por 100 g de droga seca, foi calculado segundo a equação:

$$TFT = \frac{Abs \times 250}{(m - PD) \times 336,5}$$

Onde:

TFT = teor de flavonoides totais;

Abs = absorvância da solução amostra;

250 = fator de diluição;

m = massa da droga (g);

PD = perda por dessecação;

336,5 = absortividade específica da apigenina.

O mesmo método foi seguido para a determinação de flavonoides totais no extrato etanólico produzido.

4.4.6.2 Flavonoides totais calculados como Hiperosídeo

Para o preparo da solução estoque, pesou-se, exatamente, cerca de 0,4 g da droga pulverizada e o material foi transferido para um balão de fundo redondo de 100 mL. Em seguida foram acrescentados à droga, 1 mL de solução aquosa de metenamina a 0,5% (p/v), 20 mL de acetona e 2 mL de ácido clorídrico.

O material foi aquecido em manta de aquecimento por 30 minutos, sob refluxo. A mistura foi filtrada através de algodão para balão volumétrico de 100 mL e o resíduo da droga juntamente ao algodão utilizado foram recolocados no balão de fundo redondo. Adicionou-se mais 20 mL de acetona e foi aquecida novamente, sob refluxo, durante 10 minutos.

O material foi novamente filtrado através de algodão para o mesmo balão volumétrico de 100 mL. A operação foi repetida mais uma vez. Após resfriamento, o volume do balão volumétrico de 100 mL foi completado com acetona. Em seguida, transferiu-se 20 mL da solução acetônica para funil de separação (125 mL) contendo 20 mL de água destilada. A mistura foi agitada com 15 mL de acetato de etila, para promover a extração dos constituintes de acordo com a polaridade. Este procedimento de extração foi repetido por mais três vezes com porções de 10 mL de acetato de etila.

Ao fim do processo extrativo, as fases de acetato de etila foram reunidas e lavadas em funil de separação com duas porções de 50 mL de água destilada. A fase acetato de etila foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com acetato de etila.

Para o preparo da solução amostra, foram adicionados 10 mL da solução estoque em balão volumétrico de 25 mL contendo 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2% (p/v) em solução de ácido acético 5% (v/v) em metanol. Em seguida, o volume foi completado com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v). A solução branco foi preparada com 10 mL da solução estoque em balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v).

As absorvâncias das amostras e do branco foram medidas a 425 nm, após 30 minutos do preparo das soluções, utilizando o branco para ajuste do zero. O teor de flavonoides totais, expressos em hiperosídeo na amostra foi calculado segundo a equação:

$$TFT = \frac{Abs \times 1,25}{(m - PD)}$$

Onde:

TFT = teor de flavonoides totais calculados como hiperosídeo (%);

Abs = absorvância da solução amostra;

m = massa da droga (g);

PD = perda por dessecação (%; p/p).

O mesmo método foi seguido para a determinação de flavonoides totais no extrato etanólico produzido.

4.4.7 Doseamento de taninos totais

Para o preparo da solução estoque, pesou-se, exatamente, cerca de 0,750 g da droga pulverizada e o material foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL com boca esmerilhada. Em seguida foram acrescentados à droga 150 mL de água destilada. O erlenmeyer contendo o material foi aquecido em banho-maria durante 30 minutos à temperatura de 60° C.

Após resfriamento, o conteúdo do erlenmeyer foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL. O aparato de vidro foi lavado e as águas de lavagem com todo o conteúdo da droga vegetal foram transferidos para o mesmo balão volumétrico de 250 mL. O volume foi completado com água destilada. O material foi deixado em repouso para decantar e o líquido sobrenadante foi filtrado em papel de filtro, desprezando os primeiros 50 mL do filtrado.

Para o preparo da solução amostra de polifenóis totais (A1) foram diluídos 5 mL do filtrado em balão volumétrico de 25 mL com água destilada. Posteriormente, transferiu-se volumetricamente 2 mL dessa solução, 1 mL de reagente fosfomolibdotúngstico e 10 mL de água destilada para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com solução de carbonato de sódio a 29% (p/v). A absorvância foi determinada em 760 nm (A1) após 30 minutos, utilizando água destilada para ajuste do zero.

No preparo da solução amostra para polifenóis não adsorvidos por pó de pele (A2) foram pipetados 10 mL do filtrado e adicionou-se 0,1 g de pó de pele SQR. O material foi submetido à agitação mecânica em agitador magnético por 60 minutos. Em seguida foi filtrado em papel de filtro. Do filtrado, foi coletado uma alíquota de 5 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL com água destilada. Do balão anterior, foi transferido volumetricamente 2 mL desta solução, 1 mL de reagente fosfomolibdotúngstico e 10 mL de água destilada para balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado com solução de carbonato de sódio a 29% (p/v). A absorbância foi determinada em 760 nm (A2) após 30 minutos, utilizando água destilada para ajuste do zero.

O preparo da solução padrão foi feito pela solubilização, imediatamente antes do uso, de 50 mg de pirogalol em balão volumétrico de 100 mL com água destilada. Foram transferidos, volumetricamente, 5 mL da solução para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água destilada. Em seguida foram transferidos, volumetricamente, 2 mL da solução anterior, 1 mL de reagente fosfomolibdotúngstico e 10 mL de água destilada para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com solução de carbonato de sódio a 29% (p/v). A absorbância foi determinada em 760 nm (A3) após 30 minutos, utilizando água destilada para ajuste do zero.

O teor de taninos, em porcentagem, expressos em pirogalol foi calculado de acordo com a equação:

$$TT = \frac{62,5 \times (A1 - A2) \times m2}{A3 \times m1}$$

Onde:

TT = Teor de taninos totais calculados como pirogalol (%);

A1 = absorbância da solução amostra para polifenóis totais;

A2 = absorbância da solução amostra para polifenóis não adsorvidos em pó de pele;

A3 = absorbância da solução padrão;

m1 = massa da amostra utilizada no ensaio (g), considerando a determinação de água;

m2 = massa de pirogalol (g).

O mesmo método foi seguido para a determinação de taninos totais no extrato etanólico produzido.

4.4.8 Doseamento de compostos fenólicos totais

A concentração de compostos fenólicos no extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. foi determinada através do método espectrofotométrico desenvolvido por Singleton e colaboradores (1999).

Brevemente, 0,5 mL da solução metanólica do extrato de *Maytenus obtusifolia* Mart. (1mg/mL) foram misturados à 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau (diluído 1:10) e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 7,5% (m/v). Após 2 horas de incubação no escuro e à temperatura ambiente, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (Lambda 25, Perkin Elmer, USA) a 765 nm.

Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g de extrato), calculados por meio de uma curva padrão construída com concentrações que variaram de 5 a 200 µg/mL.

O extrato etanólico seco de *Maytenus obtusifolia* Mart. foi solubilizado em solução de metanol:água (9:1) e foi avaliado na concentração final de 200 µg/mL. Para a avaliação do teor de compostos fenólicos do pó das folhas da espécie, 1 g do pó foi submetido à extração com 10 mL da solução metanol:água (9:1) por 1 hora sob constante agitação em agitador magnético. Em seguida 1 mL da solução extrativa foi coletada, transferida para balão volumétrico e diluída até alcançar a concentração de 200 µg/mL.

4.4.9 Determinação da contaminação microbiológica

4.4.9.1 Determinação do número total de microrganismos mesofílicos

A metodologia foi realizada de acordo com as instruções descritas na Farmacopéia Brasileira 5ª edição, volume 1.

Foi preparada uma suspensão de 10,0 g da mistura de amostra em solução tampão cloreto de sódio-peptona pH 7,0. Em seguida, adicionou-se em placas de Petri, separadamente, 15 - 20 mL de ágar caseína soja e ágar Sabouraud-dextrose e

aguardou a solidificação. Adicionou-se à superfície de cada meio de cultura, 0,1 mL da amostra preparada.

As placas contendo ágar caseína-soja foram incubadas a $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ durante 3-5 dias e as placas contendo ágar Sabouraud-dextrose a $22,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ durante 5 - 7 dias para determinação do número de micro-organismos aeróbicos totais e bolores e leveduras, respectivamente.

4.4.9.2 Pesquisa de patógenos

4.4.9.2.1 Bactérias gram-negativas bile tolerantes

A amostra foi preparada utilizando a diluição 1:10 de não menos que 1 g do produto a ser testado, com caldo caseína-soja (Diluição A) como diluente. A diluição A foi homogeneizada e 1 mL do produto foi transferido para o Caldo de Enriquecimento de Enterobactérias segundo Mossel. A amostra foi incubada a $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ por 24 a 48 horas. O produto cumpre o teste se não houver crescimento de colônias.

4.4.9.2.2 *Escherichia coli*

A amostra foi preparada utilizando a diluição 1:10 de não menos que 1 g do produto a ser examinado. Utilizou-se 10 mL da diluição para 90 mL de Caldo de Enriquecimento (Caldo Caseína-soja). Foi homogeneizada e incubada a $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ durante 18 a 24 horas.

Para seleção e subcultura, transferiu-se 1 mL da amostra enriquecida para 100 mL de Caldo MacConkey. Incubou-se a $43\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante 24 – 48 horas. A subcultura foi realizada em placa de Agar MacConkey e incubada a $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ durante 18 a 72 horas. O produto cumpre o teste se não houver crescimento de colônias.

4.4.9.2.3 *Salmonella*

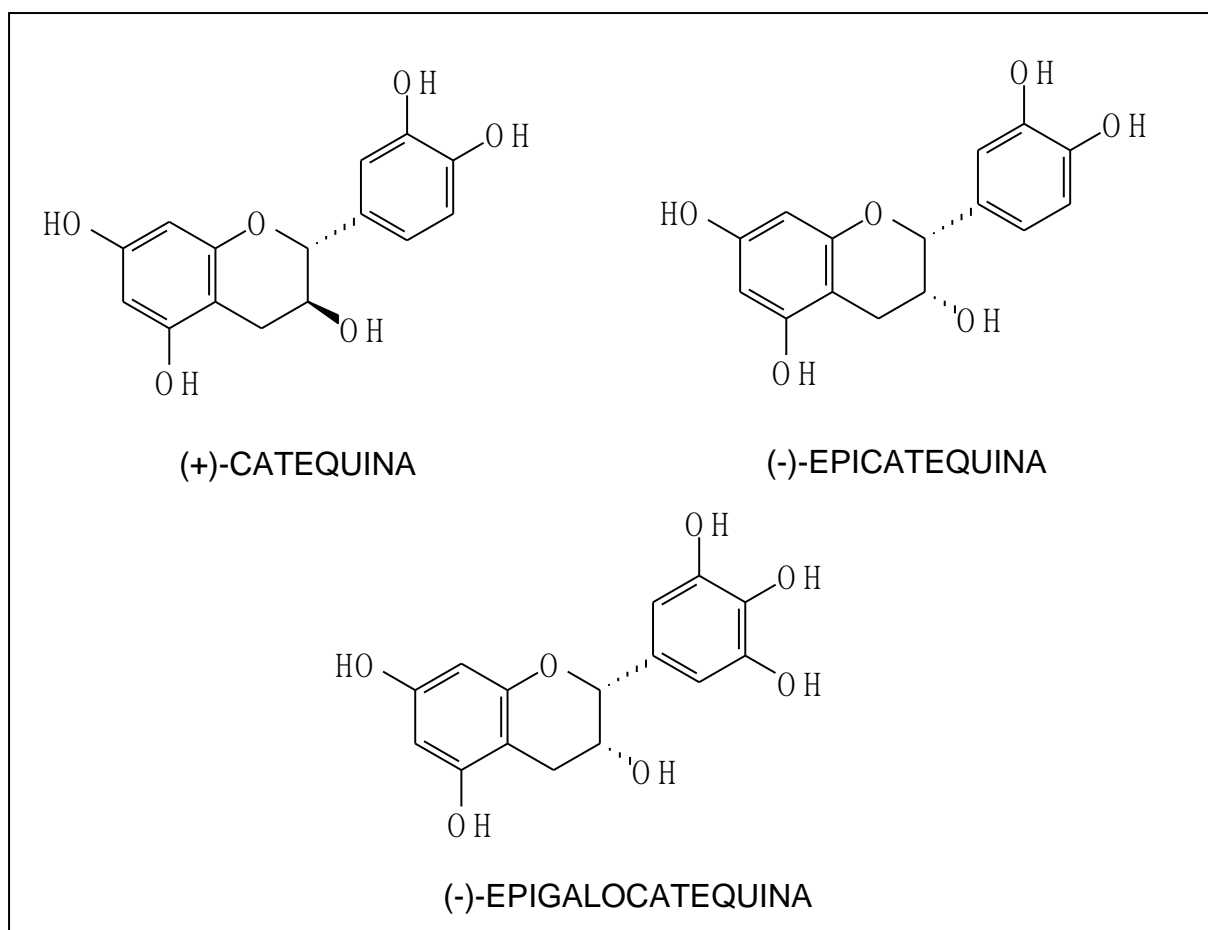
A amostra foi preparada usando a diluição 1:10 de não menos que 10 g, do produto a ser examinado. Homogeneizou-se e incubou-se a $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ durante 18 a 24 horas. Para seleção e subcultura, transferiu-se 0,1 mL do conteúdo para 10

mL de Caldo Enriquecimento Salmonella Rappaport Vassiliadis. Incubou-se a 32,5 °C \pm 2,5 °C durante 18 a 24 horas. A subcultura foi realizada em placa contendo Agar Xilose Lisina Desoxicolato e incubada a 32,5 °C \pm 2,5 °C durante 18 a 48 horas. O produto cumpre o teste se não houver crescimento de colônias.

4.5 Padronização química

4.5.1 Substâncias químicas de referência

As substâncias químicas de referência, utilizadas como marcadores nas análises por CLAE, foram adquiridas à (Phytolab, Vestenbergsgreuth, Alemanha) e apresentaram elevado grau de pureza (>99%). No quadro 9 (p. 97) são apresentados os marcadores utilizados na validação e suas respectivas estruturas.



Quadro 9. Marcadores utilizados na validação de *Maytenus obtusifolia* Mart. e suas respectivas estruturas.

As três substâncias químicas de referências são flavonoides da classe dos flavanóis. O composto (-)-Epigallocatequina corresponde ao (2R,3R)-2-(3,4,5-trihidroxifenil)-3,4-dihidro-1(2H)-benzopirano-3,5,7-triol. Enquanto a (+)-Catequina (2R,3S)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2H-cromeno-3,5,7-triol e seu isômero (-)-Epicatequina (2R,3R)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2H-cromeno-3,5,7-triol.

4.6 Solventes e reagentes

Os reagentes e solventes utilizados para as análises foram grau CLAE (Merck, Darmstadt, Alemanha). A água ultrapura foi obtida através do equipamento Milli-Q Gradient® (Millipore, Bedford, MA, EUA), utilizando-se água com condutividade menor que 0,50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ em todas as análises.

4.7 Desenvolvimento de metodologia analítica

As análises foram realizadas no laboratório de Controle de Qualidade da HEBRON – Indústria Química Farmacêutica Nacional, utilizando um cromatógrafo líquido (Young Lin, Coreia do Sul) (Figura 10, p. 99) série YL9100, constituído de bomba quaternária YL9110, detector de arranjo de diodos (DAD) YL9160, degasificador a vácuo YL9101, compartimento de coluna YL9131 e injetor automático YL9150. A coleta e o processamento de dados foram realizados utilizando o software YL-Clarity.

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna analítica C18 LiChrocart Purospher Star (Merck, Alemanha) com 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 μm de tamanho de partícula, com pré-coluna (Merck, Alemanha) 4x4 mm e mesma composição da coluna.

A fase móvel A consistiu em solução de ácido fosfórico 14mM e a fase móvel B de acetonitrila pura. Todas as soluções foram degaseificadas e filtradas através de membrana filtrante de 0,45 μm (Millipore, Bedford, EUA).

Foram preparadas soluções a partir do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. e das substâncias químicas de referência e em seguida foram submetidas à análise cromatográfica. As condições avaliadas durante o desenvolvimento do método estão relacionadas na Tabela 2 (p. 100). Em cada experimento observaram-se os tempos de retenção (T_r), áreas sobre os picos (A_p) e resolução (R_s) entre eles.



Figura 10. Cromatógrafo líquido acoplado a detector DAD Young Lin®.

Tabela 2. Condições cromatográficas avaliadas no desenvolvimento do método.

Condições	Experimento
Fase móvel	H ₃ PO ₄ 14mM: ACN (90:10) H ₃ PO ₄ 14mM: ACN (70:30) H ₃ PO ₄ 14mM: ACN (50:50) H ₃ PO ₄ 14mM: MeOH (90:10) H ₃ PO ₄ 14mM: MeOH (70:30) H ₃ PO ₄ 14mM: MeOH (50:50) Gradientes
Fluxo	0,8 mL/min 1,0 mL/min 1,2 mL/min
Temperatura	38°C 40°C 42°C
Comprimento de onda	210 nm 230 nm 280 nm 330 nm 350 nm
Solução diluente	MeOH H ₂ O:MeOH (50:50) H ₂ O:MeOH (85:15)

As separações foram realizadas através de um gradiente de eluição da seguinte forma: de 0 a 38 min, a solução B seguindo uma mudança linear de 5% a 25%, a partir de 38 a 40 min, isocrática com 25% de B e de 40-45 min, com a solução B alterando linearmente de 25% a 5% (Tabela 3, p. 101). Utilizou-se fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min, temperatura de forno 40°C e volume de injeção de 10 µL. Realizou-se a detecção por UV no comprimento de onda de 280 nm.

Tabela 3 – Descrição das condições cromatográficas para análise do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart.

<i>Coluna</i>	Coluna Lichrospher Lichrocart 5 μ , 150x4,6mm;
<i>Fase Móvel</i>	Gradiente
<i>Temperatura do Forno</i>	40°C
<i>Volume de Injeção</i>	10 μ L
<i>Comprimento de Onda</i>	280nm
<i>Fluxo</i>	1,0 mL/min
<i>Tempo de Análise</i>	40 minutos
<i>Método</i>	C:\YLClarity\Maytenusobtusifolia\EEMO.met

4.8 Validação de metodologia analítica

De acordo com a classificação para os testes analíticos, descrita na RE/ANVISA 899, de maio de 2003 (Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos), o método proposto enquadra-se na Categoria I, cujos ensaios necessários encontram-se na Tabela 4 (p. 102).

Tabela 4- Parâmetros avaliados na validação analítica do Extrato Etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart..

Características de desempenho		Especificações
Especificidade		Determinar a capacidade do método em medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, que podem interferir significativamente no resultado do teste.
Linearidade		Demonstrar a capacidade do método de obter resultados diretamente proporcionais à concentração do marcador na amostra, dentro de um intervalo especificado (5 concentrações diferentes no intervalo de 50 a 500%). Determinação do coeficiente de correlação (no mínimo 0,99); interseção com o eixo Y; coeficiente angular.
Intervalo		Intervalo de concentração de trabalho, com precisão, exatidão e linearidade aceitáveis.
Precisão	Repetibilidade	6 réplicas na concentração do extrato (100%).
	Intermediária	2 dias diferentes com analistas diferentes. DPR $\leq 5,0\%$
Exatidão		Proximidade dos resultados obtidos analiticamente em relação ao valor teórico. Análise em 3 concentrações (80, 100 e 120%), 3 réplicas cada. Recuperação: 90 – 110%.
Robustez		Capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Limite de aceitação de 95 – 105 %.

4.8.1 Especificidade

Este parâmetro foi avaliado por meio da comparação dos tempos de retenção e perfis de pureza dos três marcadores. As substâncias de referência foram analisadas nas seguintes concentrações: (-)-Epigallocatequina 0,02 mg/mL, (+)-Catequina 0,008 mg/mL e (-)-Epicatequina 0,0066 mg/mL.

O EEB de *Maytenus obtusifolia* Mart. foi analisado na concentração de 2 mg/mL. A fase móvel, solução diluente e o etanol 96% utilizados na preparação do extrato, foram avaliados, com auxílio do detector de arranjo de diodos (DAD), em análise de 190 a 400 nm, com intuito de verificar a existência de algum pico coeluinte nos tempos de retenção dos marcadores.

4.8.2 Linearidade

Este parâmetro foi avaliado por meio da análise de 5 preparações dos marcadores nas seguintes concentrações: 50%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 150%, 200%, 300%, 400% e 500% da concentração teórica do teste. Estas serão obtidas, por meio de diluições, em triplicata, resultando em 33 soluções padrões para análise.

4.8.2.1 Solução estoque de (-)-Epigallocatequina

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 2,5000 mg da substância química de referência (-)-Epigallocatequina que, em seguida, foi transferido para um balão volumétrico de 25,0 mL completando o volume com q.s.p. de solução diluente.

<i>Concentração final da solução = 0,1 mg de (-)-Epigallocatequina/mL</i>

Preparo das soluções (50% - 500%):

- a) 50%: pipetou-se 0,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,010 mg/mL;

- b) 80%: pipetou-se 0,8 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,016 mg/mL;

- c) 90%: pipetou-se 0,9 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,018 mg/mL;

- d) 100%: pipetou-se 1,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,020 mg/mL;

- e) 110%: pipetou-se 1,1 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,022 mg/mL;

- f) 120%: pipetou-se 1,2 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,024 mg/mL;

- g) 150%: pipetou-se 1,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,030 mg/mL;

- h) 200%: pipetou-se 2,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,040 mg/mL;

- i) 300%: pipetou-se 3,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,060 mg/mL;

- j) 400%: pipetou-se 4,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,080 mg/mL;

- k) 500%: a solução mãe que originou as demais diluições (20% - 400%) deste parâmetro foi avaliada.

Concentração final da solução: 0,100 mg/mL.

Após o preparo, as amostras foram filtradas para os vials usando filtro millex HN (nylon) 0,45 μ m x 13mm. As corridas cromatográficas foram realizadas nas condições do método conforme Tabela 3 (p. 101).

4.8.2.2 Solução estoque de (+)-Catequina

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 1,0000 mg da substância química de referência (+)-Catequina que, em seguida, foi transferido para um balão volumétrico de 25,0 mL completando o volume com q.s.p. de solução diluente.

<i>Concentração final da solução = 0,04 mg de (+)-Catequina/mL</i>

Preparo das soluções (50% - 500%):

- l) 50%: pipetou-se 0,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,0040 mg/mL

- m) 80%: pipetou-se 0,8 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,0064 mg/mL;

- n) 90%: pipetou-se 0,9 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,0072 mg/mL;

- o) 100%: pipetou-se 1,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,0080 mg/mL;

- p) 110%: pipetou-se 1,1 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,0088 mg/mL;

- q) 120%: pipetou-se 1,2 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,0096 mg/mL;

- r) 150%: pipetou-se 1,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,012 mg/mL;

- s) 200%: pipetou-se 2,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,016 mg/mL;

- t) 300%: pipetou-se 3,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,024 mg/mL;

- u) 400%: pipetou-se 4,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,032 mg/mL;

- v) 500%: a solução mãe que originou as demais diluições (20% - 400%) deste parâmetro foi avaliada.

Concentração final da solução: 0,040 mg/mL.

Após o preparo, as amostras foram filtradas para os vials usando filtro millex HN (nylon) 0,45 μ m x 13mm. As corridas cromatográficas foram realizadas nas condições do método conforme Tabela 3 (p. 101).

4.8.2.3 Solução estoque de (-)-Epicatequina

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 1,6500 mg da substância química de referência (-)-Epicatequina que, em seguida, foi transferido para um balão volumétrico de 50,0 mL completando o volume com q.s.p. de solução diluente.

<i>Concentração final da solução = 0,033 mg de (-)-Epicatequina/mL</i>

Preparo das soluções (50% - 500%):

- w) 50%: pipetou-se 0,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,0033 mg/mL;

- x) 80%: pipetou-se 0,8 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,00528 mg/mL;

- y) 90%: pipetou-se 0,9 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,00594 mg/mL;

z) 100%: pipetou-se 1,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,0066 mg/mL;

aa) 110%: pipetou-se 1,1 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,00726 mg/mL;

bb) 120%: pipetou-se 1,2 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,00792 mg/mL;

cc) 150%: pipetou-se 1,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,0099 mg/mL;

dd) 200%: pipetou-se 2,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,0132 mg/mL;

ee) 300%: pipetou-se 3,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,0198 mg/mL;

ff) 400%: pipetou-se 4,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

Concentração final da solução: 0,0264 mg/mL;

gg) 500%: a solução mãe que originou as demais diluições (20% - 400%) deste parâmetro foi avaliada.

Concentração final da solução: 0,033 mg/mL.

Após o preparo, as amostras foram filtradas para os vials usando filtro millex HN (nylon) 0,45 μ m x 13mm. As corridas cromatográficas foram realizadas nas condições do método conforme Tabela 3 (p. 101).

4.8.3 Precisão

4.8.3.1 Preparo das amostras

a) Preparo da solução padrão de (-)-Epigallocatequina

Pesou-se em balança analítica exatamente de 1,0 mg da substância química de referência (-)-Epigallocatequina e transferiu-se para um balão volumétrico de 10,0 mL completando o volume com q.s.p. de solução diluente. Foi retirada uma alíquota de 1,0mL e diluída para balão volumétrico de 5,0 mL, completando o volume com q.s.p. de solução diluente. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (Merck, Alemanha) de 0,45 micra x 13 mm diâmetro.

Concentração final da solução padrão = 0,02 mg de (-)-Epigallocatequina/mL

b) Preparo da solução padrão de (+)-Catequina

Pesou-se em balança analítica exatamente de 1,0 mg da substância química de referência (+)-Catequina e transferiu-se para um balão volumétrico de 25,0 mL completando o volume com q.s.p. de solução diluente. Foi retirada uma alíquota de 1,0mL e diluída para balão volumétrico de 5,0 mL, completando o volume com q.s.p. de solução diluente. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (Merck, Alemanha) de 0,45 micra x 13 mm diâmetro.

Concentração final da solução padrão = 0,008 mg de (+)-Catequina/mL

c) Preparo da solução padrão de (-)-Epicatequina

Pesou-se em balança analítica exatamente de 1,65 mg da substância química de referência (-)-Epicatequina e transferiu-se para um balão volumétrico de 50,0 mL

completando o volume com q.s.p. de solução diluente. Foi retirada uma alíquota de 1,0mL e diluída para balão volumétrico de 5,0 mL, completando o volume com q.s.p. de solução diluente. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (Merck, Alemanha) de 0,45 micra x 13 mm diâmetro.

Concentração final da solução padrão = 0,0066 mg de (-)-Epicatequina/mL

d) Preparo da solução amostra do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart.

