

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

José Luiz Neves de Aguiar

**CONTRIBUIÇÕES PARA A AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS MEDICAMENTOS  
FITOTERÁPICOS NO BRASIL**

Rio de Janeiro

2014

José Luiz Neves de Aguiar

**CONTRIBUIÇÕES PARA A AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS MEDICAMENTOS  
FITOTERÁPICOS NO BRASIL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária

Orientadores: Dr. Josino Costa Moreira

Dr<sup>a</sup>. Paola Cardarelli Leite

Rio de Janeiro

2014

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Aguiar, José Luiz Neves de

Contribuições para a avaliação da qualidade dos medicamentos fitoterápicos no Brasil / José Luiz Neves de Aguiar. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2014.

213 f.: il.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)– Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, 2014.

Orientadores: Josino Costa Moreira e Paola Cardarelli Leite

1. Medicamentos Fitoterápicos. 2. Controle de Qualidade. 3. Vigilância Sanitária. I. Título

Contributions to the quality assessment of herbal medicines in Brazil

José Luiz Neves de Aguiar

**CONTRIBUIÇÕES PARA A AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS MEDICAMENTOS  
FITOTERÁPICOS NO BRASIL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária

Aprovado em 04/06/2014

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Victor Augustus Marin (Doutor)  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

---

Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy (Doutor)  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

Dr. André Luis Mazzei Albert (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Dr. Josino Costa Moreira (Doutor) – Orientador  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Dr<sup>a</sup>. Paola Cardarelli Leite (Doutora) – Orientador  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

*Dedico este trabalho  
à todas as pessoas que tentam melhorar  
a Saúde e a Educação deste País.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Direção do INCQS que desde 2001 tornaram o ensino e a pesquisa uma das prioridades institucionais, possibilitando assim o apoio dado ao meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da FIOCRUZ.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Meu Deus, eu te agradeço por ter me guiado e auxiliado em todos os momentos da minha vida e, principalmente, por me dar forças, perseverança e estímulo.

Aos meus orientadores Dr. Josino Costa Moreira e a Dr<sup>a</sup>. Paola Cardarelli Leite pela orientação, idéias e incentivo.

Aos membros da comissão examinadora, por aceitarem participar da banca e pelas sugestões que contribuíram para a qualidade deste trabalho.

Ao chefe do Departamento de Química Felipe e ao chefe de Setor Tiago pelo incentivo.

Ao meu amigo André Luís Mazzei Albert pela orientação sobre o conhecimento de química, vinculada a análises de medicamentos.

Aos amigos do grupo de medicamentos: Marcio Labastie (in memoriam), Maria Virginia, Mariete, Lenilson, Antenor, Solange, Maria do Carmo, Sinéia, Euclides, Amanda, Letícia, Lílian, André Colonese, Luciana, Claudia e Rosangela pelos momentos descontraídos.

A Dr<sup>a</sup>. Regina Branquinho, a Doutoranda Renata Trotta e a Especialista Luiza Cabral do Laboratório de Biologia Molecular do INCQS pela colaboração.

A Dr<sup>a</sup>. Yara Britto responsável pelo Horto do Jardim Botânico do Rio de Janeiro pelas amostras de material vegetal.

Ao Dr. Reinaldo Santos Shimabuku Jr. responsável pelo Horto Refúgio Biológico Bela Vista do Paraná pela amostra de material vegetal.

Aos funcionários da biblioteca, secretarias e amigos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, agradeço pela atenção e apoio.

A minha esposa Rosângela pela paciência.