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 100 mg do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. e transferiu-se para um balão volumétrico de 10,0 mL adicionando 5,0 mL de solução diluente. Em seguida o material foi levado ao banho ultrassônico por 20 minutos e após retorno à temperatura ambiente, completou-se o volume com q.s.p. de solução diluente. Foi retirada uma alíquota de 1,0mL e diluída para balão volumétrico de 5,0 mL, completando o volume com q.s.p. de solução diluente. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (Merck, Alemanha) de 0,45 micra x 13 mm diâmetro.

4.8.4 Repetibilidade

A repetibilidade do método foi avaliada através de 6 determinações a 100% da concentração do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. com o mesmo analista e mesma instrumentação. Para avaliação da precisão foram preparadas 3 soluções-mãe conforme item 4.8.3.1.d, e a leitura foi realizada em triplicata. Os resultados foram avaliados considerando a área do pico referente aos marcadores (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina, (-)-Epicatequina e o coeficiente de variação percentual, relativo a seis repetições, tendo como critério de aceitação coeficiente de variação menor que 5 %.

4.8.5 Precisão Intermediária

A determinação da precisão intermediária foi realizada por um segundo analista, no dia seguinte da repetibilidade, avaliando seis determinações a 100% da

concentração do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart., utilizando a mesma instrumentação e método analítico da repetibilidade.

4.8.6 Exatidão

Para avaliar esse parâmetro foram preparadas 3 amostras, em triplicata, nas concentrações 80%, 100% e 120% da concentração teórica do teste (total de 9 amostras). Para análise deste parâmetro, utilizou-se método por adição de padrão, no qual adicionam-se quantidades conhecidas de analito (marcador) à solução da amostra de extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart.

A exatidão foi avaliada através da percentagem de recuperação das soluções de marcadores (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina, (-)-Epicatequina adicionadas às amostras de solução do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. O ensaio foi realizado, em triplicata, com base na faixa de linearidade do método, através da adição de quantidades crescentes de soluções contendo (-)-Epigallocatequina 0,1 mg/mL, (+)-Catequina 0,04 mg/mL e (-)-Epicatequina 0,033 mg/mL à solução amostra do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. contendo concentração teórica dos analitos semelhantes aos marcadores, conforme abaixo.

4.8.6.1 Solução estoque de (-)-Epigallocatequina

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 1,0 mg da substância química de referência do marcador (-)-Epigallocatequina e, em seguida, foi transferido para um balão volumétrico de 10,0 mL completando o volume com q.s.p. de solução diluente.

<i>Concentração final da solução = 0,1 mg de (-)-Epigallocatequina/mL</i>

4.8.6.2 Solução estoque de (+)-Catequina

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 1,0 mg da substância química de referência do marcador (+)-Catequina e, em seguida, foi transferido para um balão volumétrico de 25,0 mL completando o volume com q.s.p. de solução diluente.

Concentração final da solução = 0,04 mg de (+)-Catequina/mL

4.8.6.3 Solução estoque de (-)-Epicatequina

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 1,65 mg da substância química de referência do marcador (-)-Epicatequina e, em seguida, foi transferido para um balão volumétrico de 50,0 mL completando o volume com q.s.p. de solução diluente.

Concentração final da solução = 0,033 mg de (-)-Epicatequina/mL

4.8.6.4 Solução estoque do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart.

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 100 mg do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. e transferiu-se para um balão volumétrico de 10,0 mL adicionando 5,0 mL de solução diluente. Em seguida o material foi levado ao banho ultrassônico por 20 minutos e após retorno à temperatura ambiente, completou-se o volume com q.s.p. de solução diluente.

a) Exatidão 80%

Para avaliação da exatidão neste ponto, foi tomada uma alíquota de 0,5 mL da solução do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. (amostra-50%), e 0,3 mL das soluções estoque de (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina, (-)-Epicatequina (padrão-30%). Transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL e completou-se o volume com q.s.p. de solução diluente. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (nylon), 0,45 μ m x 13mm diâmetro, ou equivalente.

b) Exatidão 100%

Para avaliação da exatidão neste ponto, foi tomada uma alíquota de 0,5 mL da solução do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. (amostra-50%), e 0,5 mL das soluções estoque de (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina, (-)-Epicatequina (padrão-50%). Transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL e completou-se o

volume com q.s.p. de solução diluente. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (nylon), 0,45µm x 13mm diâmetro, ou equivalente.

c) Exatidão 120%

Para avaliação da exatidão neste ponto, foi tomada uma alíquota de 0,5 mL da solução do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. (amostra-50%), e 0,7 mL das soluções estoque de (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina, (-)-Epicatequina (padrão-70%). Transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL e completou-se o volume com q.s.p. de solução diluente. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (nylon), 0,45µm x 13mm diâmetro, ou equivalente.

O critério de conformidade foi de 90 a 110 % de recuperação.

4.8.7 Intervalo

Este parâmetro foi avaliado por meio dos resultados das análises da linearidade, precisão e exatidão do método do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. nas seguintes concentrações: 20%, 50%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 150%, 200%, 300%, 400% e 500% da concentração teórica do teste. Durante este ensaio, o método foi avaliado nas concentrações do intervalo de trabalho.

4.8.7.1 Solução amostra de *Maytenus obtusifolia* Mart. (Solução mãe)

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 100 mg do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. e transferiu-se para um balão volumétrico de 10,0 mL adicionando 5,0 mL de solução diluente. Em seguida o material foi levado ao banho ultrassônico por 20 minutos e após retorno à temperatura ambiente, completou-se o volume com q.s.p. de solução diluente.

Concentração final teórica da solução:

0,1 mg de (-)-Epigallocatequina/mL

0,04 mg de (+)-Catequina/mL

0,033 mg de (-)-Epicatequina/mL

Preparo das soluções estoque (50-500%):

- a) 50%: pipetou-se 0,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.
- b) 80%: pipetou-se 0,8 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.
- c) 90%: pipetou-se 0,9 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.
- d) 100%: pipetou-se 1,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.
- e) 110%: pipetou-se 1,1 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.
- f) 120%: pipetou-se 1,2 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.

- g) 150%: pipetou-se 1,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.
- h) 200%: pipetou-se 2,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.
- i) 300%: pipetou-se 3,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.
- j) 400%: pipetou-se 4,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com solução diluente.
- k) 500%: a solução mãe que originou as demais diluições (20% - 400%) deste parâmetro foi avaliada.

<i>Concentração final da solução 50%</i>	0,010 mg/mL de (-)-Epigallocatequina 0,004 mg/mL de (+)-Catequina 0,0033 mg/mL de (-)-Epicatequina
<i>Concentração final da solução 80%</i>	0,016 mg/mL de (-)-Epigallocatequina 0,0064 mg/mL de (+)-Catequina 0,00528 mg/mL de (-)-Epicatequina
<i>Concentração final da solução 90%</i>	0,018 mg/mL de (-)-Epigallocatequina 0,0072 mg/mL de (+)-Catequina 0,00594 mg/mL de (-)-Epicatequina
<i>Concentração final da solução 100%</i>	0,02 mg/mL de (-)-Epigallocatequina 0,008 mg/mL de (+)-Catequina 0,0066 mg/mL de (-)-Epicatequina
<i>Concentração final da solução 110%</i>	0,022 mg/mL de (-)-Epigallocatequina 0,0088 mg/mL de (+)-Catequina 0,00726 mg/mL de (-)-Epicatequina

<i>Concentração final da solução 120%</i>	0,024 mg/mL de (-)-Epigallocatequina 0,0096 mg/mL de (+)-Catequina 0,00792 mg/mL de (-)-Epicatequina
<i>Concentração final da solução 150%</i>	0,030 mg/mL de (-)-Epigallocatequina 0,012 mg/mL de (+)-Catequina 0,0099 mg/mL de (-)-Epicatequina
<i>Concentração final da solução 200%</i>	0,040 mg/mL de (-)-Epigallocatequina 0,016 mg/mL de (+)-Catequina 0,0132 mg/mL de (-)-Epicatequina
<i>Concentração final da solução 300%</i>	0,060 mg/mL de (-)-Epigallocatequina 0,024 mg/mL de (+)-Catequina 0,0198 mg/mL de (-)-Epicatequina
<i>Concentração final da solução 400%</i>	0,080 mg/mL de (-)-Epigallocatequina 0,032 mg/mL de (+)-Catequina 0,0264 mg/mL de (-)-Epicatequina
<i>Concentração final da solução 500%</i>	0,100 mg/mL de (-)-Epigallocatequina 0,040 mg/mL de (+)-Catequina 0,033 mg/mL de (-)-Epicatequina

Após o preparo das amostras para análise, filtrou-se para os vials, usando filtro millex HN (nylon), 0,45 μ m x 13mm ou equivalente. As corridas cromatográficas foram realizadas nas condições do método conforme Tabela 3 (p. 101).

4.8.8 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Existem várias maneiras de calcular os limites de detecção e quantificação. Porém, na maioria das metodologias os brancos são utilizados como amostras. Na técnica de CLAE não existem picos nas amostras em branco, sendo assim não é possível o cálculo de áreas, médias e desvios padrões necessários para a determinação do limite de quantificação utilizando o branco como amostras. Portanto, para esta técnica, optou-se por analisar os padrões dos marcadores em concentrações decrescentes. Por extrapolação matemática da curva de calibração, segundo equação descrita na RE nº 899/2003, foi possível determinar os limites de

forma teórica (RIBANI et al., 2004; EMER & MILLER, 2005; ICH, 2005; MENDONÇA, 2008).

Para o cálculo do limite de detecção foi utilizada a equação:

$$\textit{Limite de detecção: } \frac{3 \times s}{a}$$

Onde, “s” é a estimativa do desvio padrão da equação da linha de regressão, dada pelo erro padrão obtido na estatística de regressão. E “a” é a inclinação da reta obtida para o marcador.

Para o cálculo do limite de quantificação foi utilizada a equação:

$$\textit{Limite de quantificação: } \frac{10 \times s}{a}$$

Onde, “s” é a estimativa do desvio padrão da equação da linha de regressão, dada pelo erro padrão obtido na estatística de regressão. E “a” é a inclinação da reta obtida para o marcador.

4.8.9 Robustez

Esse parâmetro foi realizado com três preparações problema na concentração de 100% da concentração teórica do teste.

As variantes avaliadas neste teste constam na Tabela 5 (p. 118).

Tabela 5 – Descrição dos parâmetros avaliados na robustez do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart.

Parâmetros	Condições do método	Variações	
<i>Estabilidade de soluções</i>	Imediato	24 hrs	48hrs
<i>pH</i>	3	2,8	3,2
<i>Fluxo da fase móvel</i>	1,0 mL/min	0,8 mL/min	1,2 mL/min
<i>Temperatura do forno</i>	40°C	38 °C	42 °C
<i>Composição da fase móvel</i>	Gradiente Água acidificada 14mM H ₃ PO ₄ :Acetonitrila	Gradiente Água acidificada 14mM Ácido Trifluoroacético: Acetonitrila	
<i>Coluna cromatográfica</i>	LiChrocart LiChrospher 100, RP18, 150x4mm, 5µ	LiChrocart LiChospher 125x4mm, 5µ	

4.9 Estudo de fotoestabilidade do EEB de *Maytenus obtusifolia* Mart.

As amostras foram divididas em 5 grupos, o primeiro foi utilizado como controle, ou seja, não exposto a qualquer condição de estresse. O segundo grupo foi protegido com papel alumínio e exposto à câmara de fotoestabilidade. E o último grupo também submetido à exposição da câmara UV, mas sem qualquer proteção.

As amostras foram expostas à câmara de fotoestabilidade (Figura 11, p. 119), Mecalor®, modelo EC/0,2/AR-F, que apresenta volume interno de 200 L. A determinação da intensidade da luz é controlada digitalmente por sensores da câmara e apresentados em painel digital localizado na parte exterior da câmara. Este estudo foi realizado no laboratório de Controle de Qualidade da HEBRON - Indústria Química Farmacêutica Nacional. A exposição ocorreu por um período de tempo suficiente à exposição preconizada pela ANVISA (1,2 milhões de lux.hora (BRASIL, 2012).

Após a exposição das amostras, todas foram submetidas às análises cromatográficas para quantificação dos marcadores (-)-Epigallocatequina 0,02 mg/mL, (+)-Catequina 0,008 mg/mL e (-)-Epicatequina 0,0066 mg/mL, conforme condições cromatográficas definidas no Tabela 3 (p. 101).



Figura 11. Câmara de fotoestabilidade Mecalor® modelo EC/0,2/AR-F.

4.10 Avaliação das atividades biológicas

4.10.1 Avaliação da atividade antioxidante com radical DPPH

A atividade antirradicalar da amostra foi medida *in vitro* pelo ensaio de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil). Resumidamente, 0,1 mL de uma solução de DPPH (0,03 mM) foi adicionado a 0,1 ml de solução de extrato em diferentes concentrações (0 - 200 µg / mL). Após 30 minutos de incubação no escuro, à temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 518 nm. O ácido ascórbico foi tomado como referência. A porcentagem de inibição do radical livre de DPPH foi calculada com base no controle de leitura utilizando a seguinte equação:

$$DPPH \text{ reduzido (\%)} = \frac{(A_{cont} - A_{amostra})}{A_{cont}} \times 100$$

Onde:

A_{cont} : corresponde à absorbância da reação controle;

$A_{amostra}$: corresponde à absorbância na presença do extrato.

A atividade antioxidante do extrato foi expressa como CI_{50} , em que a concentração em (µg/mL) do extrato inibiu a formação de radicais DPPH em 50%.

4.10.1.1 Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. O valor intermediário da concentração inibitória máxima (IC_{50}) foi calculado utilizando o modelo de regressão probit através do programa (SPSS, versão 13.0) e assumindo um nível de confiança de 95% ($P < 0.05$).

4.10.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart.

4.10.2.1 Local de trabalho

Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba. Período: Novembro/Dezembro de 2014.

4.10.2.2 Produto testado

O produto utilizado no ensaio biológico foi o extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. O produto foi testado nas concentrações de 1024 até 32 µg/mL, sendo solubilizado em dimetilsufóxido-DMSO (MERCK), em uma proporção até 10 %, para não interferir na biologia do microrganismo. E o volume final foi completado para 3 mL com água destilada e esterilizada.

4.10.2.3 Antimicrobianos sintéticos

Para o controle da atividade antimicrobiana foi utilizado o cloranfenicol (100 µg/mL) para bactérias; nistatina (100 UI /mL) para leveduras e fluconazol (50 µg/mL) para fungos filamentosos. Os produtos foram adquiridos comercialmente da **SIGMA-ALDRICH®**.

4.10.2.4 Microrganismos

Nos ensaios para avaliação da atividade biológica do produto, foram incluídas as espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538), *Staphylococcus aureus* (M-117), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-25853) e *Pseudomonas aeruginosa* (LM-116). Espécies de fungos leveduriformes *Candida albicans* (ATCC-76645), *Candida albicans* (LM-108), *Candida krusei* (LM- 13), *Candida krusei* (LM-08), *Candida tropicalis* (ATCC-13803) e *Candida tropicalis* (LM-36). E espécies de fungos filamentosos *Aspergillus flavus* (LM-247) e *Aspergillus fumigatus* (LM-210).

As cepas foram adquiridas no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, Laboratório de Micologia e de Microbiologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba. As mesmas foram mantidas em meios de cultura

apropriados, Agar Nutriente-AN para bactérias e Agar Sabouraud Dextrose-ASD para fungos (DIFCO Laboratories/França/EUA) e conservadas a 4 °C e a 35 °C.

A suspensão dos micro-organismos foi preparada conforme o tubo 0.5 da Escala McFarland, ajustada através de leitura espectrofotométrica (Leitz-Photometer 340-800), para 90% T (530 nm), correspondendo, aproximadamente, a 10^6 UFC/mL (CLEELAND & SQUIRES, 1991; HADACECK & GREEGER, 2000; NCCLS, 2000).

4.10.2.5 Meios de cultura

Os ensaios de atividade antibacteriana e antifúngica foram realizados em meio líquido Caldo Nutriente-CN para bactérias (DIFCO Laboratories/França/EUA) e RPMI 1640 para leveduras e fungos filamentosos (Acumedia/India). Os meios de cultura foram preparados e usados conforme as instruções de cada fabricante.

4.10.2.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM do extrato testado foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” e em duplicata. Em cada orifício da placa, foram adicionados 100 µL do CN (bactérias) e meio líquido RPMI (leveduras e fungos filamentosos) duplamente concentrado. Posteriormente, 100 µL do produto solubilizado, também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 32 µg/mL, de modo que, na primeira linha da placa encontrava-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo dos microrganismos nas cavidades, onde cada coluna da placa referiu-se, especificamente, a uma cepa.

Foi feito controle de crescimento do microrganismo no meio de cultura, com cloranfenicol (100 µg/mL) para bactérias, nistatina (100 UI) para leveduras e fluconazol (100 µg/mL) para fungos filamentosos. As placas foram seladas e incubadas a 35°C / 24 – 72 h para os ensaios com bactérias e leveduras; e a temperatura ambiente (28-30 °C) / 7-10 dias para fungos filamentosos. No ensaio biológico com as bactérias, após 24 h de incubação, foram adicionados 20 µL de solução do corante resazurina a 0,01 % (INLAB), reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução (MANN & MARKAN, 1998).

A mudança de coloração do corante do azul para vermelho, foi considerada como indicadora de crescimento microbiano; e a permanência do azul, a ausência de crescimento microbiano. E foi considerada como CIM, a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento das cepas bacterianas usadas nos ensaios, verificados por uma não mudança da coloração do corante indicador. A CIM do produto sobre as cepas fúngicas, foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano verificado nas cavidades, quando comparado com o crescimento controle.

Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos valores de CIM obtidas nos dois ensaios (CLEELAND & SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; SOUZA et al., 2007).

A atividade antimicrobiana dos produtos foi interpretada e considerada ativa ou não, conforme os seguintes critérios: 50-500 $\mu\text{g/mL}$ = forte / ótima atividade; 600-1500 $\mu\text{g/mL}$ = moderada atividade; >acima de 1500 $\mu\text{g/mL}$ = fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2001; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Controle de qualidade do material vegetal

5.1.1 Determinação de água em drogas vegetais

Os resultados obtidos através das metodologias farmacopeicas “Determinação da perda por dessecação” (gravimétrico) e “Determinação de água em drogas vegetais” (volumétrico) e o método adicional de “Determinação de água em balança de infravermelho” são apresentados na Tabela 6 (p. 125).

Tabela 6: Teores de água obtidos através das metodologias “Determinação de água em drogas vegetais”, “Determinação da perda por dessecação” e “Determinação de água em balança de infravermelho” (n = 5), na droga vegetal *Maytenus obtusifolia* Mart.

Método	Resultados (n=5)	Média	Desvio Padrão (DP)	Coefficiente de Variação (CV%)
Gravimétrico	6,89% 6,99% 7,04% 6,95% 6,80%	6,93%	0,092	1,33
Volumétrico	6,50% 6,22% 6,38% 6,59% 6,34%	6,41%	0,143	2,23
Infravermelho	8,99% 9,04% 9,07% 8,96% 9,10%	9,03%	0,057	0,63

O excesso de água em matérias-primas vegetais favorece a ação de enzimas, além de propiciar o desenvolvimento de fungos e bactérias (FARIAS, 2004), sendo assim é de fundamental importância a realização destes experimentos para a determinação das especificações de uma nova droga vegetal.

Na comparação dos resultados obtidos nos métodos gravimétrico, volumétrico e infravermelho, foram observadas diferenças significativas nos teores de água que podem estar relacionados com a presença de óleo volátil e/ou de outros constituintes termosensíveis, dependentes do tempo de exposição ao calor. Este comportamento também foi observado por Isengard & Färber (1999) e Farias (2004) em seus experimentos, onde os métodos de secagem em estufa determinaram não somente a perda de água, como também dos demais constituintes voláteis, que são arrastados juntamente com a água.

O princípio do aquecimento por radiação infravermelha é a transformação da energia radioativa em energia cinética, com liberação de energia térmica. Em contraste com a transferência de calor por convecção, na secagem em estufa, a energia térmica fornece quantidade de calor suficiente para que a liberação das moléculas de água ocorra mais rapidamente. Cabe ressaltar que, tal como na secagem em estufa, a medida da perda de massa inclui não somente a água (ISENGARD & PRÄGER, 2003).

Em estudo químico realizado com *Maytenus obtusifolia* Mart., Medeiros (2007) avaliou a composição do óleo volátil desta espécie, onde foi possível observar por análise em Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) que o óleo volátil obtido por hidrodestilação das folhas de *Maytenus obtusifolia* apresentou 31 componentes, correspondendo a 99,99% do óleo essencial. Sendo os compostos majoritários: octadeca-9,12,15-trien-1-ol (31.08%), ácido palmítico (29.95%), p-tiocresol (7.51%), ácido linoléico metil éster (5.68%) e ácido láurico (4.58%).

Desta forma, os resultados encontrados para as técnicas de infravermelho ($9,03\% \pm 0,057$) e perda por dessecação ($6,93 \pm 0,092$) apresentaram valores condizentes às perdas de água e compostos voláteis presentes no material vegetal. Em contrapartida, a análise de determinação de água em drogas vegetais realizada com método volumétrico (Karl Fischer) apresentou valor médio de ($6,41\% \pm 0,185$), onde foi possível observar a preservação dos compostos voláteis e termosensíveis pela ausência de utilização de fonte de calor. Sendo este o método escolhido como

referência para a determinação de água em material vegetal de *Maytenus obtusifolia* Mart.

5.1.2 Determinação de cinzas

Os resultados obtidos através dos métodos farmacopéicos de “Determinação de cinzas totais” e “Determinação de cinzas sulfatadas”, para a droga vegetal de *Maytenus obtusifolia* Mart. estão apresentados na Tabela 7 (p. 127).

Tabela 7: Teores de cinzas totais obtidos através das metodologias para “Determinação de cinzas totais” e “Determinação de cinzas sulfatadas” (n = 5), na droga vegetal *Maytenus obtusifolia* Mart.

Método	Resultados (n=5)	Média	Desvio Padrão (DP)	Coefficiente de Variação (CV%)
Cinzas totais	5,12% 5,25% 5,30% 5,01% 5,34%	5,20%	0,136	2,62
Cinzas sulfatadas	6,27% 6,30% 6,48% 6,51% 6,25%	6,36%	0,123	1,93

Na análise dos resultados obtidos para a determinação de cinzas totais (5,20% ± 0,136) e cinzas sulfatadas (6,36% ± 0,123) foi possível observar que os valores referentes aos ensaios de cinzas totais apresentaram menor teor frente aos resultados das cinzas sulfatadas.

O método de cinzas totais refere-se à quantidade total de material orgânico residual após a incineração, incluindo as cinzas naturais derivadas do próprio tecido vegetal e as cinzas não fisiológicas que são oriundas de materiais estranhos, como,

por exemplo, areia ou terra que possam aderir à superfície do material vegetal. Estas cinzas são constituídas por carbonatos, fosfatos, silicatos e sílica.

Na determinação de cinzas sulfatadas, a droga vegetal é tratada com ácido sulfúrico que promove a conversão de óxidos, cloretos e carbonatos em sulfatos que apresentam estabilidade térmica mais elevada (HARTKE, 1989; EVANS, 1996).

Portanto, a diferença observada entre o teor de cinzas totais e de cinzas sulfatadas, está relacionada com a transformação dos oxalatos, haletos e carbonatos em sulfatos.

5.1.3 Ensaio limite de metais pesados

O ensaio limite de metais pesados consiste na formação de partículas sólidas dos sulfetos de metais pesados, em suspensão, e posterior comparação visual da intensidade da cor nas preparações amostra e padrão. O ensaio é semiquantitativo, representando o somatório da concentração dos elementos contaminantes na amostra. Os resultados obtidos neste experimento a partir do material vegetal de *Maytenus obtusifolia* Mart. mostraram que o material analisado apresentou níveis aceitáveis de metais pesados, abaixo de 10 ppm ao ser comparado ao material de referência.

Estes metais podem ser provenientes do solo, da água de irrigação ou da atmosfera e aumentam com a poluição ambiental. A proximidade de estradas pode favorecer a contaminação do solo pelo arraste de poluentes promovidos pelas chuvas (FREIRE, 2005). Excipientes agropecuários, tais como adubos contendo cádmio, fungicidas e inseticidas contendo organofosforados também são fontes de contaminação.

5.1.4 Densidade aparente de sólidos

Os resultados obtidos através do método farmacopéico de “Determinação de densidade aparente de sólidos” para a droga vegetal de *Maytenus obtusifolia* Mart. estão apresentados na Tabela 8 (p. 129).

Tabela 8: Densidades aparente obtidas através da metodologia para “Determinação de densidade aparente de sólidos” (n = 5), na droga vegetal *Maytenus obtusifolia* Mart.

Método	Resultados (n=5)	Média	Desvio Padrão (DP)	Coefficiente de Variação (CV%)
Densidade aparente de sólidos	0,40 g/mL 0,41 g/mL 0,40 g/mL 0,42 g/mL 0,41 g/mL	0,41 g/mL	0,008	2,05

A densidade aparente consiste em um importante parâmetro para o controle do processo de extração de materiais vegetais, que podem ser usados como base para prever propriedades de preenchimento e compactação, bem como fornece informações importantes sobre o processo de secagem de extratos vegetais (FONSECA, 2009).

5.1.5 Determinação do índice de espuma

Os resultados obtidos através do método farmacopéico de “Determinação do índice de espuma” para a droga vegetal de *Maytenus obtusifolia* Mart. estão apresentados na Tabela 9 (p. 129).

Tabela 9: Índices de espuma obtidos através da metodologia para “Determinação do índice de espuma” (n = 5), na droga vegetal *Maytenus obtusifolia* Mart.

Método	Resultados (n=5)	Média
Índice de espuma	666,66 666,66 666,66 666,66 666,66	666,66%

A avaliação do índice de espuma reflete uma estimativa da presença de saponinas em materiais vegetais. Alguns estudos tem relatado atividade imunoadjuvante desta classe de substâncias o que abre possibilidades para a realização de futuros ensaios biológicos com o material de *Maytenus obtusifolia* Mart. (SOLTYSIK et al., 1995; KENSIL et al., 1996; KAISER et al., 2010). Também foram relatadas atividade antifúngica das saponinas (CUNHA & ROQUE, 2005).

Em relação aos resultados obtidos, o índice de espuma da droga vegetal de *Maytenus obtusifolia* Mart apresentou IE = 666,66 o que demonstra um grande teor de saponinas presentes no material quando comparado a outras espécies (OLIVEIRA et al., 2011).

5.1.6 Doseamento de flavonoides totais

Os resultados obtidos através do método farmacopéico de “Doseamento de flavonoides totais calculados como Apigenina” e “Doseamento de flavonoides totais calculados como Hiperosídeo”, para a droga vegetal e extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. estão apresentados na Tabela 10 (p. 131).

Tabela 10: Teores de flavonoides totais obtidos através das metodologias para “Doseamento de flavonoides totais calculados como Apigenina” e “Doseamento de flavonoides totais calculados como Hiperosídeo” (n = 5), na droga vegetal e extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart.

Método	Resultados (n=5)	Média	Desvio Padrão (DP)	Coefficiente de Variação (CV%)
Flavonoides totais calculados como Apigenina na droga seca	1,05% 1,12% 1,07% 1,08% 1,10%	1,08%	0,027	2,49
Flavonoides totais calculados como Apigenina no extrato etanólico	4,71% 4,60% 4,88% 4,75% 4,69%	4,72%	0,102	2,16
Flavonoides totais calculados como Hiperosídeo na droga seca	2,02% 2,13% 2,18% 2,24% 2,11%	2,14%	0,082	3,84
Flavonoides totais calculados como Hiperosídeo no extrato etanólico	6,34% 6,26% 6,18% 6,23% 6,19%	6,24%	0,064	1,03

Os teores de flavonoides totais calculados como apigenina encontrados na droga seca ($1,08\% \pm 0,027$) e no extrato etanólico ($4,72\% \pm 0,102$) e os calculados como hiperosídeo na droga seca ($2,14\% \pm 0,082$) e no extrato etanólico ($6,24\% \pm 0,064$) de *Maytenus obtusifolia* Mart. demonstram a riqueza do conteúdo flavonoídico da espécie.

Comparando-se os resultados, é possível observar que existe diferença significativa para ambos os casos (droga seca e extrato etanólico). Ao analisar as metodologias, verifica-se a presença de grande quantidade de água (50%) na solução extrativa do método 1 (flavonoides totais calculados como apigenina).

Em estudo realizado por Stankovic (2011), no qual determinou-se a concentração de flavonoides em extratos de *Marrubium peregrinum* L., foi possível observar comportamento semelhante ao encontrado nos testes realizados com *Maytenus obtusifolia* Mart. De acordo com o autor, a extração realizada com 100% de água apresentou o menor teor de flavonoides, enquanto que o processo realizado com metanol, acetona e acetato de etila forneceram concentrações até 3 vezes superiores.

Spagolla e colaboradores (2009) também observaram este comportamento particular da água no doseamento de flavonoides totais do mirtilo (*Vaccinium ashei*). Ainda segundo os autores, proporções superiores a 50% de água promoveram variações significativas nos doseamentos dos flavonoides.

De acordo com Min & Chun-Zhao (2005), a concentração de flavonoides em extratos de plantas dependem diretamente da polaridade dos solventes utilizados no método. Desta forma, recomenda-se a utilização de proporções entre solventes orgânicos e a água (DÔRES, 2007).

5.1.7 Doseamento de taninos totais

Os resultados obtidos através do método farmacopéico de “Doseamento de taninos totais” para a droga vegetal e extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. estão apresentados na Tabela 11 (p. 133).

Tabela 11: Teores de taninos totais obtidos através da metodologia para “Doseamento de taninos totais” (n = 5), na droga vegetal e extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart.

Método	Resultados (n=5)	Média	Desvio Padrão (DP)	Coefficiente de Variação (CV%)
Doseamento de taninos totais na droga seca	6,61% 6,34% 6,47% 6,70% 6,44%	6,51%	0,142	2,19
Doseamento de taninos totais no extrato etanólico	17,84% 18,12% 17,77% 17,51% 18,01%	17,85%	0,234	1,31

Os teores de taninos encontrados na droga seca ($6,51\% \pm 0,142$) e no extrato etanólico ($17,85\% \pm 0,234$) de *Maytenus obtusifolia* Mart. demonstram a riqueza do conteúdo polifenólico encontrado na espécie.

Os taninos apresentam notórias atividades bactericidas e fungicidas por três mecanismos comuns gerais: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres e habilidade de complexar outras moléculas, principalmente proteínas e polissacarídeos presentes nestes microrganismos. Ainda segundo os autores, também é possível elencar a atividade de taninos em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações. Os taninos favorecem a formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, permitindo que, logo abaixo dessa camada, o processo de reparação tecidual ocorra naturalmente (MELLO & SANTOS, 2001).

Várias doenças degenerativas como câncer, esclerose múltipla, arteroesclerose e o processo natural de envelhecimento estão associados a altas concentrações intracelulares de radicais livres. Estudos recentes mostram que vários

taninos atuam como captadores de radicais, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis (MELLO & SANTOS, 2001).

O extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. foi avaliado por Mota e colaboradores (2009) e este estudo confirmou a atividade gastroprotetora da espécie cujo mecanismo de ação envolve, principalmente, a participação de grupamentos sulfidrilas e a cicatrização com a formação de uma camada de tanino-proteínas complexados envolvendo a mucosa estomacal (HASLAM, 1989).

5.1.8 Doseamento de compostos fenólicos totais

A curva de calibração, a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r) obtidos através da leitura das soluções do padrão ácido gálico são apresentados na Figura 12 (p. 134).

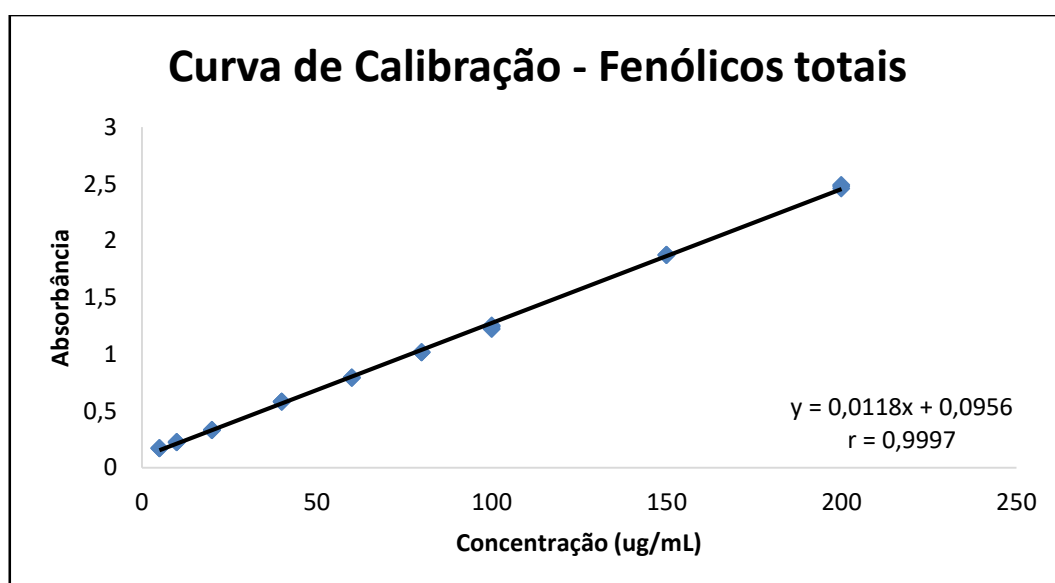


Figura 12: Curva de calibração (5 – 200 µg/mL) para doseamento de fenólicos totais expressos em equivalentes de Ácido gálico.

Os resultados obtidos através do método de “Doseamento de compostos fenólicos totais” para a droga vegetal e extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. estão apresentados na Tabela 12 (p. 135). Os valores expressos em (mg AG/

g de extrato) foram obtidos por cálculo matemático de acordo com a equação da reta ($y = 0,0118x + 0,0956$).

Tabela 12: Teores de compostos fenólicos totais obtidos através da metodologia para “Doseamento de compostos fenólicos totais” (n = 5), na droga vegetal e extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart.

Método	Resultados (mg AG/g)	Média (mg AG/g)	Desvio Padrão (DP)	Coefficiente de Variação (CV%)
Doseamento de compostos fenólicos totais na droga seca	42,28 42,41 41,73 41,47 41,90	41,95	0,377	0,90
Doseamento de compostos fenólicos totais no extrato etanólico	135,80 134,02 135,29 134,95 133,76	134,76	0,856	0,64

Os teores de flavonoides, taninos e, por fim, compostos fenólicos totais encontrados na droga seca (41,95 mg AG/g \pm 0,856) e no extrato etanólico (134,76 mg AG/g \pm 0,377) de *Maytenus obtusifolia* Mart. confirmam a abundância do conteúdo polifenólico encontrado na espécie em estudo. Estes resultados demonstram o potencial farmacológico da planta, visto que estas classes de substâncias tem sido relacionadas, principalmente, às atividades antimicrobiana e antioxidante (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; STRATIL et al., 2008; CETINKARACA, 2011; STANKOVIC, 2011; ONDO et al., 2013).

Estudos realizados por Radomski (2006), Yariwake e colaboradores (2005) e Haida e colaboradores (2012), com as espécies *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* do

gênero *Maytenus*, apresentaram grande quantidade de compostos fenólicos nas folhas e extratos obtidos destes exemplares, o que demonstra ser uma característica do gênero.

Ainda de acordo com Radomski (2006), o teor de polifenóis varia de acordo com a luminosidade, sendo maior nas plantas que crescem a pleno sol em relação às plantas de sombra. Esta tendência é coerente com o papel fotoprotetor dos fenóis, inclusive os flavonoides, na defesa das plantas (HARBORNE, 1994).

5.1.9 Determinação da contaminação microbiológica

Os resultados obtidos através das metodologias farmacopéicas de “Determinação do número total de microrganismos mesofílicos” e pesquisa de patógenos “Bactérias gram-negativas bile tolerantes”, “*Escherichia coli*”, “*Salmonella*”, para a droga vegetal de *Maytenus obtusifolia* Mart. estão apresentados nas Tabelas 13 (p. 136) e 14 (p. 137).

Tabela 13: Teores de contaminação microbiana obtidos através das metodologias para “Contagem total de bactérias”, “Contagem total de fungos e leveduras”, na droga vegetal *Maytenus obtusifolia* Mart.

Método	Resultados	Limites farmacopéicos (Farmacopéia Brasileira 5ª edição, volume 1)
Contagem total de bactérias	2720 UFC/g	100.000 UFC
Contagem total de fungos e leveduras	963 UFC/g	1000 UFC

Tabela 14: Pesquisa de patógenos “Bactérias gram-negativas bile tolerantes”, “*Escherichia coli*” e “*Salmonella*” segundo métodos farmacopéicos na droga vegetal *Maytenus obtusifolia* Mart.

Método	Resultados	Limites farmacopéicos (Farmacopéia Brasileira 5ª edição, volume 1)
Pesquisa de patógenos “Bactérias gram-negativas bile tolerantes”	Ausência/g	Ausência
Pesquisa de patógenos “<i>Escherichia coli</i>”	Ausência/g	10 UFC/g
Pesquisa de patógenos “<i>Salmonella</i>”	Ausência/g	Ausência

Conforme recomendado pelo compêndio oficial “Farmacopéia Brasileira 5ª edição, volume 1” para drogas vegetais que serão submetidas a processo extrativo a frio, as análises para determinação de microrganismos mesofílicos totais devem apresentar valores inferiores a 100.000 UFC/g para a contagem de bactérias totais e 1000 UFC/g para contagem de fungos e leveduras totais. Em adição, também são necessárias as avaliações por pesquisa de patógenos para bactérias gram-negativas bile tolerantes, *Escherichia coli* e *Salmonella*.

De acordo com os resultados obtidos, é possível observar que a droga vegetal de *Maytenus obtusifolia* Mart. cumpriu com todas as especificações recomendadas. De acordo com estudos realizados por Medeiros e colaboradores (2010), o óleo essencial desta espécie apresentou bons resultados antimicrobianos, reforçando suas propriedades de interferir no crescimento de diversos microrganismos.

Niero e colaboradores (2011) também observaram propriedades antimicrobianas em várias espécies do gênero *Maytenus* relacionadas à presença de metabólitos secundários como flavonoides, glicosídeos, terpenos e alcaloides.

5.1.10 Desenvolvimento de metodologia analítica

O método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conduzido neste estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema cromatográfico capaz de eluir e apresentar boa resolução na separação dos metabólitos secundários de interesse presentes no extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart.

Nas investigações preliminares para o desenvolvimento do método cromatográfico foram avaliadas a força de eluição dos solventes orgânicos acetonitrila (MeCN) e metanol (MeOH) e as suas influências na retenção dos metabólitos secundários presentes no extrato.

O metanol e a acetonitrila foram escolhidos por já apresentarem amplo uso e aceitação nos protocolos internacionais e estudo de produtos naturais. Em relação aos compostos fenólicos, estes solventes orgânicos são especialmente utilizados para a separação e detecção de catequinas (YAYABE et al., 1989; GOTO et al., 1996; SAIJO & TAKEDA et al., 1999; WANG et al., 2000).

O estudo com os diferentes solventes orgânicos possibilitou verificar diferenças nas larguras dos picos, onde picos mais largos foram observados com o uso do metanol enquanto a acetonitrila favoreceu a separação dos constituintes com picos mais finos. Apesar de apresentarem polaridade e força de eluição próximas, outros estudos já haviam relatado este comportamento frente aos compostos fenólicos. Este fenômeno pode ser atribuído ao maior momento dipolo da acetonitrila com a resultante de uma interação dispersiva analito-fase móvel mais forte (GUILLAUME & GUINCHARD, 1995; SHARMA et al., 2005).

Durante a revisão bibliográfica, observou-se a necessidade do uso de fase móvel contendo pequena quantidade de ácido, com objetivo de evitar a ionização dos constituintes e minimizar os efeitos de cauda nos picos (CABRERA et al., 2003; CASTRO et al., 2010; LI et al., 2012; DOLCI, 2012; NARUMI et al., 2014; GOTTUMUKKALA et al., 2014). Dessa forma, o ácido escolhido foi o ácido ortofosfórico na proporção de 14mM, pois apresentou menores perturbações na linha de base quando comparado aos ácidos fórmico e ácido acético.

O fluxo da fase móvel escolhido para a separação dos metabólitos secundários foi o de 1,0 mL/min, visto que o fluxo de 0,8 mL/min promoveu leve alargamento dos picos e aumento no tempo de corrida, devido a velocidade menor de separação dos constituintes. O fluxo de 1,2 mL/min apresentou picos mais finos,

porém houve coeluição de algumas substâncias de interesse, descartando a possibilidade de uso. Outro ponto que foi levado em consideração para a escolha do fluxo de 1 mL/min, foi o fato de que o aumento do fluxo gera maior pressão na coluna e equipamento, o que poderia reduzir sua vida útil com análises frequentes.

Comprimentos de onda entre 210nm e 230nm ou 280nm são usualmente escolhidos para a detecção de catequinas em produtos naturais (YAYABE et al., 1989; GOTO et al., 1996; DALLUGE et al., 1998; SAIJO & TAKEDA, 1999; WANG et al., 2000; GOTTUMUKKALA et al., 2014). O método foi desenvolvido, inicialmente, para detectar o máximo de substâncias possíveis incluindo os flavonoides que absorvem em comprimentos de onda próximos a 330nm e 350nm conforme pode ser observado na Figura 13 (p. 140).

Nos comprimentos de onda entre 210nm e 230nm, cada catequina apresentou absorção intensa, entretanto, existe um grande número de substâncias que absorvem fortemente nesta região o que promoveu perturbações na linha de base que poderiam afetar a precisão dos resultados. Os comprimentos de onda entre 330nm e 350nm apresentaram linhas de base com poucas variações e forte absorção de substâncias, possivelmente flavonoides, os quais, infelizmente não apresentavam padrões disponíveis para a quantificação. Desta forma, o comprimento de onda escolhido para o estudo foi o de 280nm por ser o mais apropriado para a detecção máxima de catequinas, conforme pode ser observado nos espectros uv (Figura 14, p. 140).

Em relação à solução diluente, observou-se que não existe boa separação dos constituintes quando esta solução é composta por mais de 60% de metanol. O decréscimo do conteúdo de metanol e o aumento da fração aquosa promoveram melhor separação dos marcadores. As concentrações de 0% a 15% de metanol promoveram as melhores separações, entretanto, o uso de 100% de água como solução diluente reduziu a detecção de catequinas em 20%. Este comportamento já havia sido observado por Wang e colaboradores (2000). Dessa forma, a solução diluente escolhida foi a proporção da solução água:metanol (85:15).

Por fim, optou-se pelo uso de gradiente visto que a separação dos marcadores não foi eficaz no modo isocrático. Durante as sucessivas injeções e variações de gradiente, observou-se que incrementos de 0,5%/min da fase móvel B (MeCN) possibilitaram a separação eficiente dos marcadores estudados.

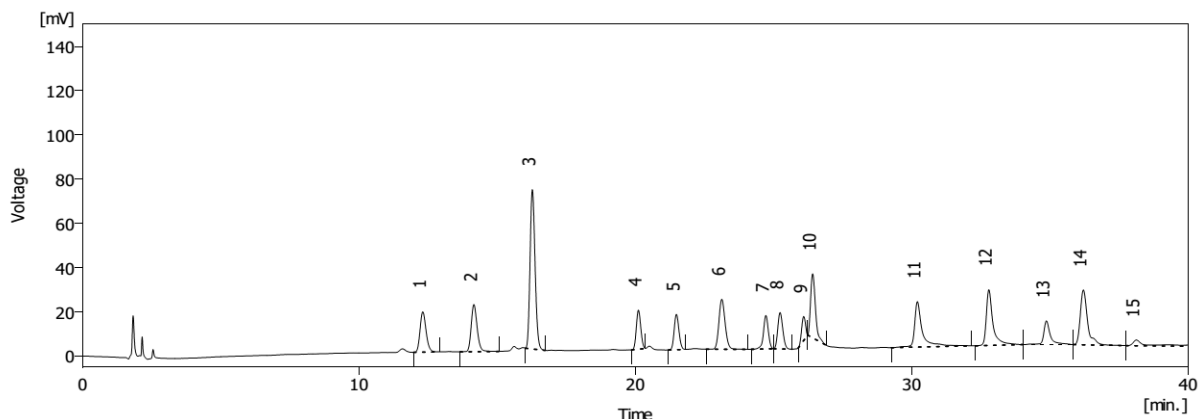


Figura 13. Cromatograma dos padrões detectáveis pela metodologia analítica desenvolvida em 280 nm. 1. Ácido clorogênico (12,3min); 2. Ácido *trans*-caféico (14,2 min); 3. (-)-Epicatequina (16,3 min); 4. Daidzina (20,1 min); 5. Glicitina (21,5 min); 6. Ácido ferrúlico (23,1 min); 7. Rutina (24,7 min); 8. Hyperosídeo (25,2 min); 9. Luteolina-7-glicosídeo (26,1 min); 10. Genistina (26,4 min); 14. Daidzeína (36,2 min); 15. Gliciteína (26,4 min).

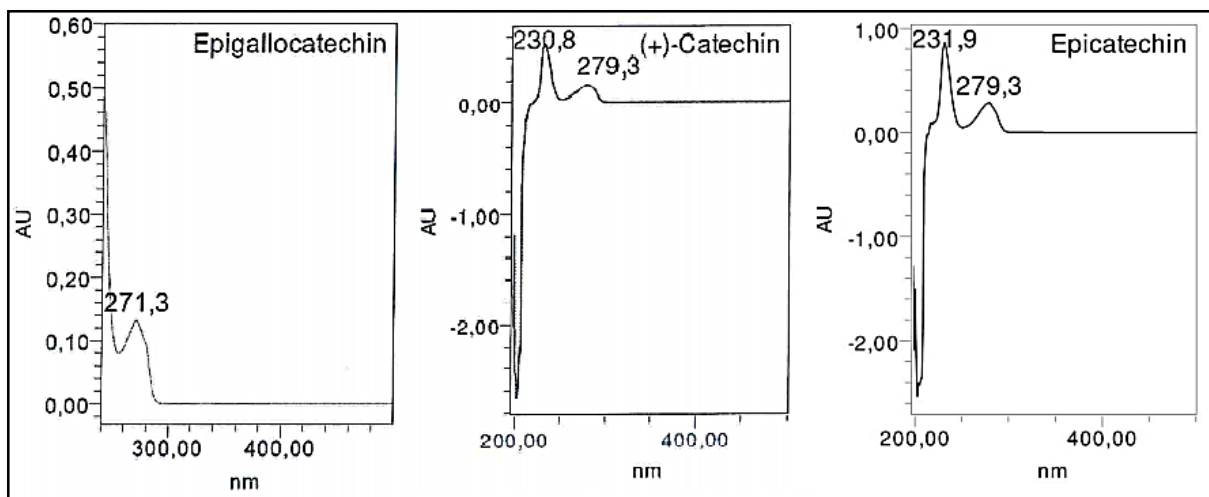


Figura 14. Espectros UV e bandas máximas de absorção dos marcadores (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina.

5.2 Validação de metodologia analítica

5.2.1 Especificidade

A especificidade teve como objetivo avaliar a capacidade do método em identificar e separar os marcadores (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina das demais substâncias presentes na matriz.

A análise dos cromatogramas obtidos dos padrões, amostra, fase móvel, solução diluente e etanol 96% demonstraram que não existem picos coeluinto com os picos dos padrões (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina conforme pode ser observado nas Figuras 15 (p. 142), 16 (p. 142), 17 (p. 142), 18 (p. 143), 19 (p. 143), 20 (p. 143), 21 (p. 144) . Em adição, foram avaliadas a pureza dos marcadores e do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart., obtidos por HPLC/DAD, observando-se 99,93% de pureza para (-)-Epigallocatequina, 96,0% para a (+)-Catequina e 99,76% para a (-)-Epicatequina (Figura 22, p. 145).

Os resultados obtidos na avaliação de pureza dos picos dos marcadores demonstraram que no comprimento de onda utilizado no método analítico, não existem outros compostos químicos nos tempos de retenção especificados.

Os parâmetros de conformidade do sistema para métodos analíticos por CLAE e os limites recomendados são assimetria de pico menor igual a 1,5, número de pratos teóricos acima de 2000, resolução mínima entre picos de 2,0 e fator de capacidade acima de 1,5 (SNYDER et al., 1997; FDA, 2000).

Desta forma, é possível concluir que o método proposto para doseamento dos marcadores (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina no extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart., é específico.

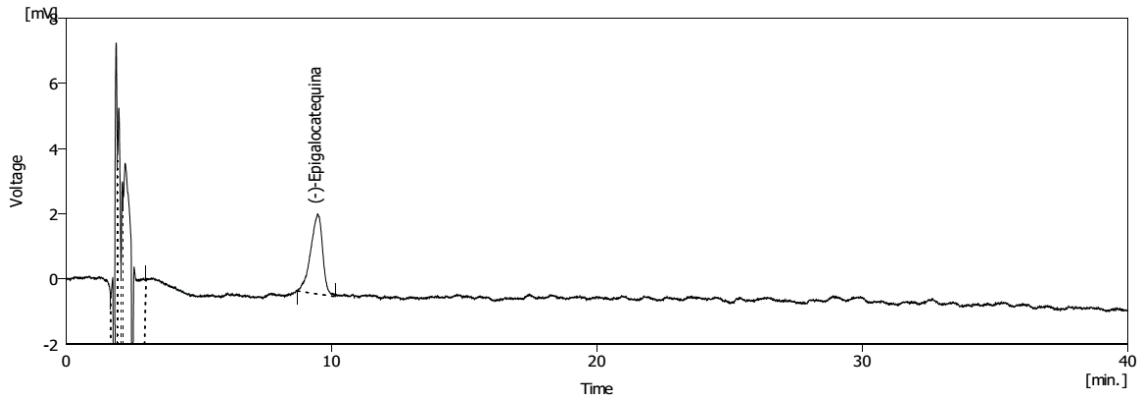


Figura 15. Cromatograma do padrão (-)-Epigalocatequina avaliado no parâmetro especificidade.

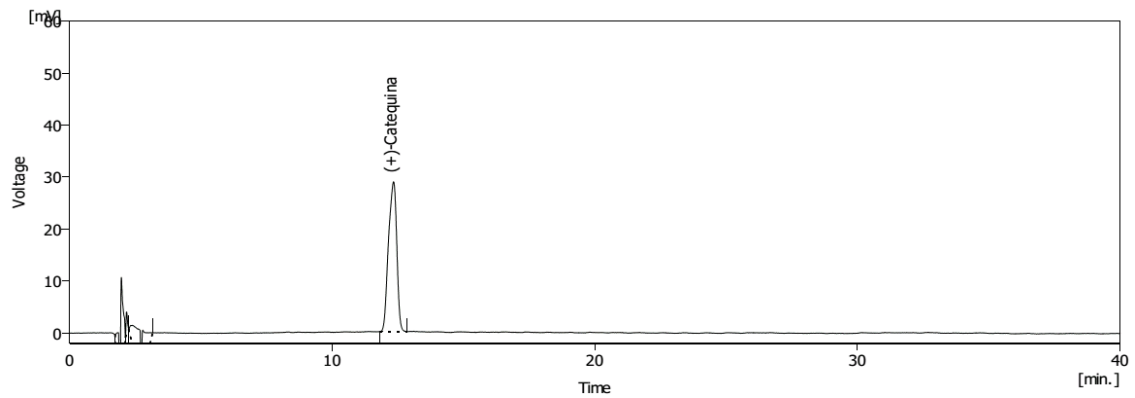


Figura 16. Cromatograma do padrão (+)-Catequina avaliado no parâmetro especificidade.

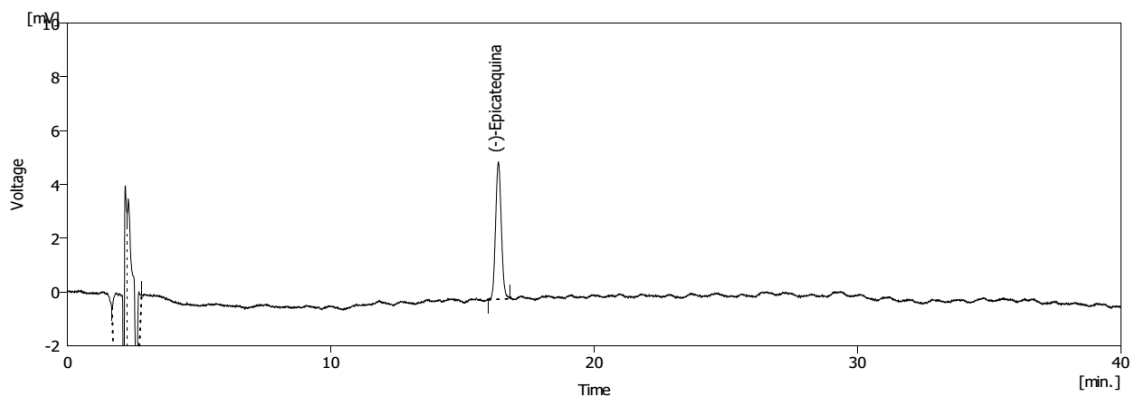


Figura 17. Cromatograma do padrão (-)-Epicatequina avaliado no parâmetro especificidade.