*“Se eu pudesse deixar algum presente a você,  
Deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres  
humanos.  
A consciência de aprender tudo que foi ensinado pelo tempo  
afora.  
Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais  
repetissem.  
A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se  
pudesse, o respeito àquilo que é indispensável.  
Além do pão, o trabalho.  
Além do trabalho, a ação.  
E, quando tudo mais faltasse, um segredo:  
o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para  
encontrar a saída”.*

Mahatma Gandhi



## RESUMO

O desenvolvimento de metodologia altamente discriminatória para a identificação e caracterização das espécies de plantas medicinais regulamentadas pelo sistema público de saúde brasileiro (SUS) é de suma importância para o controle de qualidade destas espécies como matérias-primas na produção de medicamentos fitoterápicos, conseqüentemente, minimizar o risco sanitário para o consumidor. No primeiro estudo foi utilizado o método RAPD-PCR para a elaboração de um perfil genético de três espécies diferentes de plantas medicinais regulamentadas pelo SUS do Brasil: *Mikania glomerata* Sprengel, *Maytenus ilicifolia* (Schrad) Planch e *Schinus terebenthifolia* Raddi, a partir de exemplares destas plantas, que foram cedidas pela Coleção Temática de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, os perfis resultantes permitiram a identificação eficiente das espécies diferentes. No segundo estudo o método RAPD-PCR foi utilizado para a elaboração de um perfil de fragmentos de DNA (“fingerprint”) de *Mikania glomerata* coletadas no Horto Refúgio Biológico Bela Vista no Paraná e a cedida pela Coleção Temática de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico no Rio de Janeiro, os perfis resultantes permitiram a caracterização eficaz das duas plantas de mesma espécie de origem diferente (PR e RJ). No terceiro estudo foi desenvolvido um sistema de extração em água das plantas do primeiro estudo com detecção em CLAE-UV/VIS que gerou um perfil químico de cada planta, os perfis resultantes permitiram a identificação eficiente das três espécies diferentes.

**Palavras-chave:** Fitoterápicos, Controle de Qualidade, Perfis genético, Perfis químico

## ABSTRACT

The development of a highly discriminatory method for the identification of genotypes and species of medicinal plants regulated by the public Brazilian health system (SUS) is of paramount importance for quality control of these species as raw material in the production of herbal medicines, to consequently minimize the health risks to the consumer. We used RAPD-PCR method to generate a genetic profile of three species of medicinal plants regulated by SUS in Brazil. *Mikania glomerata* Sprengel, *Maytenus ilicifolia* (Schrad)Planch e *Schinus terebenthifolia* Raddi, from specimens of these plants, which were donated by Theme Collection of Medicinal Plants of the Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, the profiles generated allowed the effective discrimination of the species. In the second study, the RAPD-PCR method was used to prepare a profile of DNA fragments ("fingerprint") of *Mikania glomerata* collected in Horto Refúgio Biológico Bela Vista no Paraná and courtesy Theme Collection of Medicinal Plants of the Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, the resulting profiles allowed the effective characterization of two plants of the same species of different origin (PR and RJ). In the third study we developed a system of water extraction plant of the first study with detection in HPLC-UV/VIS generating a chemical profile of each plant, the resulting profiles allowed the efficient identification of three different species.

**Key words:** Herbal Medicines, Quality Control, Genetic profiles, Chemical profiles

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CG - Cromatografia gasosa

DAD - Detector de arranjos de diodos

DIC - Detector de ionização de chama

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DOU – Diário Oficial da União

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

ICH – International Conference on Harmonisation's

INCQS – Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LACENS – Laboratórios Centrais de Saúde Pública