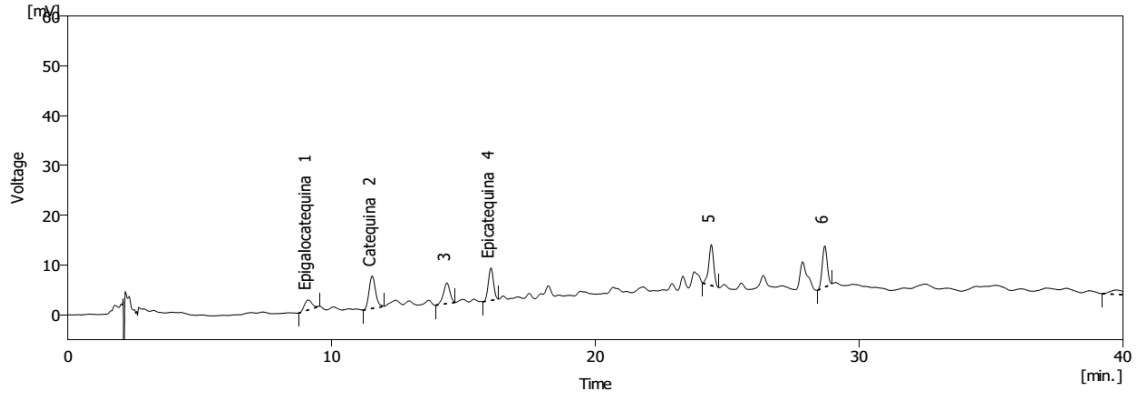


Figura 18. Cromatograma do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. avaliado no parâmetro especificidade.

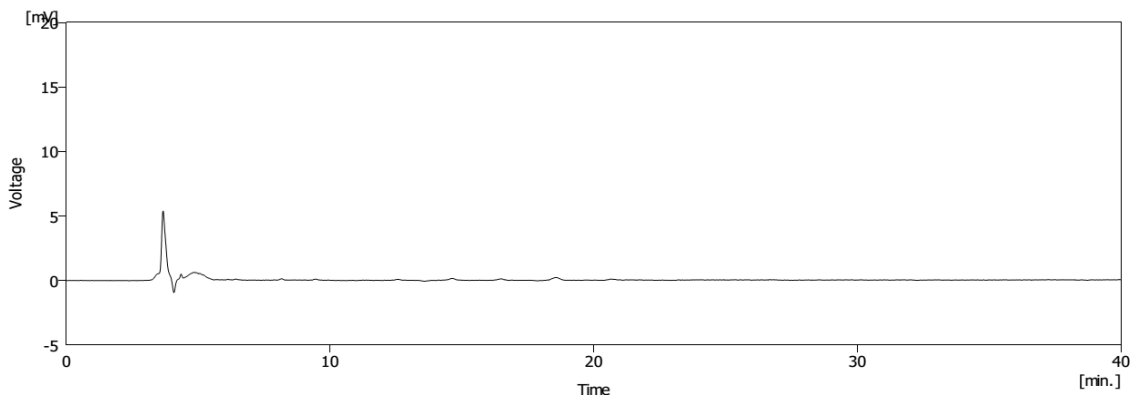


Figura 19. Cromatograma da fase móvel avaliada no parâmetro especificidade.

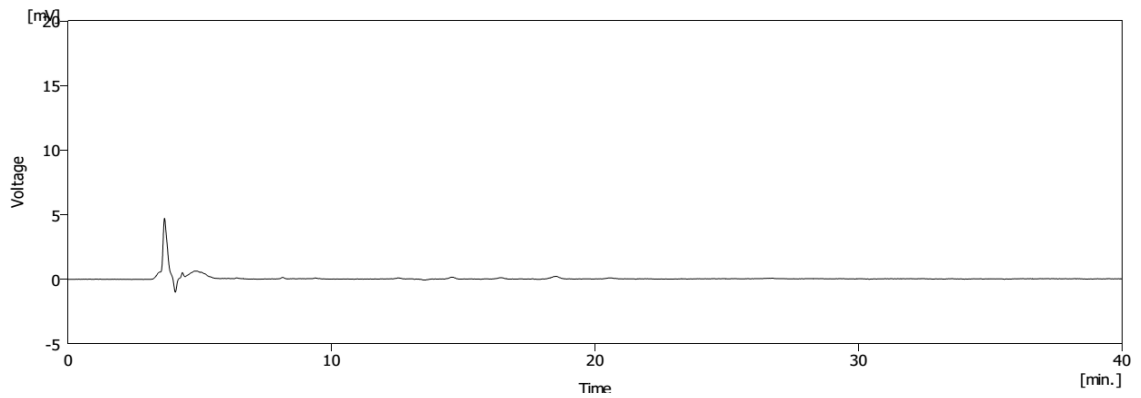


Figura 20. Cromatograma da solução diluente avaliada no parâmetro especificidade.

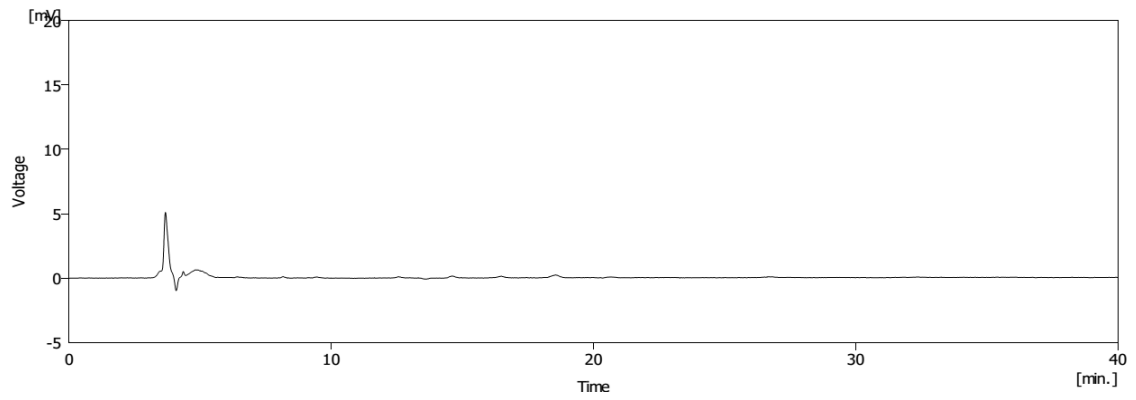


Figura 21. Cromatograma da solução extrativa (etanol 96%) avaliada no parâmetro especificidade.

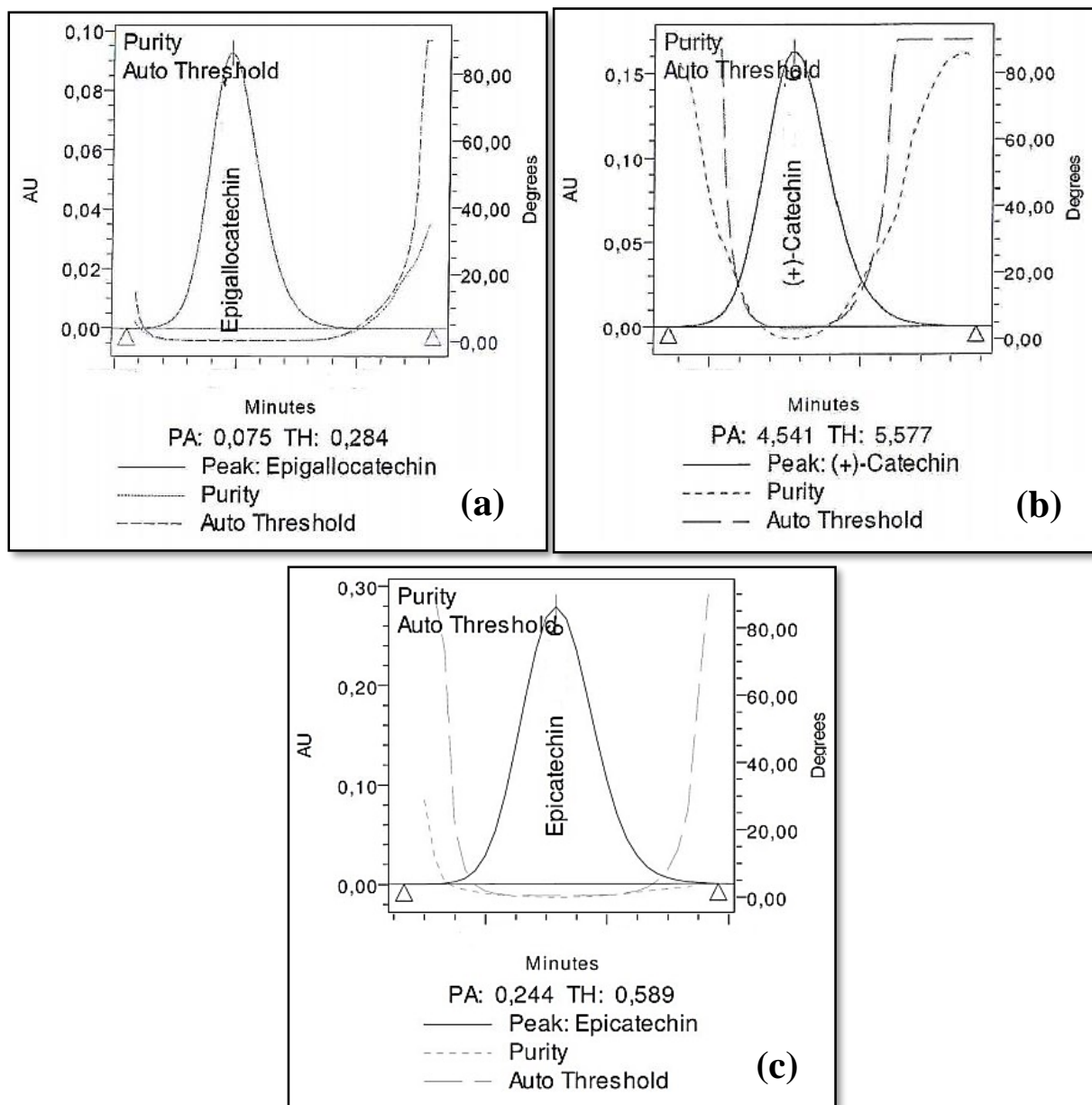


Figura 22. Pureza de pico dos marcadores (a) (-)-Epigallocatequina, (b) (+)-Catequina e (c) (-)-Epicatequina avaliadas no parâmetro especificidade.

5.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada pela construção de curvas de calibração dos padrões (-)-Epigallocatequina (0,010 mg/mL a 0,100 mg/mL), (+)-Catequina (0,0040 mg/mL a 0,0400 mg/mL) e (-)-Epicatequina (0,0033 mg/mL a 0,0330 mg/mL), que correspondem ao intervalo de 50 a 500% da concentração de trabalho.

O método dos mínimos quadrados é usado para estabelecer a curva de calibração. As amostras analisadas foram padrões contendo somente o composto examinado, nas concentrações de 50%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 150%, 200%, 300%, 400% e 500% de acordo com o estabelecido na parte experimental deste estudo. A curva de calibração foi preparada com os resultados de diferentes concentrações e a média de n repetições por nível de concentração. A análise de variância da regressão levou à determinação da existência de um coeficiente angular significativo e à validade da reta de regressão.

A Tabela 15 (p. 148) exhibe os resultados das injeções para obtenção da curva padrão do marcador (-)-Epigallocatequina, que apresentou coeficiente de correlação (r) = 0,9995 ($n=33$) e forneceu a equação da reta ($y = 4148,6x - 16,071$). A curva de calibração e o gráfico de resíduos são apresentados nas Figuras 23 (p. 149) e 24 (p. 149).

A Tabela 16 (p. 150) exhibe os resultados das injeções para obtenção da curva padrão do marcador (+)-Catequina, que apresentou coeficiente de correlação (r) = 0,9998 ($n=33$) e forneceu a equação da reta ($y = 15387x + 0,9041$). A curva de calibração e o gráfico de resíduos são apresentados nas Figuras 25 (p. 151) e 26 (p. 151).

A Tabela 17 (p. 152) exhibe os resultados das injeções para obtenção da curva padrão do marcador (-)-Epicatequina, que apresentou coeficiente de correlação (r) = 0,9998 ($n=33$) e forneceu a equação da reta ($y = 11612x + 0,9107$). A curva de calibração e o gráfico de resíduos são apresentados nas Figuras 27 (p. 153) e 28 (p. 153). Estes resultados estão de acordo com a recomendação da ANVISA para validação de metodologias analíticas (RE nº 899/2003), na qual o valor mínimo do coeficiente de correlação deve ser 0,99.

A tabela 18 (p. 154) resume as equações das retas obtidas para cada marcador nas repetições do parâmetro linearidade.

De acordo com os pressupostos da regressão, os resíduos devem distribuir-se aleatoriamente em torno de 0, tanto no modelo global como em relação a cada variável. Caso tal situação não se verifique, será necessário alterar o modelo adotado (PIMENTEL & BARROS NETO, 1996).

Estudos realizados por Danzer & Currie (1998) e Miller (1991), demonstraram que a análise do gráfico dos resíduos permite detectar problemas no ajuste da curva como, por exemplo, desvios da linearidade, presença de amostras atípicas,

heterocedasticidade e dependência entre os erros. Uma curva bem ajustada deverá apresentar erros com distribuição uniforme, média zero, variância constante (homocedasticidade) e ausência de amostras atípicas.

O cálculo dos resíduos de cada marcador confirmaram a validade do modelo de calibração adotado, observando-se distribuição aleatória de resíduos próximos à média zero, homocedasticidade e ausência de amostras atípicas conforme Figuras 24 (p. 149), 26 (p. 151) e 28 (p. 153).

O método proposto para o doseamento de (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina no extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. é linear, pois todos os marcadores apresentaram curvas-padrão com coeficiente de correlação superior a 0,99, confirmados pela análise dos resíduos, estando de acordo com a especificação estabelecida na resolução nº 899/2003 da ANVISA.

Tabela 15: Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador (-)-Epigallocatequina (n=33).

Nível/Concentração	Repetição	Área	Média	DPR (%)
50% (0,010 mg/mL)	1	28,315	28,357	2,14
	2	28,986		
	3	27,772		
80% (0,016 mg/mL)	1	51,611	51,804	1,18
	2	52,487		
	3	51,315		
90% (0,018 mg/mL)	1	57,130	58,485	2,11
	2	58,784		
	3	59,542		
100% (0,020 mg/mL)	1	64,103	64,005	0,27
	2	63,805		
	3	64,109		
110% (0,022 mg/mL)	1	70,928	71,422	0,89
	2	71,200		
	3	72,140		
120% (0,024 mg/mL)	1	78,111	79,332	1,61
	2	79,235		
	3	80,652		
150% (0,030 mg/mL)	1	110,333	112,208	1,64
	2	112,281		
	3	114,012		
200% (0,040 mg/mL)	1	152,317	151,552	0,51
	2	151,554		
	3	150,786		
300% (0,060 mg/mL)	1	233,239	234,692	0,55
	2	235,147		
	3	235,692		
400% (0,080 mg/mL)	1	315,809	316,782	0,37
	2	316,438		
	3	318,100		
500% (0,100 mg/mL)	1	398,466	396,983	0,45
	2	397,492		
	3	394,991		

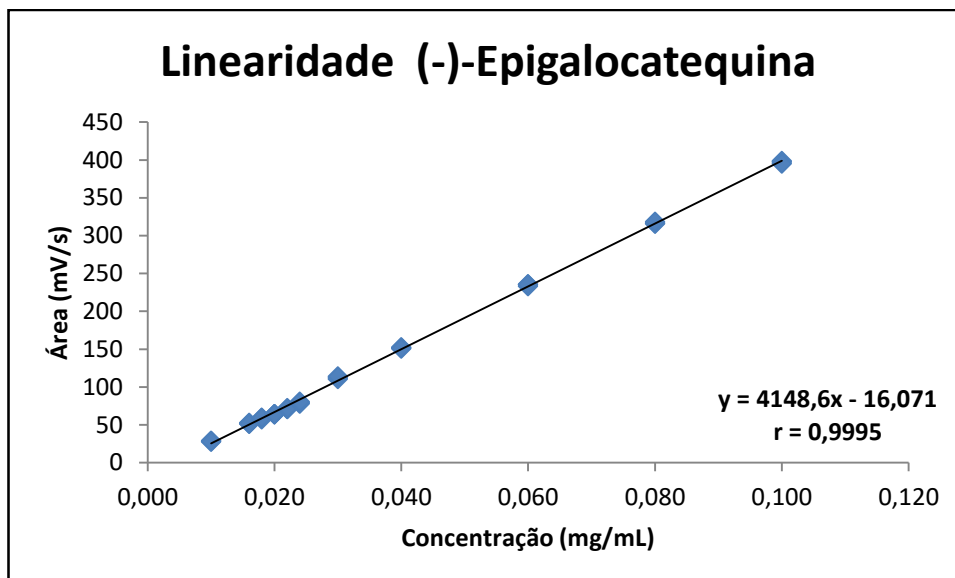


Figura 23: Regressão linear da curva de calibração (0,010 – 0,100 mg/mL) para o marcador (-)-Epigallocatequina.

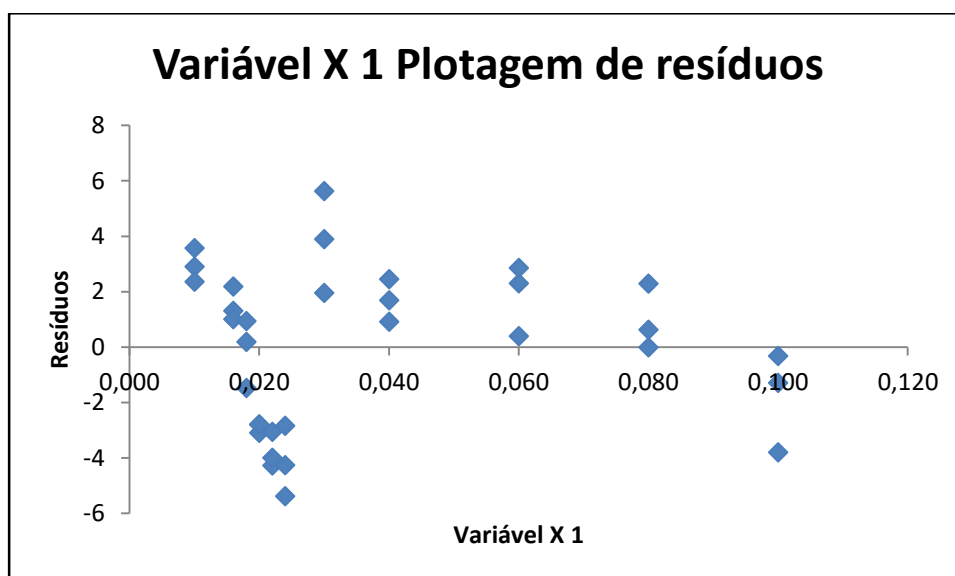


Figura 24: Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador (-)-Epigallocatequina.

Tabela 16: Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador (+)-Catequina (n=33).

Nível/Concentração	Repetição	Área	Média	DPR (%)
50% (0,0040 mg/mL)	1	58,208	57,073	2,26
	2	57,341		
	3	55,669		
80% (0,0064 mg/mL)	1	101,591	102,331	0,68
	2	102,978		
	3	102,425		
90% (0,0072 mg/mL)	1	113,031	111,839	1,25
	2	110,302		
	3	112,184		
100% (0,0080 mg/mL)	1	122,635	123,173	0,41
	2	123,648		
	3	123,235		
110% (0,0088 mg/mL)	1	134,386	136,159	1,13
	2	136,949		
	3	137,141		
120% (0,0096 mg/mL)	1	149,062	151,550	1,98
	2	150,700		
	3	154,888		
150% (0,0120 mg/mL)	1	183,613	184,906	0,94
	2	184,224		
	3	186,881		
200% (0,0160 mg/mL)	1	249,190	251,170	0,76
	2	251,304		
	3	253,017		
300% (0,0240 mg/mL)	1	365,724	366,492	0,22
	2	366,419		
	3	367,333		
400% (0,0320 mg/mL)	1	495,217	494,757	0,11
	2	494,903		
	3	494,150		
500% (0,0400 mg/mL)	1	615,991	615,548	0,21
	2	616,523		
	3	614,130		

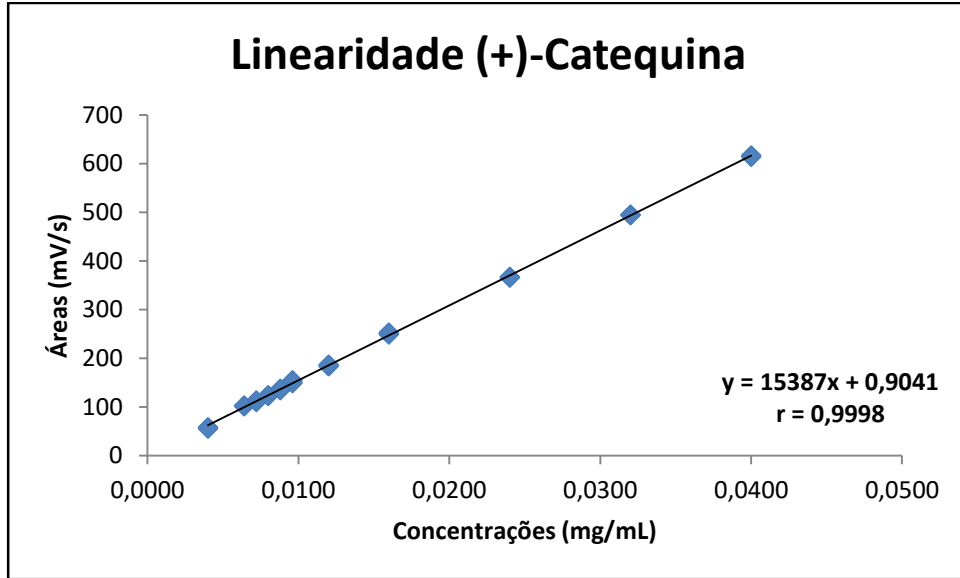


Figura 25: Regressão linear da curva de calibração (0,0040 – 0,0400 mg/mL) para o marcador (+)-Catequina.

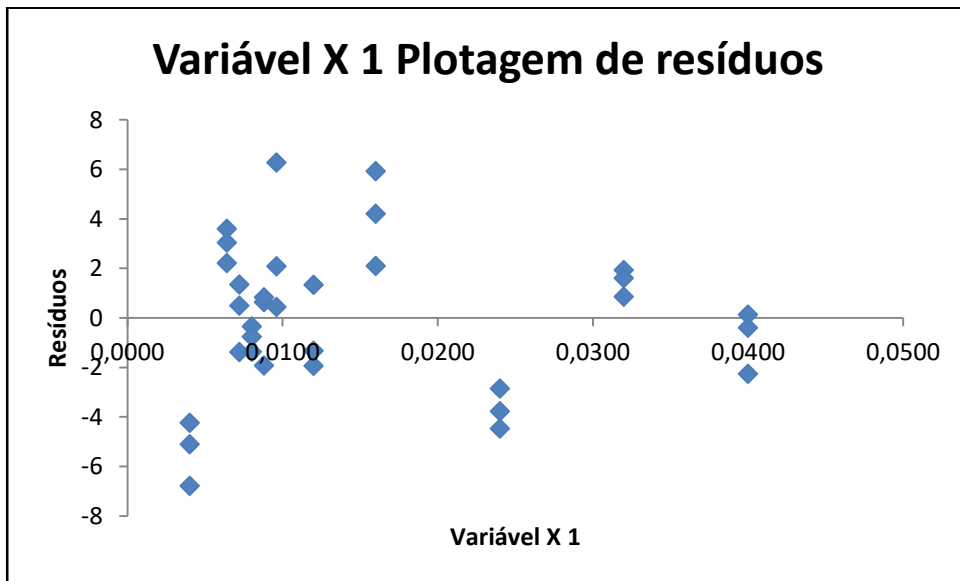


Figura 26: Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador (+)-Catequina.

Tabela 17: Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador (-)-Epicatequina (n=33).

Nível/Concentração	Repetição	Área	Média	DPR (%)
50% (0,0033 mg/mL)	1	40,312	40,398	3,06
	2	41,674		
	3	39,209		
80% (0,00528 mg/mL)	1	62,293	61,125	2,48
	2	61,668		
	3	59,414		
90% (0,00594 mg/mL)	1	70,180	69,358	1,63
	2	68,070		
	3	69,823		
100% (0,0066 mg/mL)	1	77,451	76,578	1,46
	2	75,319		
	3	76,963		
110% (0,00726 mg/mL)	1	85,678	84,477	1,44
	2	84,512		
	3	83,240		
120% (0,00792 mg/mL)	1	95,301	94,391	1,20
	2	94,753		
	3	93,118		
150% (0,0099 mg/mL)	1	115,339	113,659	1,29
	2	112,616		
	3	113,022		
200% (0,0132 mg/mL)	1	158,544	157,265	0,75
	2	156,212		
	3	157,039		
300% (0,0198 mg/mL)	1	232,940	231,515	0,64
	2	231,604		
	3	230,000		
400% (0,0264 mg/mL)	1	308,754	307,084	0,48
	2	306,526		
	3	305,971		
500% (0,0330 mg/mL)	1	386,065	383,567	0,61
	2	383,236		
	3	381,400		

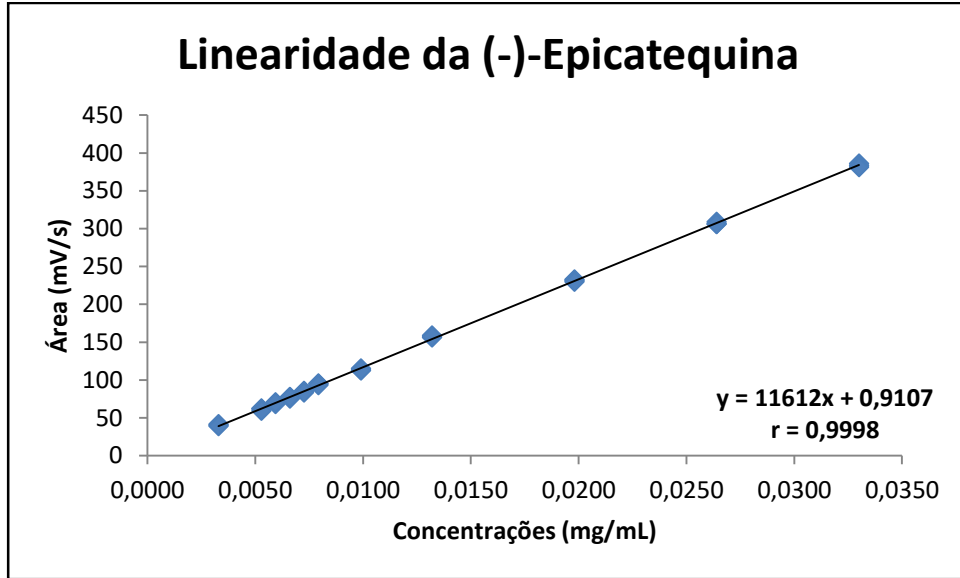


Figura 27: Regressão linear da curva de calibração (0,0033 – 0,0330 mg/mL) para o marcador (-)-Epicatequina.

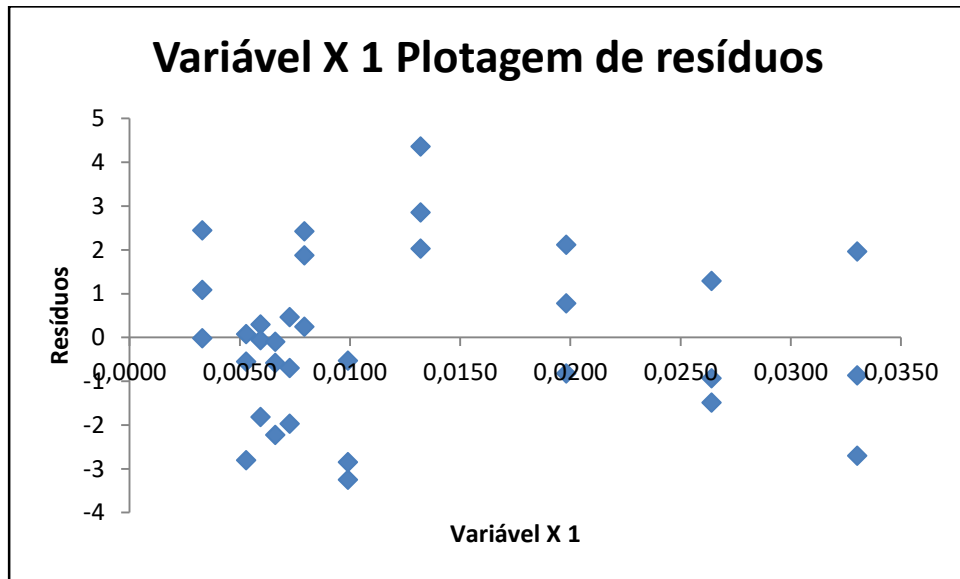


Figura 28: Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador (-)-Epicatequina.

Tabela 18: Equações das retas obtidas para cada marcador nas repetições do parâmetro linearidade.

Marcador	Repetição	Equação da reta
(-)-Epigallocatequina	1	$y = 4159,3x - 16,959$
	2	$y = 4148,1x - 15,892$
	3	$y = 4138,3x - 15,361$
	Média	$y = 4148,6x - 16,071$
(+)-Catequina	1	$y = 15408x + 0,0119$
	2	$y = 15408x + 0,6186$
	3	$y = 15346x + 2,0818$
	Média	$y = 15387x + 0,9041$
(-)-Epicatequina	1	$y = 11667x + 1,4419$
	2	$y = 11598x + 0,7952$
	3	$y = 11571x + 0,4950$
	Média	$y = 11612x + 0,9107$

5.2.3 Precisão

A precisão do método foi determinada em dois dias consecutivos de análise por diferentes analistas e mesmo equipamento, obtendo-se os valores de repetibilidade (intra-corrída) e precisão intermediária (inter-corrídas). Os valores dos teores e seus respectivos valores de DPR estão representados nas Tabelas 19 (p. 155), 20 (p. 155) e 21 (p. 156) para o marcador (-)-Epigallocatequina.

Tabela 19: Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrída do marcador (-)-Epigallocatequina para o Analista 1.

	Repetição	Áreas	Concentrações (mg/mL)
Analista 1	1	62,418	0,020
	2	61,385	0,019
	3	61,997	0,020
	4	63,426	0,020
	5	60,812	0,019
	6	61,884	0,020
		Média	0,020
		DP	0,00028
		DPR (%)	1,445

Tabela 20: Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrída do marcador (-)-Epigallocatequina para o Analista 2.

	Repetição	Áreas	Concentrações (mg/mL)
Analista 2	1	63,459	0,020
	2	60,677	0,019
	3	61,555	0,020
	4	61,211	0,019
	5	62,434	0,020
	6	62,187	0,020
		Média	0,020
		DP	0,00031
		DPR (%)	1,596

Tabela 21: Dados obtidos no parâmetro Precisão inter-corrída do marcador (-)-Epigallocatequina comparando-se os resultados das análises das Analistas 1 e 2.

	Repetição	Áreas	Concentrações (mg/mL)
Analista 1	1	62,418	0,020
	2	61,385	0,019
	3	61,997	0,020
	4	63,426	0,020
	5	60,812	0,019
	6	61,884	0,020
Analista 2	1	63,459	0,020
	2	60,677	0,019
	3	61,555	0,020
	4	61,211	0,019
	5	62,434	0,020
	6	62,187	0,020
		Média	0,020
		DP	0,00029
		DPR (%)	1,453

As Tabelas 22 (p. 157), 23 (p. 157) e 24 (p. 158) exibem os teores e seus respectivos valores de DPR para o marcador (+)-Catequina.

Tabela 22: Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrída do marcador (+)-Catequina para o Analista 1.

	Repetição	Áreas	Concentrações (mg/mL)
Analista 1	1	124,385	0,0080
	2	123,755	0,0080
	3	122,436	0,0079
	4	123,469	0,0080
	5	122,366	0,0079
	6	123,805	0,0080
		Média	0,0080
		DP	0,0001
		DPR (%)	0,654

Tabela 23: Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrída do marcador (+)-Catequina para o Analista 2.

	Repetição	Áreas	Concentrações (mg/mL)
Analista 2	1	122,898	0,0079
	2	124,611	0,0081
	3	123,246	0,0080
	4	123,114	0,0080
	5	123,999	0,0080
	6	122,003	0,0079
		Média	0,0080
		DP	0,0001
		DPR (%)	0,733

Tabela 24: Dados obtidos no parâmetro Precisão inter-corrída do marcador (+)-Catequina comparando-se os resultados das análises das Analistas 1 e 2.

	Repetição	Áreas	Concentrações (mg/mL)
Analista 1	1	124,385	0,0080
	2	123,755	0,0080
	3	122,436	0,0079
	4	123,469	0,0080
	5	122,366	0,0079
	6	123,805	0,0080
Analista 2	1	122,898	0,0079
	2	124,611	0,0081
	3	123,246	0,0080
	4	123,114	0,0080
	5	123,999	0,0080
	6	122,003	0,0079
		Média	0,0080
		DP	0,0001
		DPR (%)	0,663

As Tabelas 25 (p. 159), 26 (p. 159) e 27 (p. 160) exibem os teores e seus respectivos valores de DPR para o marcador (-)-Epicatequina.

Tabela 25: Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrída do marcador (-)-Epicatequina para o Analista 1.

	Repetição	Áreas	Concentrações (mg/mL)
Analista 1	1	76,145	0,0065
	2	74,889	0,0064
	3	75,236	0,0064
	4	76,991	0,0066
	5	75,148	0,0064
	6	76,222	0,0065
		Média	0,0065
		DP	0,0001
		DPR (%)	1,070

Tabela 26: Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrída do marcador (-)-Epicatequina para o Analista 2.

	Repetição	Áreas	Concentrações (mg/mL)
Analista 2	1	75,171	0,0064
	2	75,455	0,0064
	3	76,003	0,0065
	4	76,189	0,0065
	5	76,531	0,0065
	6	77,000	0,0066
		Média	0,0065
		DP	0,0001
		DPR (%)	0,888

Tabela 27: Dados obtidos no parâmetro Precisão inter-corrída do marcador (-)-Epicatequina comparando-se os resultados das análises das Analistas 1 e 2.

	Repetição	Áreas	Concentrações (mg/mL)
Analista 1	1	76,145	0,0065
	2	74,889	0,0064
	3	75,236	0,0064
	4	76,991	0,0066
	5	75,148	0,0064
	6	76,222	0,0065
Analista 2	1	75,171	0,0064
	2	75,455	0,0064
	3	76,003	0,0065
	4	76,189	0,0065
	5	76,531	0,0065
	6	77,000	0,0066
		Média	0,0065
		DP	0,0001
		DPR (%)	0,957

O parâmetro precisão intra-corrída foi realizado com seis réplicas na concentração 100% dos marcadores (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina, e apresentou como resultado na 1ª execução, os desvios padrões relativos de 1,445, 0,654 e 1,070 para cada um dos compostos respectivamente. E DPR de 1,596, 0,733, 0,888 para a 2ª execução atendendo às exigências normativas que recomendam $DPR < 5,0\%$ (ANVISA, 2003). As variações dos DPRs não são significativas o que demonstra que o método é preciso e admite variação de analistas.

Os valores de desvios padrões relativos obtidos para a precisão inter-corrída (n=12) foram de 1,453 para a (-)-Epigallocatequina, 0,663 para a (+)-Catequina e 0,957 para a (-)-Epicatequina, os quais também estão abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira vigente para validação de métodos analíticos, cujo DPR deve ser menor que 5,0% (ANVISA, 2003). Portanto, o método proposto para o

doseamento dos marcadores (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina no extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. é preciso, pois apresenta desvios padrões relativos inferiores aos especificados como limite na legislação vigente.

5.2.4 Exatidão

A exatidão representa a proximidade entre o valor da concentração analisada de uma amostra conhecida e o valor de concentração calculado da curva de calibração. O estudo é conduzido em todas as medidas. Este conjunto de dados é transformado em um conjunto de recuperações, que corresponde a concentração calculada dividida pela concentração real e multiplicada por 100. Um intervalo de confiança está associado à recuperação média desse conjunto.

O método é declarado exato, se a recuperação teórica de 100% estiver inclusa dentro do intervalo de confiança de 95 a 105% para os três níveis de concentração testados. A metodologia de recuperação adotada para este estudo foi a de adição de padrão.

Os resultados obtidos no parâmetro de exatidão demonstraram concordância entre os teores esperados e os encontrados. Os valores médios para os três níveis avaliados foram de (100,14% \pm 0,209) para a (-)-Epigallocatequina, (100,26% \pm 0,134) para a (+)-Catequina e (100,12% \pm 0,091) para a (-)-Epicatequina, comprovando que o método é exato para o doseamento dos marcadores no extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart., visto que os resultados encontram-se em conformidade com a legislação vigente (RE nº 899/2003) para validação de métodos analíticos. Os valores detalhados estão dispostos nas tabelas a seguir.

A Tabela 28 (p. 162) exhibe os dados referentes ao parâmetro Exatidão para o marcador (-)-Epigallocatequina.

Tabela 28: Dados do parâmetro Exatidão para o marcador (-)-Epigalocatequina .

Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
80%	1	50,991	79,83	99,79	100,35
	2	51,512	80,65	100,81	
	3	51,333	80,36	100,46	
DP					0,518
DPR (%)					0,516
Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
100%	1	64,112	100,37	100,37	100,14
	2	63,915	100,06	100,06	
	3	63,871	99,99	99,99	
DP					0,201
DPR (%)					0,201
Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
120%	1	76,731	120,13	100,11	99,93
	2	76,909	120,41	100,34	
	3	76,154	119,22	99,35	
DP					0,515
DPR (%)					0,515
Área do padrão do marcador (-)-Epigalocatequina					63,875
Recuperação média para os 3 níveis (%)					100,14 ± 0,209

A Tabela 29 (p. 163) exibe os dados referentes ao parâmetro Exatidão para o marcador (+)-Catequina.

Tabela 29: Dados do parâmetro Exatidão para o marcador (+)-Catequina .

Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
80%	1	98,173	79,80	99,75	100,40
	2	99,264	80,69	100,86	
	3	99,003	80,48	100,60	
				DP	0,579
				DPR (%)	0,577
Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
100%	1	123,222	100,16	100,16	100,13
	2	122,875	99,88	99,88	
	3	123,432	100,33	100,33	
				DP	0,229
				DPR (%)	0,228
Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
120%	1	148,192	120,46	100,38	100,27
	2	147,997	120,30	100,25	
	3	147,873	120,20	100,17	
				DP	0,109
				DPR (%)	0,109
Área do padrão do marcador (+)-Catequina					123,021
Recuperação média para os 3 níveis (%)					100,26 ± 0,134

A Tabela 30 (p. 164) exibe os dados referentes ao parâmetro Exatidão para o marcador (-)-Epicatequina.

Tabela 30: Dados do parâmetro Exatidão para o marcador (-)-Epicatequina .

Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
80%	1	62,177	79,54	99,42	100,14
	2	63,009	80,60	100,75	
	3	62,681	80,18	100,23	
				DP	0,670
				DPR (%)	0,669
Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
100%	1	78,392	100,28	100,28	100,20
	2	78,587	100,53	100,53	
	3	77,995	99,77	99,77	
				DP	0,386
				DPR (%)	0,385
Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
120%	1	93,112	119,11	99,26	100,02
	2	94,341	120,68	100,57	
	3	94,010	120,26	100,22	
				DP	0,678
				DPR (%)	0,678
Área do padrão do marcador (+)-Epicatequina					78,172
Recuperação média para os 3 níveis (%)					100,12 ± 0,091

5.2.5 Intervalo

Este parâmetro foi avaliado por meio dos resultados das análises da linearidade, precisão e exatidão do método do extrato etanólico de *Maytenus*

obtusifolia Mart. nas seguintes concentrações: 80%, 90%, 100%, 110% e 120% da concentração teórica do teste. Durante este ensaio, o método foi avaliado nas concentrações do intervalo de trabalho.

O método proposto para doseamento dos marcadores (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina no extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. apresentou linearidade, precisão e exatidão, aceitáveis no intervalo de 80 a 120% da concentração de trabalho, confirmando a validade do método para determinações dentro deste intervalo. Os resultados encontrados estão dispostos nas tabelas 31 (p. 165), 32 (p. 166) e 33 (p. 167) para os marcadores (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina, respectivamente.

As curvas de regressão, equações da reta e coeficientes de correlação de cada marcador são apresentados nas figuras 29 (p. 166), 30 (p. 167) e 31 (p. 168) para os marcadores (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina, respectivamente.

Tabela 31: Dados obtidos no parâmetro intervalo para o marcador (-)-Epigallocatequina (n=15).

Nível/Concentração	Repetição	Área	Média	DPR (%)
80% (0,016 mg/mL)	1	45,778	45,225	1,87
	2	44,253		
	3	45,644		
90% (0,018 mg/mL)	1	53,608	54,037	0,70
	2	54,188		
	3	54,315		
100% (0,020 mg/mL)	1	62,110	61,810	1,09
	2	62,281		
	3	61,040		
110% (0,022 mg/mL)	1	71,233	70,468	0,94
	2	70,059		
	3	70,112		
120% (0,024 mg/mL)	1	76,134	76,501	1,70
	2	75,426		
	3	77,942		

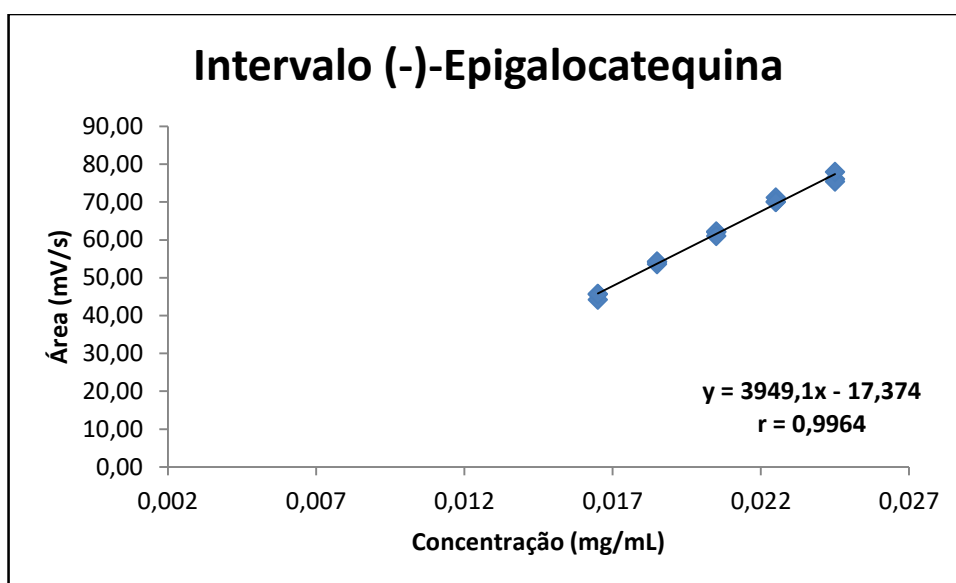


Figura 29 – Intervalo do marcador (-)-Epigallocatequina.

Tabela 32: Dados obtidos no parâmetro intervalo para o marcador (+)-Catequina (n=15).

Nível/Concentração	Repetição	Área	Média	DPR (%)
80% (0,0064 mg/mL)	1	102,149	101,54	0,52
	2	101,180		
	3	101,297		
90% (0,0072 mg/mL)	1	115,416	114,65	0,58
	2	114,334		
	3	114,202		
100% (0,0080 mg/mL)	1	125,124	124,90	0,16
	2	124,805		
	3	124,760		
110% (0,0088 mg/mL)	1	136,635	137,38	0,72
	2	138,504		
	3	137,009		
120% (0,0096 mg/mL)	1	151,557	152,06	0,31
	2	152,110		
	3	152,500		

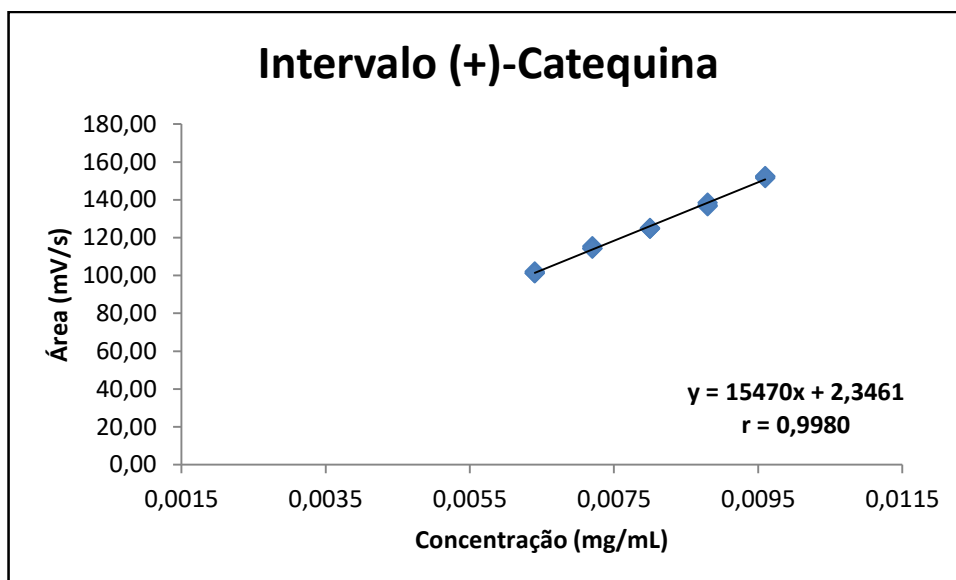


Figura 30 – Intervalo do marcador (+)-Catequina.

Tabela 33: Dados obtidos no parâmetro intervalo para o marcador (-)-Epicatequina (n=15).

Nível/Concentração	Repetição	Área	Média	DPR (%)
80% (0,00528 mg/mL)	1	60,847	61,119	0,57
	2	61,003		
	3	61,508		
90% (0,00594 mg/mL)	1	69,272	68,708	0,84
	2	68,120		
	3	68,731		
100% (0,0066 mg/mL)	1	78,420	79,091	0,75
	2	79,312		
	3	79,541		
110% (0,00726 mg/mL)	1	86,467	86,168	0,41
	2	85,777		
	3	86,260		
120% (0,00792 mg/mL)	1	97,188	97,182	0,23
	2	97,402		
	3	96,957		

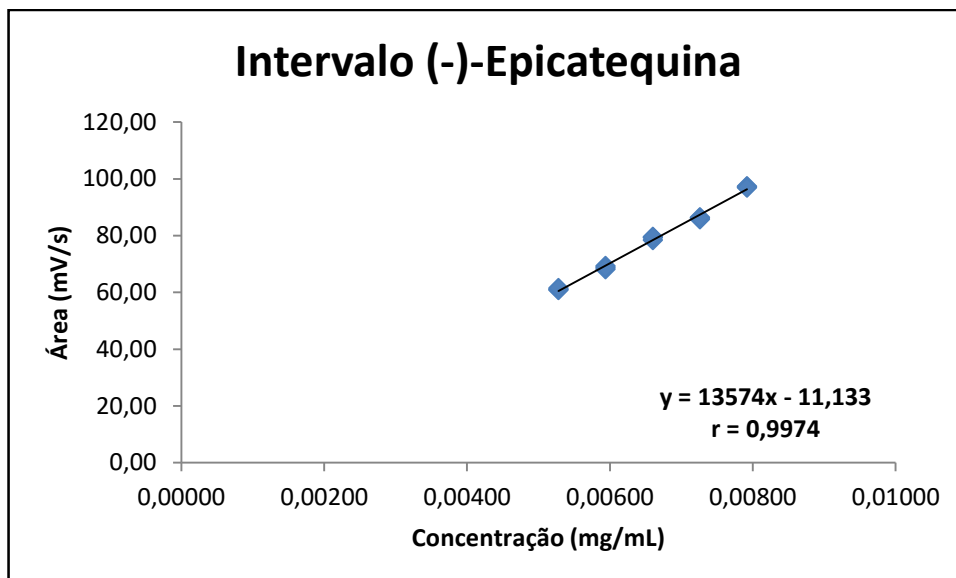


Figura 31 – Intervalo do marcador (-)-Epicatequina.

5.2.6 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos por extrapolação matemática da curva de calibração de acordo com o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos (RE nº 899/2003).

O limite de detecção do marcador (-)-Epigallocatequina foi de 2,08 µg/mL, enquanto a (+)-Catequina apresentou limite de 0,60 µg/mL e a (-)-Epicatequina de 0,49 µg/mL.

O limite de quantificação do marcador (-)-Epigallocatequina foi de 6,94 µg/mL, enquanto a (+)-Catequina apresentou limite de 2,00 µg/mL e a (-)-Epicatequina de 1,63 µg/mL.

5.2.7 Robustez

As variáveis avaliadas neste parâmetro foram alterações no fluxo da fase móvel, temperatura de forno, pH da fase móvel, composição da fase móvel, coluna cromatográfica e avaliação da estabilidade de soluções. Os marcadores foram avaliados individualmente e receberam codificação para facilitar a disposição dos resultados nas tabelas, (-)-Epigallocatequina (EGC), (+)-Catequina (CAT) e (-)-Epicatequina (EPI).

Na avaliação de mudança de fluxo da fase móvel (Tabela 34, p. 170), observou-se que a redução de 0,2 mL/min do fluxo original do método, promoveu a alteração do tempo de retenção dos marcadores e o aumento do tempo de corrida (ECG-11,29 min; CAT-14,20 min; EPI-18,0 min). A explicação para este comportamento está no aumento da interação entre as substâncias e a fase estacionária, devido a diminuição do efeito de arraste em massa exercido pela fase móvel. O aumento de 0,2 mL/min proporcionou uma redução no tempo de retenção dos marcadores (ECG -7,23 min; CAT -9,80 min; EPI - 14,2 min).

O parâmetro temperatura de forno de coluna (Tabela 35, p. 171) não promoveu alterações significativas no doseamento das substâncias, visto que alterações mais sensíveis seriam alcançadas caso houvessem mudanças drásticas da temperatura que ocasionariam alterações na tensão superficial dos solventes que compõem a fase móvel.

O terceiro parâmetro avaliado foi a variação do pH da fase móvel (Tabela 36, p. 172) que se mostrou pouco influente dentro das condições estabelecidas. O pH da fase móvel deve ser baseado no pKa das substâncias a serem eluídas. O pKa das metilxantinas, pode variar de 8,4 à 13,9 e das catequinas de 8,6 a 13,2 (GENNARO, 1999). O pH da fase móvel deve ser abaixo da constante de ionização, pois o aumento da forma ionizada do analito aumenta sua dissolução na fase aquosa e reduz seu tempo de retenção, já que a forma iônica passa através da coluna sem retenção (IVANOVIC et al., 1995). A manutenção do meio ácido é feita visando evitar variações de pH, visto que quando as metilxantinas e catequinas são expostas a pH superiores a 4,0 são protonadas e assim, não interagem com a fase estacionária, sendo eluídas sem sofrer detecção (ARAGÃO et al., 2005).

Na avaliação da composição da fase móvel (Tabela 37, p. 173), o ácido fosfórico usado no método original foi substituído por ácido trifluoroacético de acordo com levantamento bibliográfico realizado, onde observou-se um amplo uso deste reagente para acidificação da fase aquosa (AYRES et al., 2009; GUALBERTO, 2013). Foi possível observar um ligeiro estreitamento dos picos de interesse, sem que houvesse perda na quantificação. Porém, outros picos detectados no método sofreram com a ação do ácido e coeluíram ou apresentaram diminuição de áreas.

O parâmetro de variação da coluna cromatográfica não apresentou (Tabela 38, p. 173) alterações significativas na quantificação dos marcadores (EGC, CAT e EPI). Observou-se ligeira diminuição nos tempos de retenção dos marcadores que

podem ser justificados pela redução do tamanho da coluna para 125mm de comprimento.

Na avaliação da estabilidade de soluções (Tabela 39, p. 174), não foram observadas alterações significativas dos marcadores quando acondicionadas ao abrigo da luz e sob refrigeração (+5°C) por um período de 48 horas. Embora alguns pesquisadores tenham evidenciado a sensibilidade dos compostos fenólicos à ação da luz e do oxigênio (MAMEDE & PASTORE, 2004; MUNIN & EDWARDS-LÈVY, 2011; BOYE, 2015), já foram publicados estudos que mostram estabilidade destes compostos por longos períodos sob armazenamento adequado (BAZINET et al., 2010; LIMA, 2012).

Tabela 34: Dados obtidos para a robustez no parâmetro alteração de fluxo da fase móvel.