RE – Resolução Específica

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

USP - United States Pharmacopoeia - Farmacopéia Americana

UV/VIS – Ultravioleta/visível

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b>	Regulamentação federal criada pela ANVISA para o controle da qualidade dos medicamentos fitoterápicos industrializados e insumos farmacêuticos.....	39
<b>Tabela 02</b>	Sequência de bases dos 60 iniciadores usados no trabalho (Operon Technology and Life Biosynthesis Incorporated).....	66
<b>Tabela 03</b>	Marcadores químicos utilizados no estudo .....	72
<b>Tabela 04</b>	Concentrações das soluções estoque e a da diluição de trabalho dos marcadores utilizados .....	74
<b>Tabela 05</b>	Concentrações do material vegetal (em água).....	76
<b>Tabela 06</b>	Volumes das soluções estoques dos marcadores adicionados aos extratos do estudo.....	78
<b>Tabela 07</b>	Concentrações das soluções estoque e a da diluição de trabalho dos marcadores utilizados.....	79
<b>Tabela 08</b>	Concentrações dos marcadores na mistura (MIX pad).....	80
<b>Tabela 09</b>	Concentrações equivalentes aos volumes injetados da mistura de marcadores (MIX pad) utilizados na preparação da curva.....	81
<b>Tabela 10</b>	Concentrações do material vegetal (em acetonitrila) do estudo.....	83
<b>Tabela 11</b>	Concentrações do material vegetal (em tolueno) do estudo.....	83
<b>Tabela 12</b>	Gradiente utilizado no método 1.....	84
<b>Tabela 13</b>	Gradiente utilizado no método 2.....	85
<b>Tabela 14</b>	Número de fragmentos obtidos do RAPD-PCR (entre 100-1500 pb) das 3 espécies de plantas medicinais e os 60 iniciadores do estudo. Guaco (G), Espinheira-santa (E) e aroeira-da-praia (A).....	96

<b>Tabela 15</b>	Matriz dos fragmentos que foram gerados pelos iniciadores selecionados para a elaboração do perfil (fingerprint) entre 200 e 1100 pb. Coeficientes de similaridade Sorensen-Dice (%SD); Dissimilaridade (%D); Dissimilaridade média (%D <sub>m</sub> ). Guaco (G), Espinheira-santa (E) e Aroeira-da-praia (A).....	100
<b>Tabela 16</b>	Matriz dos fragmentos entre 200 e 1100 pb que foram gerados pelos iniciadores selecionados (Figura 1). Ausência de fragmento (0), presença de um fragmento (1). Presença de dois fragmentos 1,1 (2), presença de três fragmentos 1,1,1 (3) e presença de quatro fragmentos 1,1,1,1 (4).....	106
<b>Tabela 17</b>	Coeficientes de similaridade Jaccard (%J); Sorensen-Dice (%SD); Ochiai (%O); Kulczynski 2 (%K2). A dissimilaridade (%D); Variação máxima entre SD, O e K2 (%V); Diferença entre J e SD (%J-SD). Sendo a=1,1; b=1,0; c=0,1 e d=0,0.....	107
<b>Tabela 18</b>	Comparação da eficiencia (%) da extração da planta guaco (MGJB).....	121
<b>Tabela 19</b>	Determinação da recuperação e do teor (estimado) de cumarina nas preparações do estudo do guaco (MGJB).....	123
<b>Tabela 20</b>	Eficiencia (%) da extração de ácido gálico.....	136
<b>Tabela 21</b>	Eficiencia (%) da extração de isoquercitrina.....	136
<b>Tabela 22</b>	Determinação da recuperação e do teor (estimado) de ácido gálico nas preparações do estudo da aroeira (STJB).....	139
<b>Tabela 23</b>	Determinação da recuperação e do teor (estimado) de isoquercitrina nas preparações do estudo da aroeira (STJB).....	139
<b>Tabela 24</b>	Eficiencia (%) da extração de catequina.....	156
<b>Tabela 25</b>	Eficiencia (%) da extração de epicatequina.....	156
<b>Tabela 26</b>	Eficiencia (%) da extração de rutina.....	156
<b>Tabela 27</b>	Determinação da recuperação e do teor (estimado) de catequina nas preparações do estudo da espinheira (MIJB).....	159

<b>Tabela 28</b>	Determinação da recuperação e do teor (estimado) de epicatequina nas preparações do estudo da espinheira (MIJB).....	159
<b>Tabela 29</b>	Determinação da recuperação e do teor de rutina nas preparações do estudo da espinheira (MIJB).....	160
<b>Tabela 30</b>	Determinação da recuperação e do teor (estimado) de cumarina na preparação por Decocção diferenciada do guaco (MGJB) utilizando o método 2.....	165
<b>Tabela 31</b>	Determinação da recuperação e do teor (estimado) de ácido gálico na preparação por decocção diferenciada da aroeira (STJB) utilizando o método 2.	170
<b>Tabela 32</b>	Curva analítica (estimada) do ácido gálico (nível 2 ao nível 8).....	182
<b>Tabela 33</b>	Curva analítica (estimada) da catequina (nível 2 ao nível 8).....	183
<b>Tabela 34</b>	Curva analítica (estimada) da epicatequina (nível 2 ao nível 8).....	184
<b>Tabela 35</b>	Curva analítica (estimada) da rutina.....	185