<i>Parâmetro</i>	<i>Variações</i>	<i>Cond. Padrão</i>	<i>Marcador</i>	<i>Áreas</i>	<i>Conc. (mg/mL)</i>	<i>Média</i>	<i>DPR (%)</i>	
<i>Fluxo da fase móvel</i>	0,8 mL/min	68,011	EGC	67,691	0,020	0,019	2,035	
				66,129	0,019			
				65,005	0,019			
	58,200	0,020						
	58,875	0,020						
	56,311	0,019						
	1,2 mL/min	58,428	CAT	130,657	0,0081	0,0080	1,061	
				129,241	0,0080			
				127,912	0,0079			
	116,734	0,0080						
	118,152	0,0080						
	118,308	0,0081						
0,8 mL/min	81,307	EPI	80,063	0,0065	0,0065	0,633		
			79,144	0,0064				
			79,965	0,0065				
67,431	0,0066							
1,2 mL/min	68,006		68,888	0,0067			0,0066	2,421
			65,702	0,0064				

Tabela 35: Dados obtidos para a robustez no parâmetro alteração da temperatura de forno de coluna.

<i>Parâmetro</i>	<i>Variações</i>	<i>Cond. Padrão</i>	<i>Marcador</i>	<i>Áreas</i>	<i>Conc. (mg/mL)</i>	<i>Média</i>	<i>DPR (%)</i>
<i>Temperatura do forno</i>	38°C	65,203	EGC	64,798	0,020	0,019	1,576
				63,306	0,019		
				62,889	0,019		
				62,202	0,019		
				63,450	0,020		
				62,955	0,020		
	42°C	63,812	CAT	124,610	0,0080	0,0080	0,420
				124,030	0,0080		
				123,568	0,0079		
				124,182	0,0081		
				125,317	0,0082		
				124,665	0,0081		
	38°C	75,324	EPI	77,057	0,0068	0,0067	0,463
				77,341	0,0068		
76,632				0,0067			
75,851				0,0065			
77,001				0,0066			
76,219				0,0065			
42°C	77,549		77,001	0,0066	0,0065	0,769	
			76,219	0,0065			

Tabela 36: Dados obtidos para a robustez no parâmetro alteração de pH da fase móvel.

<i>Parâmetro</i>	<i>Variações</i>	<i>Cond. Padrão</i>	<i>Marcador</i>	<i>Áreas</i>	<i>Conc. (mg/mL)</i>	<i>Média</i>	<i>DPR (%)</i>
<i>pH</i>	2,8	64,997	EGC	65,628	0,020	0,020	1,792
				66,441	0,020		
				64,130	0,020		
				63,961	0,019		
				64,538	0,020		
				65,333	0,020		
	3,2	65,101	EGC	123,098	0,0081	0,0081	0,522
				122,147	0,0080		
				123,370	0,0081		
				124,776	0,0080		
				127,016	0,0082		
				125,082	0,0080		
	2,8	75,607	EPI	74,458	0,0065	0,0065	0,522
				73,715	0,0064		
73,301				0,0065			
73,102				0,0066			
74,300				0,0067			
72,434				0,0065			
3,2	73,286	EPI	124,389	0,0081	0,0081	0,966	
			127,016	0,0082			
			125,082	0,0080			
			124,776	0,0080			
			127,016	0,0082			
			125,082	0,0080			

Tabela 37: Dados obtidos para a robustez no parâmetro alteração da composição da fase móvel.

Parâmetro	Variações	Cond. Padrão	Marcador	Áreas	Conc. (mg/mL)	Média	DPR (%)
Composição da fase móvel	Água acidificada	62,410	EGC	62,122	0,020	0,020	1,364
				60,569	0,019		
				61,898	0,020		
	14mM Ácido Trifluoroacético:	126,601	CAT	126,421	0,0080	0,0081	1,059
				127,859	0,0081		
				129,128	0,0082		
				75,992	0,0066		
	Acetonitrila	75,427	EPI	76,314	0,0067	0,0066	1,520
				74,185	0,0065		

Tabela 38: Dados obtidos para a robustez no parâmetro alteração de coluna cromatográfica.

Parâmetro	Variações	Cond. Padrão	Marcador	Áreas	Conc. (mg/mL)	Média	DPR (%)
Coluna cromatográfica	LiChrocart	62,132	EGC	60,423	0,019	0,019	1,743
				62,154	0,020		
				60,222	0,019		
	LiChospher 125x4mm, 5µ	123,259	CAT	123,016	0,0080	0,0080	0,578
				123,910	0,0080		
				124,433	0,0081		
				76,144	0,0064		
		78,405	EPI	77,239	0,0065	0,0065	2,153
				79,427	0,0067		

Tabela 39: Dados obtidos para a robustez no parâmetro avaliação da estabilidade de soluções.

Parâmetro	Variações	Cond. Padrão	Marcador	Áreas	Conc. (mg/mL)	Média	DPR (%)
Estabilidade de soluções	24 hrs	63,266	EGC	64,155	0,020	0,020	1,001
				63,289	0,020		
				62,917	0,020		
				59,357	0,019		
				60,007	0,020		
				59,469	0,019		
	48 hrs	61,570	EGC	122,594	0,0079	0,0079	0,312
				123,348	0,0079		
				123,100	0,0079		
				120,788	0,0080		
				120,412	0,0080		
				119,765	0,0079		
	24 hrs	76,429	EPI	75,931	0,0066	0,0066	1,023
				75,184	0,0065		
76,738				0,0066			
70,144				0,0064			
70,502				0,0065			
69,917				0,0064			
48 hrs	72,100	EPI	70,502	0,0065	0,0064	0,420	
			70,502	0,0065			
			70,502	0,0065			
			70,502	0,0065			
			70,502	0,0065			
			70,502	0,0065			

5.3 Estudo de fotoestabilidade do EEB de *Maytenus obtusifolia* Mart.

Os resultados expressos na Tabela 40 (p. 176) e 41 (p. 177) demonstram que os teores de (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina apresentaram decréscimo significativo dos seus teores quando submetidas às condições de exposição à luz visível e UVA, confirmando que a condição luminosidade interfere na quantificação dos marcadores.

Através das análises dos cromatogramas, foi possível observar que os picos referentes aos marcadores sofreram diminuição nas suas áreas e redução da quantificação. Não existiram variações relativas aos tempos de retenção dos picos.

As variações encontradas podem ser relacionadas à instabilidade das moléculas visto que os compostos fenólicos são compostos altamente reativos (SICHEL et al., 1991; RICE-EVANS et al., 1997; FIRUZI et al., 2005; SANDHAR et al., 2011).

Tabela 40: Resultados do estudo de fotoestabilidade com amostras de *Maytenus obtusifolia* Mart., submetidas a luz visível.

Parâmetro	Amostras	Marcador	Áreas	Conc. (mg/mL)	Média	DPR (%)
<i>Fotoestabilidade à luz visível</i>	Não exposta	EGC	64,909	0,0199	0,020	0,541
			65,421	0,0201		
			64,747	0,0199		
	Controle		65,188	0,020	0,0199	0,555
			64,497	0,0198		
			65,019	0,020		
	Exposta		64,941	0,0199	0,0198	0,843
			63,869	0,0196		
			64,563	0,0198		
	Não exposta	CAT	123,785	0,0080	0,008	0,707
			122,142	0,0079		
			123,464	0,0080		
	Controle		121,641	0,0079	0,0079	0,351
			122,418	0,0079		
			121,717	0,0079		
	Exposta		114,861	0,0074	0,0073	1,027
			112,629	0,0073		
			113,155	0,0073		
	Não exposta	EPI	77,167	0,0066	0,0066	0,998
			77,983	0,0066		
			76,442	0,0065		
Controle	77,014		0,0066	0,00657	0,550	
	76,248		0,0065			
	76,939		0,0065			
Exposta	73,999		0,00634	0,00626	1,026	
	72,833		0,00624			
	72,596		0,00622			

Tabela 41: Resultados do estudo de fotoestabilidade com amostras de *Maytenus obtusifolia* Mart., submetidas ao UVA.

Parâmetro	Amostras	Marcador	Áreas	Conc. (mg/mL)	Média	DPR (%)
Fotoestabilidade ao UVA	Não exposta	EGC	64,909	0,0199	0,020	0,541
			65,421	0,0201		
			64,747	0,0199		
	65,227		0,0200			
	64,547		0,0198			
	64,912		0,0199			
	Exposta	EGC	42,982	0,0129	0,0127	1,569
			41,506	0,0127		
			40,879	0,0125		
	Não exposta	CAT	123,785	0,0080	0,008	0,707
			122,142	0,0079		
			123,464	0,0080		
	121,643		0,0079			
	122,111		0,0079			
	123,908		0,0080			
	Exposta	CAT	103,841	0,0067	0,0066	0,949
			101,997	0,0066		
			102,370	0,0066		
	Não exposta	EPI	77,167	0,0066	0,0066	0,998
			77,983	0,0066		
			76,442	0,0065		
76,580	0,0065					
75,613	0,0064					
76,339	0,0065					
Exposta	EPI	54,046	0,0046	0,0046	1,151	
		54,511	0,0046			
		53,281	0,0045			

Os resultados expressos na Tabela 42 (p. 178) e 43 (p. 179) demonstram as variações entre os teores dos marcadores quando a amostra não foi exposta e o

controle e os resultados encontrados para a comparação entre as amostras controle e expostas nas duas situações a que foram submetidas.

Tabela 42: Resultados do estudo de fotoestabilidade com amostras de *Maytenus obtusifolia* Mart., variações entre as exposições à luz visível.

Parâmetro	Variações	Marcador	Média (%)
Variação entre amostra não exposta e controle	Luz visível	EGC	0,500
		CAT	1,250
		EPI	0,454
Variação entre controle e amostra exposta	Luz visível	EGC	0,502
		CAT	7,594
		EPI	4,718

Tabela 43: Resultados do estudo de fotoestabilidade com amostras de *Maytenus obtusifolia* Mart., variações entre as exposições ao UVA.

Parâmetro	Variações	Marcador	Média (%)
Variação entre amostra não exposta e controle	UVA	EGC	0,500
		CAT	0,250
		EPI	0,606
Variação entre controle e amostra exposta	UVA	EGC	36,180
		CAT	17,293
		EPI	29,878

É possível concluir que o extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. apresentou redução dos teores de marcadores quando exposto a condições específicas de luminosidade visível e à radiação UVA. As figuras 32 (p. 180), 33 (p. 180) e 34 (p. 181) apresentam graficamente as variações encontradas.

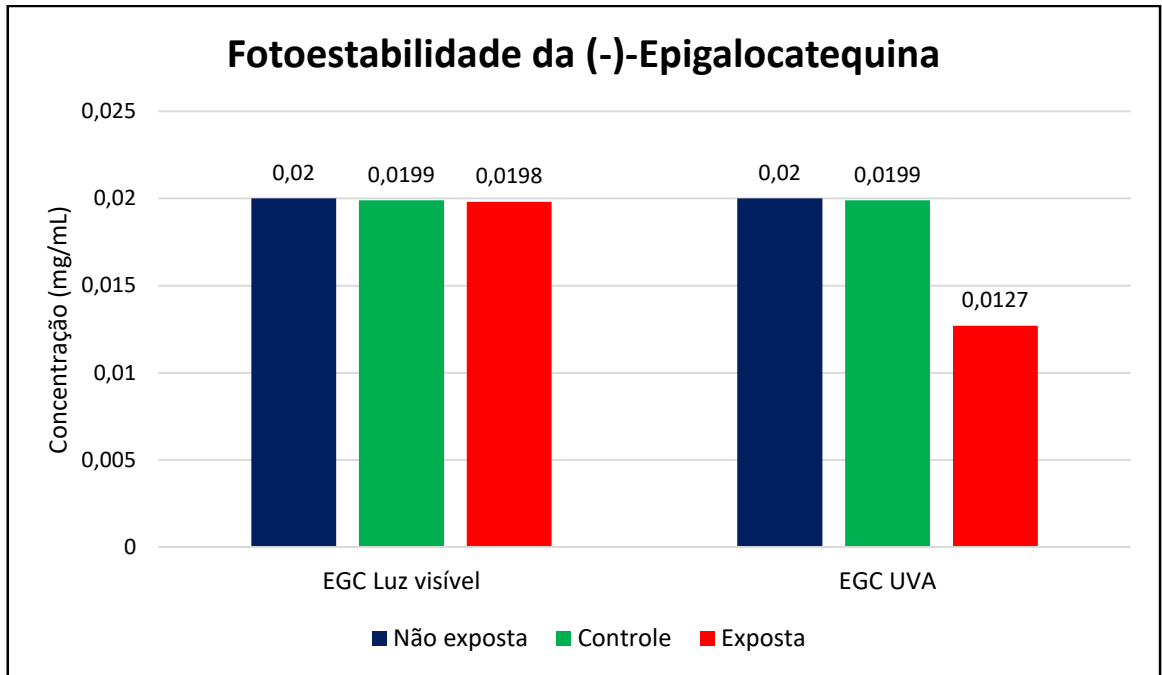


Figura 32 – Fotoestabilidade do marcador (-)-Epigallocatequina.

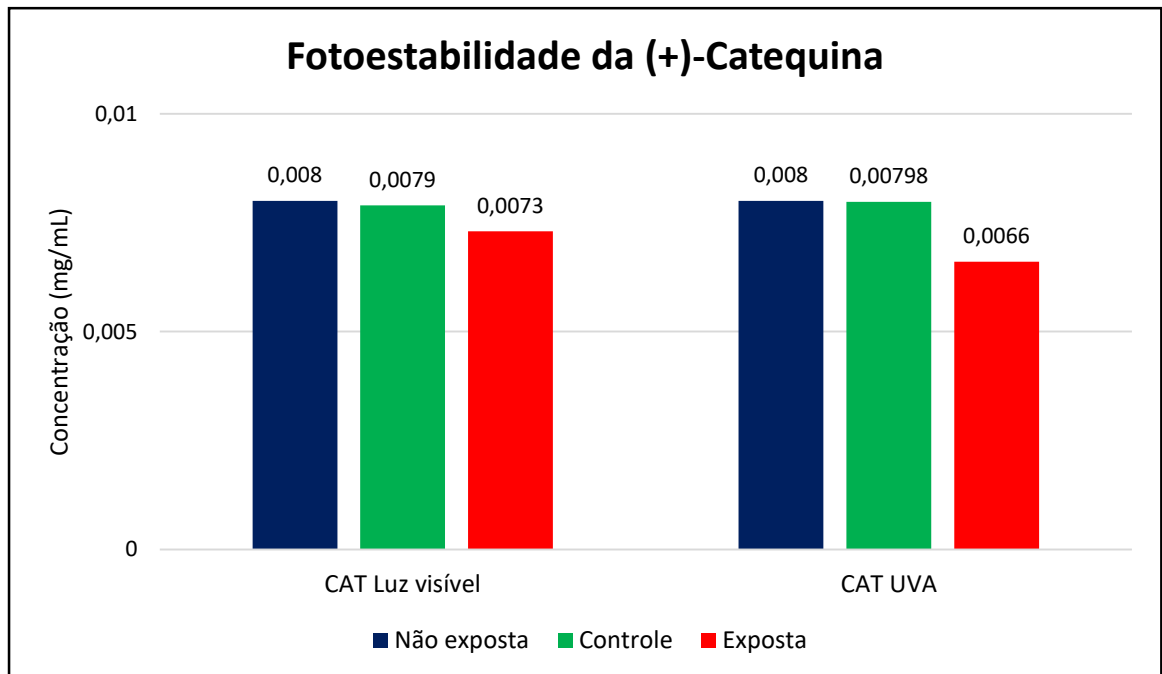


Figura 33 – Fotoestabilidade do marcador (+)-Catequina.

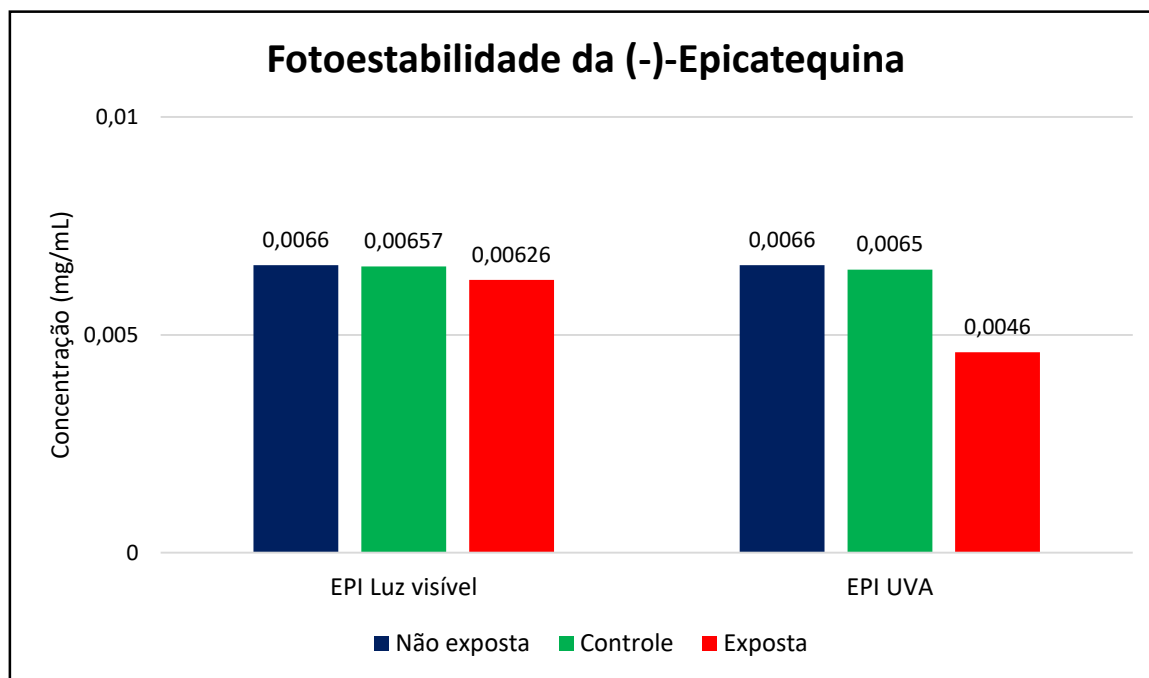


Figura 34 – Fotoestabilidade do marcador (-)-Epicatequina.

5.4 Avaliação das atividades biológicas

5.4.1 Avaliação da atividade antioxidante com radical DPPH

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. pela técnica de DPPH foram comparados aos resultados obtidos com o controle positivo ácido ascórbico, devido ao ácido ascórbico ser bastante utilizado como referência em diversos estudos para a atividade antioxidante pelo mundo (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; KARORI et al., 2007; KODAMA et al., 2010).

Os valores encontrados foram expressos em porcentagem de inibição de oxidação, ou seja, a porcentagem de atividade antioxidante é correspondente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante. Destaca-se a necessidade das leituras das absorvâncias dos controles negativos encontrados a cada dia de análise. Quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, maior é sua atividade antioxidante (ALVES et al., 2007). Sendo assim, quanto maior a concentração de antioxidantes da amostra e menor a absorvância, maior o consumo de DPPH.

Todas as amostras apresentaram capacidade de consumo do radical DPPH, visto que as absorvâncias posteriores à reação de DPPH com as diferentes concentrações das amostras testadas foram significativamente menores se comparadas às absorvâncias obtidas do controle negativo (DPPH + solvente), o que pode demonstrar preliminarmente a atividade antioxidante para o extrato testado.

Os resultados expressos na Tabela 44 (p. 183) demonstram que o extrato etanólico das folhas de *Maytenus obtusifolia* Mart. apresentou atividade sequestradora de radical livre com CI_{50} ($21,01 \pm 1,02 \mu\text{g/mL}$), ou seja, atividade antioxidante muito próxima ao exibido pelo ácido ascórbico CI_{50} ($19,17 \pm 2,32 \mu\text{g/mL}$), notório padrão utilizado para avaliação da atividade antioxidante de substâncias em todo o mundo.

A atividade antioxidante observada para o extrato em estudo está possivelmente associada à presença dos compostos fenólicos, especialmente flavonoides e catequinas. Alguns estudos *in vitro* demonstram que a atividade antioxidante dos flavonoides é maior que a das vitaminas E e C (RICE-EVANS et al., 1997).

Karori e colaboradores (2007) e Gramza e colaboradores (2006) observaram que o composto (-)-Epigallocatequina galato apresentou-se como um dos mais potentes antioxidantes já estudados. A (-)-Epicatequina, (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina galato também apresentam atividades antioxidantes significativas (ACHARYA et al., 2013).

O efeito antioxidante dos polifenóis tem sido atribuído às hidroxilas fenólicas presentes nas suas estruturas e que os tornam potentes sequestradores de radicais livres (AMIE et al., 2003). Ainda de acordo com os autores, as substâncias com maior capacidade de sequestro de radicais livres são as catequinas com hidroxilação nas posições 3', 4' e 5' do anel B e/ou grupos hidroxila na posição C3 (ZHAO et al., 2014).

Esta hidroxilação confere um alto grau de estabilidade ao radical fenoxi-catequina pela participação na deslocalização de elétrons que é um importante mecanismo no potencial antiradical. Isto explica a grande atividade antioxidante conferida pelas galocatequinas. (ZHU et al., 2001; AMIE, et al., 2003, RAO, et al., 2006).

Diferentes autores vêm empregando o mesmo método para avaliação da capacidade antioxidante de espécies vegetais, tendo-se observado resultados

semelhantes e significativos (LIMA et al., 2006; SOUSA et al., 2007; ROESLER et al., 2007; IHA et al., 2008; NUNES et al., 2008; BHAKTA & GANJEWALA, 2009; ACHARYA et al., 2013; ZHAO et al., 2014).

Tabela 44: Resultados da avaliação da atividade antioxidante do extrato das folhas *Maytenus obtusifolia* Mart. pela técnica do DPPH utilizando ácido ascórbico como controle positivo.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Atividade Antioxidante (%)	
	EEMO	Ácido Ascórbico
6,25	28,29 \pm 0,38	9,45 \pm 0,12
12,5	35,95 \pm 0,43	20,54 \pm 0,55
25	57,54 \pm 0,11	54,90 \pm 1,21
50	89,89 \pm 0,68	96,90 \pm 2,01
100	96,80 \pm 0,40	97,02 \pm 0,22
Cl₅₀	21,01 \pm 1,02	19,17 \pm 2,32

5.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart.

Os resultados dos ensaios da atividade antibacteriana e antifúngica do extrato de *M. obtusifolia* Mart. estão registrados nas Tabelas 45 (p. 184) e 46 (p. 185). O extrato foi avaliado nas concentrações de 1024 até 32 $\mu\text{g/mL}$, pela técnica de microdiluição em meio líquido.

Pode-se observar que o extrato a 1024 $\mu\text{g/mL}$ inibiu as quatro cepas bacterianas usadas nos ensaios biológicos. Por outro lado, as espécies de fungos apresentaram-se mais sensíveis ao extrato. Na concentração de 512 $\mu\text{g/mL}$, o extrato inibiu o crescimento de seis (75 %) cepas incluindo *C. albicans* LM-108, *C. tropicalis* ATCC-13813, *C. tropicalis* LM-36, *C. krusei* LM-13, *A. flavus* LM-247 e *A.*

fumigatus IPP-210. E sete (88 %) das cepas de leveduras e fungos filamentosos foram sensíveis ao extrato de *M. obtusifolia* na concentração de 1024 µg/mL.

A cepa microbiana *S. aureus* ATCC-6538 foi inibida na concentração de 512 µg/mL e a cepa *A. flavus* LM-247 foi inibida na concentração de 128 µg/mL.

Os resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana do extrato de *M. obtusifolia* Mart. nas concentrações de 1024, 512, 256 e 128 µg/mL contra bactérias e fungos, podem ser considerados, respectivamente, de moderada (1024 µg/mL) e ótima (512 a 128 µg/mL) atividade, conforme os critérios adotados por Sartoratto e colaboradores (2004) e Houghton e colaboradores (2007).

Tabela 45- Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima- CIM (µg/mL) do extrato de *M. obtusifolia* Mart. sobre bactérias - Técnica de microdiluição.

<i>Extrato Maytenus obtusifolia</i> Mart. (µg/mL)	<i>S. aureus</i> ATCC-6538	<i>S. aureus</i> M-117	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-25853	<i>P. aeruginosa</i> LM-116
1024	-	-	-	-
512	-	+	+	+
256	+	+	+	+
156	+	+	+	+
128	+	+	+	+
32	+	+	+	+
Microrganismo	+	+	+	+
Cloranfenicol (100 µg/mL)	-	-	-	+

-: Não houve crescimento do microrganismo

+: Crescimento do microrganismo

Tabela 46- Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima - CIM ($\mu\text{g/mL}$) do extrato de *M. obtusifolia* Mart sobre fungos - Técnica de microdiluição.

<i>Extrato Maytenus obtusifolia</i> Mart. ($\mu\text{g/mL}$)	<i>C. albicans</i> ATCC-76645	<i>C. albicans</i> LM-108	<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	<i>C. tropicalis</i> LM-36	<i>C. krusei</i> LM-13	<i>C. krusei</i> LM-08	<i>A. flavus</i> LM-247	<i>A. fumigatus</i> IPP-210
1024	-	-	-	-	-	+	-	-
512	+	-	-	-	-	+	-	-
256	+	+	+	+	+	+	-	+
128	+	+	+	+	+	+	-	+
64	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+
Microrganismo	+	+	+	+	+	+	+	+
Nistatina (100 UI)								
Fluconazol (100 $\mu\text{g/mL}$)	-	+	-	-	+	-	-	-

-: não houve crescimento do microrganismo +: crescimento do microrganismo

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- O extrato etanólico bruto de *Maytenus obtusifolia* Mart., foi produzido a partir do material vegetal (folhas) coletado em junho de 2014 no município de Santa Rita – PB. Submetido ao processo de extração na proporção 1,00 kg de droga seca para 12 litros de etanol 96%, após secagem, obteve-se 321,3 g de extrato bruto das folhas.
- As análises de controle de qualidade realizadas com o material vegetal de *Maytenus obtusifolia* Mart. estabeleceram um perfil mais adequado para a caracterização da droga vegetal em estudo. Foram estabelecidas especificações para todos os métodos de análise de material vegetal presentes na farmacopeia brasileira 5ª edição.
- Os ensaios de “determinação de água em drogas vegetais”, “determinação de cinzas totais”, determinação de cinzas sulfatadas”, “ensaio limite de metais pesados”, “determinação de densidade aparente de sólidos”, “flavonoides totais”, “taninos totais” e “determinação de contaminação microbiológica” apresentaram resultados satisfatórios confirmando sua aplicabilidade ao material vegetal de *Maytenus obtusifolia* Mart.
- Os ensaios de flavonoides totais, taninos totais e fenólicos totais por métodos espectrofotométricos confirmaram a riqueza do conteúdo polifenólico presente em *Maytenus obtusifolia* Mart.
- O método analítico foi desenvolvido e validado para os marcadores (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina e apresentou especificidade, linearidade, precisão, precisão intermediária, exatidão e robustez de acordo com as especificações exigidas pela ANVISA no “Guia de Validação de métodos analíticos e bioanalíticos” (RE nº 899/2003).
- A avaliação do extrato produzido durante o estudo evidenciou presença de 1% do marcador (-)-Epigallocatequina, 0,4% de (+)-Catequina e 0,33% de (-)-Epicatequina.

- Este é o primeiro relato da substância (-)-Epigallocatequina na literatura de *Maytenus obtusifolia* Mart. Os outros dois marcadores já haviam sido relatados em estudos da espécie.
- De acordo com o método desenvolvido foi possível calcular os limites de detecção dos marcadores (-)-Epigallocatequina (2,081 µg/mL), (+)-Catequina (0,597 µg/mL) e (-)-Epicatequina (0,488 µg/mL) e seus limites de quantificação (-)-Epigallocatequina (6,938 µg/mL), (+)-Catequina (1,992 µg/mL) e (-)-Epicatequina (1,627 µg/mL). Ambos os estudos apresentaram limites de trabalho muito baixos o que demonstra a sensibilidade do método.
- O extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. mostrou-se estável em relação aos marcadores quando exposto à luz visível em ensaio de fotoestabilidade. Foram observadas pequenas variações no teor do marcador (+)-Catequina (7,594%) e seu isômero (-)-Epicatequina (4,718%), enquanto concentração da (-)-Epigallocatequina manteve-se inalterada quando comparada ao controle não exposto. Porém, quando avaliado sob radiação UVA, foi possível observar redução significativa dos teores dos marcadores (-)-Epigallocatequina (36,180%), (+)-Catequina (17,293%) e (-)-Epicatequina (29,878%) quando comparados ao controle não exposto.
- A atividade antioxidante do extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart. apresentou resultados tão eficientes (CI₅₀ 21,01 ± 1,02 µg/mL), quanto aos encontrados com o padrão Ácido ascórbico (CI₅₀ 19,17 ± 2,32 µg/mL), cujo uso é consagrado como antioxidante.
- Os resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana do extrato de *Maytenus obtusifolia* Mart. nas concentrações de 1024, 512, 256 e 128 µg/mL contra bactérias e fungos, são considerados, respectivamente, de moderada (1024 µg/mL) e ótima (512 a 128 µg/mL) atividade, conforme os critérios adotados por Sartoratto e colaboradores (2004) e Houghton e colaboradores (2007).
- O extrato etanólico de *Maytenus obtusifolia* Mart., em suas concentrações mais altas, foi capaz de inibir o crescimento das cepas bacterianas

Staphylococcus aureus (ATCC-6538), *Staphylococcus aureus* (M-117), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-25853) e *Pseudomonas aeruginosa* (LM-116). Espécies de fungos leveduriformes *Candida albicans* (ATCC-76645), *Candida albicans* (LM-108), *Candida krusei* (LM-13), *Candida tropicalis* (ATCC-13803) e *Candida tropicalis* (LM-36). E espécies de fungos filamentosos *Aspergillus flavus* (LM-247) e *Aspergillus fumigatus* (LM-210).

- Este trabalho ressalta a importância do desenvolvimento e validação de métodos de quantificação e de controle de qualidade de extratos vegetais e fitomedicamentos. Além disso, busca incentivar a realização de mais estudos nessa linha de pesquisa, uma vez que o aproveitamento da rica biodiversidade brasileira implicará em grandes benefícios para sociedade no surgimento de novos fitoterápicos e novas possibilidades terapêuticas.
- Este é um trabalho de importância no âmbito da fitoquímica, por se tratar do quarto estudo químico e biológico envolvendo a espécie *Maytenus obtusifolia* Mart.. Devido ao fato da espécie apresentar poucos estudos, estamos dando uma importante contribuição à quimiotaxonomia, à fitoquímica e à farmacologia da espécie, assim como ao gênero *Maytenus*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, P. P.; GENWALI, G. R.; RAJBHANDARI, M. Isolation of catechin from *Acacia catechu* Willdenow estimation of total flavonoid content in *camellia sinensis* Kuntze var. *Assamica* collected from different geographical region and their antioxidant activities. **Scientific World**, v. 11, n. 11, p. 32-36, 2013.
- ADEROGBA, M. A.; OGUNDAINI, A. O.; ELOFF, J. N. Isolation of two flavonoids from *Bauhinia monandra* leaves and their antioxidative effects. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines**, v. 3, p. 59-65, 2006.
- ALARCON, J.; BECERRA, J.; SILVA, M.; MORGENSTERN, T.; JAKUPOVIC, J. Agarofurans from seeds of *Maytenus boaria*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1457-1460, 1995.
- ALVARENGA, F. C. R.; GARCIA, E. F.; BASTOS, E. M. A. F.; GRANDI, T. S. M.; DUARTE, M. G. S. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2^a, p. 442-448, 2009.
- ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. **Diálogos e ciência – Revista da rede ensino FTC**, v. 5, n. 12, p. 7-8, 2007.
- AMIE, D.; AMIE, D. D.; BESLO, D.; TRINAJSTIE, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Croatica Chemica Acta**, v. 76, p. 55-61, 2003.
- ANDRADE, S. F.; ANTONIOLLI, D.; COMUNELLO, E.; CARDOSO, L. G. V.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Antiulcerogenic activity of crude extract, fractions and populnic acid isolated from *Austroplenckia populnea* (Celastraceae). **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 61, p. 329-333, 2006.

ANDRADE, S. F.; COMUNELLO, E.; NOLDIN, V. F.; MONACHE, F. D.; CECHINEL-FILHO, V.; NIERO, R. Antiulcerogenic activity of fractions and 3,15 dioxo-21-hydroxy friedelane isolated from *Maytenus robusta* (Celastraceae). **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, p. 41-46, 2008.

ANDRADE, S. F.; LEMOS, M.; COMUNELLO, E.; NOLDIN, V. F.; CECHINEL-FILHO, V.; NIERO, R. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 252-257, 2007.

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

ARENAS, P.; AZORERO, R. M. Plants of common use in Paraguayan folk medicine for regulating fertility. **Journal Economic Botany**, v. 31, p. 298-301, 1977.

ARNAO, M.B.; CANO, A.; ACOSTA, M. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. **Redox Report**, v. 5, p. 365-370, 2000.

ASSIMOPOULOU, A. N.; ZLATANOS, S. N.; PAPAGEORGIU, V. P. Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. **Food Chemistry**, v. 92, p. 721-727, 2005.

AUSTIN, M. B.; NOEL, J. P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. **Natural Product Reports**, v. 20, p. 79-110, 2003.

AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; VIEIRA JUNIOR, G. M. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1509-1512, 2009.

BACKHOUSE, N.; DELPORTE, C.; NEGRETE, R.; MUNOZ, O.; RUIZ, A. R. Antiinflammatory and antipyretic activities of *Maytenus boaria*. **Pharmaceutical Biology**, v. 32, n. 3, p. 239-244, 1994.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; OTOFUJI, G. M.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; MARQUES, M. C. A.; MESIAVELA, S. Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H⁺, K⁺-ATPase activity and formation of nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 433–440, 2007.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191–203, 2006.

BARBOSA, K. D. N.; OLIVEIRA, C. G.; SILVA, R. C. Avaliação da qualidade das plantas medicinais comercializadas em Anápolis-GO. **Anuário da produção de iniciação científica discente**, v. 13, n. 21, p. 47-51, 2010.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 13, n. 1, p.29-39, 1990.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa, Imprensa da Universidade Federal de Viçosa, v. 2, 1984.

BASSANI, V. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos. **Revista Fitos**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 14-17, 2005.

BAZINET, L.; ARAYA-FARIAS, M.; DOYEN, A.; TRUDEL, D.; TÊTU, B. Effect of process unit operations and long-term storage on catechin contents in EGCG-enriched tea drink. **Food Research International**, v. 43, n. 6, p. 1692-1701, 2010.

BHAKTA, D.; GANJEWALA, J. Effect of leaf positions on total phenolics, flavonoids and proanthocyanidins content and antioxidant activities in *Lantana camara* (L). **Journal of Scientific Research**, v. 1, n. 2, p. 363-369, 2009.

BOGS, J.; DOWNEY, M. O.; HARVEY, J. S.; ASHTON, A. R.; TANNER, G. J.; ROBINSON, S. P. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves, **Plant Physiology**, v. 139, p. 652-663, 2005.

BOYE, J. I. **Nutraceutical and functional food processing technology**. 1 ed: John Wiley & Sons. 400p. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Brasília-DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Recomendações para estudo de Fotoestabilidade**. Brasília – DF. 2012. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/recomenda/fotoestabilidade.pdf>. Acesso em: 10 de janeiro de 2015.

BRASIL, D. F. B. **Estudo fitoquímico e análise gastroprotetora dos principais constituintes das cascas das raízes de *Maytenus robusta* REISS (Celastraceae)**. 2013. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí-SC.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n.11, p. 317-333, 1998.

BUFFA FILHO, W.; CORSINO, J.; FRANCA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Quantitative Determination of cytotoxic friedo-nor-oleanane from five morphological types of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 75-78, 2002.

CABRAL, A. G. S. **Constituintes químicos de *Erythrina velutina* Willd (FABACEAE)**. 2009. 175p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

CABRERA, C.; GIMÈNEZ, R.; LÓPEZ, M. C. Determination of Tea Components with Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4427-4435, 2003.

CALIXTO, J. B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.; SANTOS, A. R. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**, v. 2, p. 261-279, 2001.

CAMPOS, M. G.; WEBBY, R. F.; MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; CUNHA, A. P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 3, p. 742-745, 2003.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos Fenólicos Simples e Heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G., MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2003. p. 519-536.

CARVALHO-OKANO, R.M., LEITÃO-FILHO, H.F. In: REIS, M.S.; SILVA, S.R. (Eds.) **Plantas Medicinais Aromáticas**. 2 ed. vol.1. Brasília: 2004. p.11-13.

CARVALHO-OKANO, R.M. & LEITÃO-FILHO, H.F. O gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) no Brasil extra-amazônico. In: REIS, M. S.; SILVA, S. R. **Conservação e uso sustentável de Espinheira Santa**. 1 ed. 2005. p. 11-51.

CARVALHO-OKANO, R.M. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil extra-amazônico**. 1992. 253p. Tese (Doutorado em Ciências: Biologia Vegetal) – UNICAMP, Campinas-SP.

CARVALHO VELOSO, C.; RODRIGUES, V. G.; AZEVEDO, A. O.; OLIVEIRA, C. C.; GOMIDES, L. F.; DUARTE, L. P.; PEREZ, A. C. Antinociceptive effects of *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek (Celastraceae) root extract and its tingenone constituent. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 1, p. 68-76, 2014.

CASTRO, J.; PREGIBON, T.; CHUMANOV, K.; MARCUS, R. K.; Determination of catechins and caffeine in proposed green tea standard reference materials by liquid chromatography-particle beam/electron ionization mass spectrometry (LC-PB/EIMS). **Talanta**, v. 82, n. 5, p. 1687-1695, 2010.

CETIN-KARACA, H. **Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds against foodborne pathogens**. 2011. 196p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – University of Kentucky, Lexington – KY.

CHÁVEZ, H.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A.G.; GONZÁLEZ, A.G. First examples of dammarane triterpenes isolated from Celastraceae. **Tetrahedron**, v. 53, n. 18, p. 6465-6472, 1997.

CHEBIL, L.; HUMEAU, C.; FALCIMAIGNE, A.; ENGASSER, J.; GHOUL, M. Enzymatic acylation of flavonoids. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2237-2251, 2006.

CHENG, J.; CHEN, X.; ZHAO, S.; ZHANG, Y. Antioxidant-capacity-based models for the prediction of acrylamide reduction by flavonoids. **Food Chemistry**, v. 168, p. 90-99, 2015.

CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Williams & Wilkins, p. 739-788, 1991.

COELHO, R. G.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W. Z. Chemical constituents from the infusion of *Zollernia ilicifolia* Vog. and comparison with *Maytenus* species. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58c, p.47-52, 2003.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. 7 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p. 11-27.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; DO SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 272-278, 2005.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 1984, 134p.

CORSINO, J.; ALÉCIO, A. C.; RIBEIRO, M. L.; FURLAN, M.; PEREIRA, A. M. S.; DUARTE, I. B.; FRANÇA, S. C. Quantitative determination of maitenin and 22 β -hydroxymaitenin in callus of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 9, n. 5, p. 245-247, 1998.

CORSINO, J.; CARVALHO, P. R. F.; KATO, M. J.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. D. A. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 741-748, 2000.

CORSINO, J.; SILVA, D. H. S.; ZANONI, M. V. B.; BOLZANI, V. D. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 8, p. 913-916, 2003.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 564-582, 1999.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of science**, v. 854, p. 435-442, 1998.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. Esteróis e triterpenos: ácidos biliares, precursores da vitamina D e fitosteróides, cardiotónicos, hormonas esteróides, matérias-primas de núcleo esteróide usadas em sínteses parciais e saponósidos. In: CUNHA, A. P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: 2005. p. 432-482.

CUSHINIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DALLUGE, J. J.; NELSON, B. C.; THOMAS, J. B.; SANDER, L. C. Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 793, p. 265-274, 1998.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 993-1014, 1998.

DA SILVA, G.; TANICA, M.; ROCHA, J.; SERRANO, R.; GOMES, E. T.; SEPODES, B.; SILVA, O. In vivo anti-inflammatory effect and toxicological screening of *Maytenus heterophylla* and *Maytenus senegalensis* extracts. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 7, p. 693-700, 2011.

DE ALMEIDA, M. T. R.; RIOS-LUCI, C.; PADRÓN, J. M.; PALERMO, J. A. Antiproliferative terpenoids and alkaloids from the roots of *Maytenus vitis-idaea* and *Maytenus spinosa*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 14, p. 1741-1748, 2010.

DEEPA, M. A.; BAI, V. N. Bioinsecticidal compounds of celastraceae – the spindle tree family. **International Journal of Botany**, v. 6, n. 3, p.220-227, 2010.

DEWICK, P. M. Isoflavonoids. In: HARBORNE, J. B. (ed.) **The flavonoids: advances in research since 1986**. London: Chapman & Hall, p. 117-237, 1994.

DIAS, K. S.; MARQUES, M. S.; MENEZES, I. A.; SANTOS, T. C.; SILVA, A. B.; ESTEVAM, C. S.; SANT'ANA, A. E.; PIZZA, C.; ANTONIOLLI, A. R.; MARÇAL, R. M. Antinociceptive activity of *Maytenus rigida* stem bark. **Fitoterapia**, v. 78, p. 460-464, 2007.

DOLCI, M. **Determination of Catechins and Phenolic Acids in Red Wine by Solid Phase Extraction and HPLC**. Application note 20583. 2012. 6p. Disponível em: <http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/CMD%20Documents/AN-20583-Determination-Catechins-Phenolic-Acids-Red-Wine-Solid-Phase-Extraction-HPLC.pdf>.

Acesso em: 17 de janeiro de 2015.

DÔRES, R. G. R. **Análise morfológica e fitoquímica da Fava D'anta**. 2007. 374p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

DREWS, J. Drug discovery: A historical perspective. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 1960-1964, 2000.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

EL DEEB, K. S.; AL-HAIDARI, R. A.; MOSSA, J. S.; ATEYA, A. M. Phytochemical and pharmacological studies of *Maytenus forsskaoliana*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 11, n. 4, p. 184-191, 2003.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bactéria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1978.

EMER, J.; MILLER, J. H. M. (eds.) **Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005. 411p.

ESTEVAM, C. S.; CAVALCANTI, A. M.; CAMBUI, E. V. F.; NETO, V. A.; LEOPOLDO, P. T. G.; FERNANDES, R. P. M.; ARAÚJO, B. S.; PORFÍRIO, Z.; SANT'ANA, A. E. G. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rígida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 299-303, 2009.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14. ed. London: WB Saunders Company, 1996.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, 2004.

FDA (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION) Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Guidance for industry, analytical procedures and methods validation**. Rockville, 2000.

FERREIRA, R. C. S; RIFFEL, A.; SANT'ANA, A. E. G. HIV: Mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1743-1755, 2010.

FIRUZI, O.; LACANNA, A.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; SASO, L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by ferric reducing antioxidant power assay and cyclic voltammetry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1721, n. 1-3, p. 174-184, 2005.

FONSECA, A. P. N. D.; SILVA, G. D. F.; CARVALHO, J. J.; SALAZAR, G. C. M.; DUARTE, L. P.; SILVA, R. P.; JORGE, R. M.; TAGLIATI, C. A.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A.; PERES, V.; VIEIRA-FILHO, S. A. Phytochemical study of the decoct

from the leaves of *Maytenus truncate* Reissek and the evaluation of the antinociceptive, antiedematogenic and antiulcerogenic activities of the decoct extracts. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 842-847, 2007.

FONSECA, F. N. **Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis* – Chambá: obtenção de extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica.** 2009. 131p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE.

FREIRE, M. F. I. Metais pesados e plantas medicinais. **Revista Ciência Agronômica**, ano IV, n. 8, 2005.

FREIRE, M. O. **Estudo fitoquímico e psicofarmacológico das raízes de *Maytenus obtusifolia* Mart. (CELASTRACEAE).** 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB.

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

GENTRY, A.H. **A field guide to the families and genera of woody plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru) with supplementary notes on herbaceous taxa.** Washington: The University of Chicago Press / Conservation International, 1993. 895pp.

GHAYUR, M. N.; KHAN, H.; GILANI, A. H. Antispasmodic, bronchodilator and vasodilator activities of (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n. 8, p. 970-975, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONZÁLEZ, A. G.; KENNEDY, M. L.; RODRÍGUEZ, F. M.; BAZZOCCHI, I. L.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; MOUJIR, L. Absolute configuration of triterpene dimmers from *Maytenus* species (Celastraceae). **Tetrahedron**, v. 57, p. 1283-1287, 2001.

GONZÁLEZ, A. G.; ALVARENGA, N. L.; RAVELO, A. G.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; CANELA, N. J.; MOUJIR, L. M. Antibiotic phenol nor-triterpenes from *Maytenus canariensis*. **Phytochemistry**, v 43, n. 1, p. 129-132, 1996.

GONZALEZ, F. G.; PORTELA, T. Y.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 41-47, 2001.

GONZALEZ, G. A.; JIMENEZ, I. A.; RAVELO, G. A.; LUIS, J. G.; BAZZOCHI, L. B. Agarofurane sesquiterpene esters from *Maytenus canariensis*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 173-175, 1989.

GONZALEZ, J. G.; MONACHE, G. D.; MONACHE, F. D.; MARINIBETTOLO, G. B. Chuchuasca – a drug used in folk medicine in the Amazonian and Andean areas. A chemical study of *Maytenus leavis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 5, p. 73–77, 1982.

GORDON, M. H. Dietary antioxidants in disease prevention. **Natural Products Reports**, v. 13, n. 4, p. 265-273, 1996.

GOTO, T.; YOSHIDA, Y.; KISO, M.; NAGASHIMA, H. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. **Journal of Chromatography A**, v. 749, p. 295-299, 1996.

GOTTUMUKKALA, R. V. S. S.; NADIMPALLI, N.; SUKALA, K.; SUBBARAJU, G. V. Determination of Catechin and Epicatechin Content in Chocolates by High-Performance Liquid Chromatography. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, 5 p., 2014.

GRAMZA, A.; KHOKHAR, S.; YOKO, S.; SWIGLO, G. A.; HES, M.; KORCZAK, J. Antioxidant Activity of Tea Extracts in Lipids and their Correlation with Polyphenolic Content. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, p. 351-362, 2006.

GRYGLEWSKI, R. J.; KORBUT, R.; ROBAK, J.; SWIES, J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 317-322, 1987.

GUALBERTO, N. C. **Identificação e quantificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD em polpa de frutas de cajá-umbú (*Spondias* spp) e graviola (*Annona muricata* L.)**. 2013. 132p. Dissertação (Mestrado Ciências Agrárias) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju-SE.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Cap. 1, 5 ed., Porto Alegre / Florianópolis: Ed. UFRGS/UFSC, 2003.

GUILLAUME, Y.; GUINCHARD, C. Marked differences between acetonitrile/water and methanol/water mobile phase systems on the thermodynamic behavior of benzodiazepines in reverse phase liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 41, p. 84-87, 1995.

GUNATILAKA, A. A. L. **Triterpenoid quinine-methides and related compounds (Celastraceae)**. Blacksburg, USA, p. 2-114, 1996.

HADACEK, F. GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HAIDA, K. S.; HAAS, J.; LIMA, D. S.; HAIDA, K. Y.; SILVA, F. J.; LIMANA, S.; RODRIGUES, R. T. Atividade antioxidante e compostos fenólicos de *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 2, p. 360-368, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4 ed. Oxford: Oxford Press, 2007.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1986**. Londres: Chapman & Hall, 1994.

HARTKE, K. *Deutschers Arzneibuch 9-Kommentar*. Stuttgart: Wissenschaftliche, Frankfurt: Govi, 1989. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2007. 277p.

HASLAM, E. **Plant Polyphenols, Vegetable Tannins Revisited**. Cambridge: University Press, 1989.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HECHT, S. M. United States Patent. **Biologically active extracts from *Maytenus nemerosa* (Eckl and Zeyh) Morais (Celastraceae) South Africa and method of obtaining same**. U.S. Patent n. 4,405,613, 20 setembro 1983.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBLIYA, D. J. Flavonoids antioxidants: Chemistry, metabolism and structureactivity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HERRERA, R. M.; PEREZ, M.; MARTIN-HERRERA, D. A.; LOPEZ-GARCIA, R.; RABANAL, R. M.; ARIAS, A. Antimicrobial activity of extracts from plants endemic to the Canary Islands. **Phytotherapy research**, v. 10, n. 4, p. 364-366, 1996.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVA, M. Flavonoids - potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions**, v. 139, n. 1, p. 1-21, 2002.

HOLETZ, F. B.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J. L. Application of LC/MS and LC/NMR in the search for new bioactive compounds from plants of the Americas. In: **Medicinal Plants of the Americas**, HOSTETTMANN, K., GUPTA, M. P., MARSTON, M. (Eds), Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 391-400, 2007.

HUSSEIN, G.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAWAHATA, T.; OTAKE, T.; KAKIUCHI, N.; SHIMOTOHNO, K. Inhibitory effects of Sudanese plant extracts on HIV-1 replication and HIV-1 protease. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 1, p. 31-36, 1999.

ICH - International Conference on Harmonisation. **Q1AR2 - Stability Testing of New Drugs Substances and Products**. Food and Drug Administration, USA, 2003.

ICH – International Conference on Harmonisation. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. Food and Drug Administration, USA, 2005.

IHA, S. M.; MIGLIATOK, F.; VELLOSA, J. C. R.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B. BRUNETTII, L.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 387-393, 2008.

ISENGARD, H. D.; FÄRBER, J. M. Hidden parameters of infrared drying for determining low water contents in instant powders. **Talanta**, v. 50, p. 239-246, 1999.

ISENGARD, H. D.; PRÄGER, H. Water determination in products with high sugar content by infrared drying. **Food Chemistry**, v. 82, p. 161-167, 2003.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O; MORITA, H; TAKEYA, K. Cangorins F-J, five additional oligo-nicotinated sesquiterpene polyesters from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural products**, v. 57, p. 460-470, 1994.

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

JAIN, A. S.; SURANA, S. J. Antiulcerogenic effects of *Gymnosporia rothiana*. **Pharmacognosy magazine**. v. 5, p. 100-104, 2010.

JOFFILY, A.; VIEIRA, R. C. Anatomia foliar de *Maytenus* Mol. emend Mol. (Celastraceae), ocorrente no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 19, n. 3, 2005.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 93–100, 2004.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGUE, M. J. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 2 ed. New York: Sinauer, 2002, 576pp.

KAISER, S.; PAVEI, C.; ORTEGA, G. G. Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 300-309, 2010.

KALIX, P.; BRAENDEN, O. Pharmacological aspects of the chewing of khat leaves. **Pharmacological Reviews**, v. 37, p. 149-164, 1985.

KARORI, S. M.; WACHIRA, F. N.; WANYOKO, J. K.; NGURE, R. M. Antioxidant capacity of different types of tea products. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 19, p. 2287-2296, 2007.

KELLY, E. H; ANTHONY, R. T.; DENNIS, J. B. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

KENSIL, C. R.; SOLTYSIK, S.; WHEELER, D. A.; WU, J. Y. Structure/function studies on QS-21, a unique immunological adjuvant from *Quillaja saponaria*. In: WALLER, G.; YAMASAKI, K. (org.). **Saponins used in traditional and modern medicine**. New York: Plenum Press, p. 165-172, 1996.

KODAMA, D. H.; GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Flavonoids, total phenolics and antioxidant capacity: comparison between commercial green tea preparations. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 4, p. 1077-1082, 2010.

KUPCHAN, S. M.; KOMODA, Y.; COURT, W. A.; THOMAS, G. J.; SMITH, R. M.; KARIM, A.; GILMORE, C. J.; HALTIWANGER, R. C.; BRYAN, R. F. Maytansine, a novel antileukemic ansamacrolide from *Maytenus ovatus*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 94, p. 1354-1356, 1972.

KUPCHAN S M ; KOMODA, Y.; BRANFMAN, A. R.; SNEDEN, A. T.; COURT, W. A.; THOMAS, G. J.; HINTZ, H. P. J.; SMITH, R. M.; KARIM, A.; HOWIE, G. A.; VERMA, A. K.; NAGAO, Y.; DAILEY JR, R. G.; ZIMMERLY, V. A.; SUMNER JR, W. C. The maytansinoids. Isolation, structural elucidation, and chemical interrelation of novel ansamacrolides. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 14, p. 2349-2357, 1977.

KUETE, V.; KAMGA, J.; SANDJO, L. P.; NGAMENI, B.; POUMALE, H. M. P.; AMBASSA, P.; NGADJUI, B. T. Antimicrobial activities of the methanol extract, fractions and compounds from *Ficus polita* Vahl. (Moraceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 6, p. 01-06, 2011 .

LÄTTIG, J.; BÖHL, M.; FISCHER, S.; TIETBÖHL, C.; MENSCHIKOWSKI, M.; GUTZEIT, H. O.; METZ, P.; PISABARRO, M. T. Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A2 by flavonoids: rationale for lead design. **The Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 21, n. 8, p. 473-483, 2007.

LEE, K. H.; NOZAKI, H.; HALL, I. H.; KASAI, R.; HIRAYAMA, T.; SUZUKI, H.; HUANG, H. C. Antitumor agents 60. Maytansine, an antileukemic principle from *Maytenus diversifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 4, p. 509-510, 1982.

LEITE, J. P. V.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H.; PIZZA, C. Isolation and HPLC quantitative analysis of Flavonoid glycosids from Brazilian beverages *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3796-3801, 2001.

LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I.; ROUTABOUL, J. M.; BAUDRY, A.; POURCEL, L.; NESI, N.; CABOCHE, M. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 405-430, 2006.

LI, D.; MARTINI, N.; WU, Z.; WEN, J. Development of an isocratic HPLC method for catechin quantification and its application to formulation studies. **Fitoterapia**, v. 83, n. 7, p. 1267-1274, 2012.

LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS FILHO, P. R.; GOUVEIA, C. M. C. P. In vitro evaluation of the antioxidant activity of the hydroalcoholic extract of leaves of bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 531-536, 2006.

LIMA, L. M. Z. **Influência da luz na composição fenólica, atividade antioxidante e concentração de carbamato de etila em aguardentes de cana/cachaças envelhecidas em diferentes madeiras**. 2012. 219p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; SIDELMANN, U. G.; WILSON, I. D. Directly coupled HPLC-NMR and its application to drug metabolism. **Drug Metabolical Review**, v. 29, p. 705, 1997.

LINSEY, K. L.; BUDESINSKY, M.; KOHOUT, L.; VAN STADEN, J. Antibacterial activity of maytenonic acid isolated from the root-bark of *Maytenus senegalensis*. **South African Journal of Botany**, v. 72, n. 3, p. 473-477, 2006.

LLESUY, S. F. Introduccinón y species activas de oxígeno. In: MARRONI, N. P. **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas, RS: Editora da Ulbra, p. 21-32, 2002.

LOPES, F. F. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de extratos e constituintes das folhas de *Maytenus distichophylla* (Celastraceae)**. 2014. 119p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG.

LUCA, C.; MONACHE, F. D.; MARINI-BETTOLO, G. B. Triterpenoid quinones of *Maytenus obtusifolia* and *Maytenus boaria*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 9, p. 208-209, 1978.

LUO, D. Q.; WANG, H.; TIAN, X.; SHAO, H. J.; LIU, J. K. Antifungal properties of pristimerin and celastrol isolated from *Celastrus hypoleucus*. **Pest Management Science**, v. 6, p. 85-90, 2005.

MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 73-105, 2012.

MAGALHÃES, C. G.; FERRARI, F. C.; GUIMARÃES, D. A.; SILVA, G. D.; DUARTE, L. P.; FIGUEIREDO, R. C.; SIDNEY FILHO, A. V. *Maytenus salicifolia* Reissek, Celastraceae: triterpenes isolated from stems and antioxidant property of extracts from aerial parts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 415-419, 2011.

MAIA, B. L.; LIMA, B. S.; VASCONCELLOS, M. C. Avaliação da atividade hemolítica, coagulante e antiagregante plaquetária do extrato seco da casca de *Maytenus guianensis*. **Anais da 61ª Reunião Anual da SBPC**. Universidade Federal do Amazonas, Manaus – AM, 2009.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 233-252, 2004.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 538-544, 1998.

MARINI-BETTOLO, G. B. Chemistry of the active principles of Celastraceae. **Farmaco Science**, v. 29, p. 551-568, 1974.

MARRONI, N. P. **Estresse oxidativo e antioxidante**. Canoas, RS: Editora da Ulbra, 2002.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M. de; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 220p.

MEDEIROS, V. M.; FILHO, J. G. S.; LUCIO, A. S. S. C.; TAVARES, J. F.; MAIA, G. L. A.; LIMA, E. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from leaves of *Maytenus obtusifolia* Mart. (Celastraceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 466-469, 2010.

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**; SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P., (orgs.). 3 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. UFRGS/UFSC, 2001.

MELO, J. G.; MARTINS, J. D. G. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 27-36, 2007.

MENDONÇA, D. L. **Validação de métodos para determinação de 1-hidroxipireno em bílis de peixes**. 2008. 142p. Dissertação (Mestrado em Química) – PUC-Rio, Rio de Janeiro – RJ.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MILLER, J. N. Basic statistical methods for Analytical Chemistry: Part 2. Calibration and regression methods. **Analyst**, v. 116, p.3-14, 1991.

MIN, G.; CHUN-ZHAO, L. Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 1461-1463, 2005.

MISHRA, A.; SHARMA, A. K.; KUMAR, S.; SAXENA, A. K.; PANDEY, A. K. Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant and anticancer activities, **BioMed Research International**, v. 2013, 10p, 2013.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S., Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. On pregnant mice. **Contraception**, v. 65, p. 171-175, 2002.

MORITA, H.; HIRASAWA, Y.; MUTO, A.; YOSHIDA, T.; SEKITA, S.; SHIROTA, O. Antimitotic quinoid triterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 18, n. 3, p. 1050-1052, 2008.

MOSSI, A. J.; MAZUTTI, M. A.; CANSIAN, R. L.; DE OLIVEIRA, D.; DE OLIVEIRA, J. V.; DALLAGO, R.; LEONTIEV-ORLOV, O.; TREICHEI, H.; ECHEVERRIGARAY, S.; DO NASCIMENTO FILHO, I. Variabilidade química de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis de populações nativas de *Maytenus ilicifolia*. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1067-1070, 2010.

MOTA, K. S. L. **Atividade antiulcerogênica de *Maytenus obtusifolia* Mart (Celastraceae) em modelos animais**. 2009. 149p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB.

MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. **Pharmaceutics**, v. 3, p. 793-829, 2011.

MURAYAMA, T.; EIZURU, Y.; YAMADA, R.; SADANARI, H.; MATSUBARA, K.; RUKUNG, G.; TOLO, F. M.; MUNGAI, G. M.; KOFI-TSEKPO, M. Anticytomegalovirus activity of pristimerin, a triterpenoid quinone methide isolated from *Maytenus heterophylla* (Eckl. & Zeyh.). **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 18, p. 133-139, 2007.

MURRAY, M. T. Quercetin: Nature's antihistamine. **Better Nutrition**, v. 60, n. 4, 10p.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p.1523-1542, 2006.

NAKAJIMA, J. I.; TANAKA, Y.; YAMAZAKI, M. SAITO, K. Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3-glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 28, p. 25797-25803, 2001.

NAKAO, H.; SENOKUCHI, K.; UMEBAYASHI, C.; KANEMARU, K.; MASUDA, T.; OYAMA, Y.; YONEMORI, S. Cytotoxic activity of maytanprine isolated from *Maytenus diversifolia* in human leukemia K562 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1236-1240, 2004.

NARAYANA, K. R.; REDDY, S. R.; CHALUVADI, M. R.; KRISHNA, D. R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 33, p. 2-16, 2001.

NARUMI, K.; SONODA, J.; SHIOTANI, K.; SHIGERU, M.; SHIBATA, M.; KAWACHI, A.; TOMISHIGE, E.; SATO, K.; MOTOYA, T. Simultaneous detection of green tea catechins and gallic acid in human serum after ingestion of green tea tablets using ion-pair high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, v. 945-946, n. 15, p. 147-153, 2014.

NASCIMENTO, V. T.; LACERDA, E. U.; MELO, J. G.; LIMA, C. S. A.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 56-64, 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 7 ed. Villanova. Pennsylvania: NCCLS, 2000.

NIERO, R.; MAFRA, A.P.; LENZI, A.C., CECHINEL FILHO, V.; TISCHER, C. A.; MALHEIROS, A.; DE SOUZA, M. M.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F. A new triterpene with antinociceptive activity from *Maytenus robusta*. **Natural Product Research**, v. 20, p. 1315-1320, 2006.

NIERO, R.; ANDRADE, S. F.; CECHINEL FILHO, V. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus* genus. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 18, p. 1851-1871, 2011.

NOGUEIRA, L. G. **Determinação do potencial biológico e antioxidante de extratos de casca de raiz de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae)**. 2009. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP.

NOLDIN, V. F.; ISAIAS, D. B.; CECHINEL FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: importância clínica e farmacológica. **Química Nova**, v. 29, p. 549-54, 2006.

NOZAKI, H.; SUZUKI, H.; HIRAYAMA, T.; KASAI, R.; WU, R. Y.; LEE, K. H. Antitumour triterpenes of *Maytenus diversifolia*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 479-485, 1986.

NUNES, G. P.; SILVA, M. F.; RESENDE, U. M.; SIQUEIRA, J. M. Plantas medicinais comercializadas no centro de Campo Grande - MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 83-92, 2003.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 718-723, 2008.

NUÑEZ, M. J.; REYES, C. P.; JIMÉNEZ, I. A.; MOUJIR, L.; BAZZOCCHI, I. L. Lupane triterpenoids from *Maytenus* species. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 7, p. 1018-1021, 2005.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, D. M.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; VIEIRA-FILHO, S. A. Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 661-665, 2006.

OLIVEIRA, D. R.; COSTA, A. L. M. A.; LEITÃO, G. G.; CASTRO, N. G.; SANTOS, J. P.; LEITÃO, S. G. Estudo etnofarmacognóstico da saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke), uma planta medicinal usada por comunidades quilombolas do Município de Oriximiná-PA, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 383-392, 2011.

ONDO, J. P.; OBAME, L. C.; ANDZI BARHÉ, T.; NSI AKOUE, G.; NSI EMVO, E.; LEBIBI, J. Phytochemical screening, total phenolic content and antiradical activity of *Asplenium africanum* (Aspleniaceae) and fruit of *Megaphrinium macrostachyum* (Marantaceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 8, p. 92-96, 2013.

ORABI, K. Y.; AL-QASOUMI, S. I.; EL-OLEMY, M. M.; MOSSA, J. S.; MUHAMMAD, I. Dihydroagarofuran alkaloid and triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Maytenus arbutifolia*. **Phytochemistry**, v. 58, p.475-480, 2001.

OVASKAINEN, M.; TORRÖNEN, R.; KOPONEN, J. M.; SINKKO, H.; HELLSTRÖM, J.; REINIVUO, H.; MATTILA, P. Dietary Intake and Major Food Sources of Polyphenols in Finnish Adults. **Journal of Nutrition**, v. 138, p. 562-566, 2008.

PAN, M. H.; LAI, C. S.; HO, C. T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food and Function**, v. 1, n. 1, p. 15-31, 2010.

PANDEY, A. K.; MISHRA, A. K.; MISHRA, A. Antifungal and antioxidative potential of oil and extracts derived from leaves of Indian spice plant *Cinnamomum tamala*. **Cellular and Molecular Biology**, v. 58, p. 142-147, 2012.

PASCOAL, A. C. R. F.; EHRENFRIED, C. A.; EBERLIN, M. N.; STEFANELLO, M. E.; SALVADOR, M. J. Free-radical scavenging activity, determination of phenolic compounds and HPLC-UV/DAD/ESI-MS profile of *Campomanesia adamantium* leaves. **Natural Product Communications**, v. 6, p. 969-972, 2011.

PENG, I. W.; KUO, S. M. Flavonoid structure affects the inhibition of lipid peroxidation in Caco-2 intestinal cells at physiological concentrations. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 7, p. 2184-2187, 2003.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, v. 64, p. 227-229, 2002.

PERESTELO, N. R.; JIMENÉZ, I. A.; TOKUDA, H.; HAYASHI, H.; BAZZOCHI, I. L.. Sesquiterpenes from *Maytenus jelskii* as potential cancer hemopreventive agents. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 127-132, 2010.

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

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B.: Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.

POPA, V. I.; DUMITRU, M.; VOLF, I.; ANGHEL, N. Lignin and polyphenols as allelochemicals. **Industrial Crops and Products**, v. 27, p. 144-149, 2008.

PRASAD, S. K.; LALOO, D.; KUMAR, M.; HEMALATHA, S. Antidiarrhoeal evaluation of root extract, its bioactive fraction, and lupinifolin isolated from *Eriosema chinense*. **Planta Medica**, v. 79, n. 17, p. 1620-1627, 2013.

PULLEN, C. B.; SCHMITZ, P.; HOFFMANN, D.; MEURER, K.; BOETTCHER, T.; BAMBERG, D. V.; PEREIRA, A. M.; FRANÇA, S. DE C.; HAUSER, M.; GEERTSEMA, H.; WYK, A. V.; MAHMUD, T.; FLOSS, H. G.; LEISTNER, E. Occurrence and non-detectability of maytansinoids in individual plants of the genera *Maytenus* and *Putterlickia*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 377-387, 2003.

RADOMSKI, M. I. **Teores foliares de silício, taninos e lignina, em *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss (Espinheira-Santa), em função de variáveis ambientais e genéticas.** 2006. 116p. Tese (Doutorado em Agronomia) – UNESP, Botucatu – SP.

RAO, T. P.; LEKH, R. J.; TAKADO, Y. Green Tea Catechins against Oxidative Stress of Renal Diseases: In: **Protective Effects of Tea on Human Health.** JAIN, N. K.; SIDDIQI, M. A.; WEISBURGER, J. H. v. 2, p. 109-119. London: CAB. 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke - Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. INPA-DFID, Manaus, 800p, 1999.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RIJKE, E. D.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOJER, C.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 31-63, 2006.

ROCHA, C. S.; PIMENTEL, R. M. M.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S. Morfoanatomia de folhas de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae); uma espécie utilizada como medicinal no nordeste do Brasil. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, p. 472-476, 2004.

RODRIGUES, V. G.; DUARTE, L. P.; SILVA, G. D.; SILVA, F. C.; GÓES, J. V.; TAKAHASHI, J. A.; VIEIRA FILHO, S. A. Evaluation of antimicrobial activity and toxic potential of extracts and triterpenes isolated from *Maytenus imbricata*. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1375-1380, 2012.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B. SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado técnico online**, v. 127, p. 1-4, 2007.

SAIJO, R.; TAKEDA, Y. HPLC analysis of catechins in various kinds of green teas produced in Japan and abroad. **Journal of Japanese Society for Food Science and Technology**, v. 46, n. 3, p. 138-147, 1999.

SAITO, K.; SAKAKIBARA, K. Y.; NAKABAYASHI, R.; HIGASHI, Y.; YAMAZAKI, M.; TOHGE, T.; FERNIE, A. R. The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: Structural and genetic diversity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 21-34, 2013.

SALAZAR, G. D. M.; DUARTE, L. P.; VIEIRA-FILHO, A. S.; SILVA, G. D. F.; LULA, I. S. *Maytenus truncata* reiss - chemical constituents. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 1001, n. 105, 2001.

SANDHAR, H. K.; KUMAR, B.; PRASHER, S.; TIWARI, P.; SALHAN, M.; SHARMA, P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, p. 25-41, 2011.

SANNOMIYA, M., VILEGAS, W., RASTRELLI, L., PIZZA, C. A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*, **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 237-239, 1998.

SANTOS, V. L.; COSTA, V. B. M.; AGRA, M. F.; SILVA, B. A.; BATISTA, L. M. Pharmacological studies of ethanolic extracts of *Maytenus rigida* Mart (Celastraceae) in animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, 2007.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SASAKI, Y.; NAGANO, Y. Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, p.1175-1184, 2004.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SCHEWE, T.; KÜHN, H.; SIES, H. Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 7, p. 1825-1829, 2002.

SHABIR, G. A. Validation of HPLC methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the U.S. Food and Drug Administration, the U.S. Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1-2, p. 57-66, 2003.

SHARMA, V.; GULATI, A.; RAVINDRANATH, S. D.; KUMAR, V. A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 583-594, 2005.

SHEMER, A. **Kit for treating skin infection**. U.S. Patent Application 12/296,280, 10 abril de 2007.

SHENG-DING, F.; BERRY, D. E.; LYNN, D. G.; HECHT, S. M.; CAMPBELL, J.; LYNN, W. S. The chemistry of toxic principles from *Maytenus nemerosa*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 3, p. 631-633, 1984.

SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; IITAKA, Y. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchhuasca*. **Journal of Natural Products**, v.57, n. 12, p. 1675-1681, 1994.

SICHEL, G.; CORSARO, C.; SCALIA, M.; DI BILIO, A. J.; BONOMO, R. P. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂⁻. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 1991.

SILVA, S. R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA, L. H. O.; MARTINS, M. V. **Plantas Medicinais no Brasil: aspectos Gerais sobre legislação e comércio**. 2001.

Disponível

em:

http://cncflora.jbrj.gov.br/plataforma2/arquivos/biblio/4f3e5444db87c_Suelma%20Ribeiro%20Silva%20et%20al%202001.pdf. Acesso em 26 fev de 2014.

SILVA, J. L.; SILVA, R. P.; JORGE, R. M.; FATIMA SILVA, G. D.; VIEIRA FILHO, S. A.; FONSECA, A. P. N. D.; TAGLIATI, C. A. Avaliação da atividade antiulcerogênica da *Maytenus truncata* Reiss (Celastraceae). **The Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, p. 30-35, 2005.

SILVA, M. S.; SOUSA, D. P.; MEDEIROS, V. M.; FOLLY, M. A. B.; TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* mart. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 500-503, 2008.

SILVA, G. D. F.; SILVA, S. R. S.; BARBOSA, L. C. A.; DUARTE, L. P.; RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; VIEIRA FILHO, S. A.; OLIVEIRA, M. L. R. Antioxidant activity of *Maytenus imbricata* Mart. Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 530-536, 2009.

SILVA, F. C.; DUARTE, L. P.; SILVA, G. D.; LULA, I. S.; TAKAHASHI, J. A.; SALLUM, W. S. Chemical constituents from branches of *Maytenus gonoclada* (Celastraceae) and evaluation of antimicrobial activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 943-949, 2011.

SILVA, F. C.; BUSATTI, H. G.; GOMES, M. A.; DUARTE, L. P.; SILVA, G. D. F.; VIEIRA FILHO, S. A. Antigiardial activity of the hexane extract of *Maytenus gonoclada* Mart. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 1, p. 638-639, 2012.

SILVEIRA, P.; BANDEIRA, M.; ARRAIS, P. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **The Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SIMMONS, M. P.; CAPPA, J. J.; ARCHER, R. H.; FORD, A. J.; EICHSTEDT, D.; CLEVINGER, C. C. Phylogeny of the Celastreae (Celastraceae) and the relationships of *Catha edulis* (qat) inferred from morphological characters and nuclear and plastid genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, p. 745-757, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2007.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman (SBQ), p. 598-676, 2002.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 800p.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 957 p.

SOARES, L. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de Lippia Alba (Miller) N. E. Brown Britt. & Wills (falsa-melissa) – Verbenaceae**. 2001. 189p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC.

SOLTYSIK, S.; WU, J. Y.; RECCHIA, J.; WHEELER, D. A.; NEWMAN, M. J.; COUGHLIN, R. T.; KENSIL, C. R. Structure/function studies of QS-21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function. **Vaccine**, v. 13, p. 1403-1410, 1995.

SOSA, S.; MORELLI, C. F.; TUBARO, A.; CAIROLI, P.; SPERANZA, G.; MANITTO, P. Antiinflammatory activity of *Maytenus senegalensis* root extracts and of maytenoic acid. **Phytomedicine**, v. 14, p. 109-114, 2007.

SOUSA, D. P. **Fitoquímica das raízes de *Maytenus obtusifolia* Mart.(Celastraceae) e caracterização de sua atividade no sistema nervoso central**. 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB.

SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N. Neuroleptic-Like properties of the chloroform extract of *Maytenus obtusifolia* mart. roots. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 224-225, 2005.

SOUSA, R. I. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Capítulo 16, 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/UFSC, p. 403, 2007.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. S.; ARAÚJO, D. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.

SOUZA-FOMIGONI, M. L. O.; OLIVEIRA, M. G.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, p. 21-27, 1991.

SPAGOLLA, L. C.; SANTOS, M. M.; PASSOS, L. M. L.; AGUIAR, C. L. Extração alcoólica de fenólicos e flavonoides totais em mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 187-191, 2009.

SPIVEY, A. C.; WESTON, M.; WOODHEAD, S. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 31, p. 43-59, 2002.

STANKOVIC, M. S. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. **Kragujevac Journal of Science**, v. 33, p. 63-72, 2011.

STRATIL, P.; KUBAN, V.; FOJTOVÁ, J. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. **Czech Journal of Food Science**, v. 26, n. 4, p. 242-253, 2008.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, São Paulo, v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.

TANNER, G. J.; FRANCKI, K. T.; ABRAHAMS, S.; WATSON, J. M.; LARKIN, P. J.; ASHTON, A. R. Proanthocyanidin biosynthesis in plants: purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 34, p. 31647-31656, 2003.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, p. 1089-1099, 2008.

TEIXEIRA, A. G. **Extratos secos em leite de jorro das folhas de *Maytenus ilicifolia*: Elaboração de formulações tópicas, caracterização química e avaliação da atividade antioxidante**. 2013. 88p. Dissertação (Mestrado em Biociências e tecnologia de produtos bioativos) – UNICAMP, Campinas – SP.

THEOHARIDES, T. C.; ALEXANDRAKIS, M.; KEMPURAJ, D.; LY TINAS, M. Anti-inflammatory actions of flavonoids and structural requirements for new design. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**. v. 14, n. 3, p. 119-127, 2001.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TIBERTI, L. A.; YARIWAKE, J. H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenis ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p.378-384, 2007.

TIN-WA, M.; FARNSWORTH, N. R.; FONG, H. H. S; BLOMSTER, R. N.; TROJANEK, J.; ABRAHAM, D. J.; PERSINOS, G. J.; DOKOSI, O.B. Antitumor activity of *Maytenus senegalensis* (Celastraceae) and a preliminary phytochemical investigation. **Lloydia**, v. 34, n. 1, p. 79-87, 1971.

TSUCHIYA, H. Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. **Food Chemistry**, v. 120, p. 1089-1096, 2010.

TUCKMANTEL, W.; KOZIKOWSKI, A. P.; ROMANCZYK JR., L. J. Studies in Polyphenol Chemistry and Bioactivity. 1. Preparation of Building Blocks from (+)-Catechin. Procyanidin Formation. Synthesis of the Cancer Cell Growth Inhibitor, 3-O-Galloyl-(2*R*,3*R*)-epicatechin-4 β ,8-[3-O-galloyl-(2*R*,3*R*)-epicatechin]. **Journal of the American Chemical Society**. v. 121, n. 51, p. 12073-12081, 1999.

VALLADÃO, F. N.; MIRANDA, R. R. S.; VALE, F. H.; VALLADÃO, S. A.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; CARVALHO-OKANO, R. M.; MESSIAS, M. C. T. B.; VIEIRA FILHO, S. A. Four Brazilian *Maytenus salicifolia* Reissek (Celastraceae) groups studied by TLC and UV/Vis spectrophotometry. **The Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 733-739, 2009.

VELAZQUEZ, C.; CAZALDA, F.; ESQUIVEL, B.; BARBOSA, E.; CALZADA, S. Antisecretory activity from the flowers of *Chiranthodendron pentadactylon* and its flavonoids on intestinal fluid accumulation induced by *Vibrio cholerae* toxin in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 455-458, 2009.

VELLOSA, J. C.; KHALIL, N. M.; FORMENTON, V. A.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia**, v. 77, p. 243-244, 2006.

VIAL, J.; JARDY, A. Validation de méthodes et outils chimiométriques associées. **Spectra Analyse**, v. 268, p. 42-49, 2009.

VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARRERO, E. J. Os Produtos Naturais e a química Medicinal Moderna, **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VILEGAS, W.; SANOMMIYA, M.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves: evaluation of the antiulcer activity of the infusion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 403-406, 1999.

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

WELFORD, R. W.; TURNBULL, J. J.; CLARIDGE, T. D.; PRESCOTT, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Evidence for oxidation at C-3 of the flavonoid C-ring during anthocyanin biosynthesis. **Chemical Communications**, v. 18, p. 1828-1829, 2001.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Serial review: Flavonoids and isoflavonones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism and Bioactivity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, p. 838-849, 2004.

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of Peruvian rainforest with a particular emphasis on Una de gato and Sangre de gado. **Alternative Medicine Review**, v. 6, n. 6, p. 567-579, 2001.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 485-493, 2001.

WOLFENDER, J. J.; HOSTETTMANN, K. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry to the investigation of medicinal plants. In: **Phytochemistry of Medicinal Plants**, ARNASON, J. T., MATA, R., ROMEO, J. (Eds), Plenum Press, New York, p. 189, 1995.

WOLLENWEBER, E.; DIETZ, V. H. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. **Phytochemistry**, v. 20, n. 5, p. 869-932, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants**. Geneve, v. 1, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Traditional medicines: Global situation, issues and challenges**. Geneve, 2011.

WU, P.; MA, G.; LI, N.; DENG, Q.; Yin, Y.; HUANG, R. Investigation of in vitro and in vivo antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. **Food Chemistry**, v. 173, p. 194-202, 2015.

YAMAMOTO, H. C.; PINTO, A. J. T.; MEURER, M. V.; CARVALHO, M. A.; REZENDE, P. Controle de qualidade microbiológico de produtos farmacêuticos, cosméticos e fitoterápicos produzidos na zona da mata, MG. **Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária**, 2004.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 113-122, 2004.

YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; CAPPELARO, E. A.; VASCONCELOS, E. C.; TIBERTI, L. A.; PEREIRA, A. M. S.; FRANCA, S. C. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 162-168, 2005.

YAYABE, F.; KINUGASA, H.; TAKEO, T. A simple preparative chromatographic separation of green tea catechins. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, v. 63, n. 4, p. 845-847, 1989.

YOSHIMURA, I.; YASUHIRO, K.; YOSHICAZU, Y.; HUNECK, S.; YASUYUKI, Y. Analysis of secondary metabolites from lichen by high performance liquid chromatography with a photodiode-array detector. **Phytochemical Analysis**, v. 5, p. 197, 1994.

YUAN, L.; WANG, L.; HAN, Z.; JIANG, Y.; ZHAO, L.; LIU, H.; YANG, L.; LUO, K. Molecular cloning and characterization of PtrLAR3, a gene encoding leucoanthocyanidin reductase from *Populus trichocarpa*, and its constitutive expression enhances fungal resistance in transgenic plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 7, p. 2513-2524, 2012.

ZHAO, C.; LI, C.; LIU, S.; YANG, L. The Galloyl Catechins Contributing to main antioxidant capacity of tea made from *Camellia sinensis* in China. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

ZHU, N.; WANG, M.; WEI, G. N.; LIN, J.; YANG, S. C. Identification of reaction products of epigallocatechin, epigallocatechingallate and pyragallol with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazylradical. **Food Chemistry**, v. 73, p. 345-349, 2001.