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	Identificação de marcadores em 16 ervas de duas espécies botânicas.....	47
<b>Figura 02</b>	Resultados da quantificação do princípio ativo nas 16 ervas das duas espécies botânicas .....	47
<b>Figura 03</b>	Caracterização de ginseng através da técnica do DNA fingerprint using low-Cot probes.....	50
<b>Figura 04</b>	Caracterização de espécies botânicas com utilização da técnica de PCR "restriction fragment length polymorphism".....	50
<b>Figura 05</b>	<i>Mikania glomerata</i> Sprengel (guaco) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro	53
<b>Figura 06</b>	Cumarina.....	54
<b>Figura 07</b>	<i>Maytenus ilicifolius</i> (espinheira santa) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro .....	55
<b>Figura 08</b>	Catequina e epicatequina.....	56
<b>Figura 09</b>	Rutina .....	57
<b>Figura 10</b>	<i>Schinus terebinthifolius</i> (aroeira da praia) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.....	57
<b>Figura 11</b>	Ácido gálico.....	59
<b>Figura 12</b>	Isoquercitrina.....	59
<b>Figura 13</b>	Equipamentos e insumos utilizados no perfil genético:(a) nitrogênio líquido, (b) banho a seco, (c) centrifuga, (d) espectrofotômetro, (e) beads para RAPD, (f) cabine de segurança (g) termociclador, (h) suporte para o gel, (i) cuba para eletroforese e (j) transillumination .....	71
<b>Figura 14</b>	Equipamentos utilizados no perfil cromatográfico: (a): comatógrafo à líquido com detector UV/Vis com arranjos de fotodiodos; (b): comatógrafo à gas com detector DIC.....	88
<b>Figura 15</b>	Gel do DNA da <i>Mikania glomerata</i> (guaco), DNA da <i>Schinus terebinthifolius</i> (aroeira da praia) e DNA da <i>Maytenus ilicifolia</i> (espinheira santa) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, extração do DNA conforme protocolo com CTAB ISPRA; peso molecular 1 Kb. <b>Pista 1 e 2:</b> DNA da <i>Mikania glomerata</i> <b>Pista 3:</b> DNA da <i>Schinus terebinthifolia</i> <b>Pista 4:</b> DNA da <i>Maytenus ilicifolia</i> <b>Pistas P:</b> Padrão de 1 Kb.....	90

<b>Figura 16</b>	Gel do DNA da <i>Maytenus ilicifólius</i> (espinheira santa) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, extração do DNA conforme protocolo CTAB DNA EXTRACTION FROM PLANT TISSUES; peso molecular 1 Kb; antes do processo de limpeza. <b>Pistas P:</b> Padrão de 1 Kb <b>Pista 2:</b> DNA concentrado <i>Maytenus ilicifólia</i> , replicata 1. <b>Pista 3:</b> DNA concentrado <i>Maytenus ilicifólia</i> , replicata 2.....	91
<b>Figura 17</b>	Gel do DNA da <i>Maytenus ilicifólius</i> (espinheira santa) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, extração do DNA conforme protocolo CTAB DNA EXTRACTION FROM PLANT TISSUES; peso molecular 1 Kb; após o processo de limpeza. <b>Pistas P:</b> Padrão de 1 Kb <b>Pista 2:</b> DNA concentrado <i>Maytenus ilicifólius</i> .....	91
<b>Figura 18</b>	Gel do DNA da <i>Schinus terebinthifólius</i> (aroeira da praia) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, extração do DNA conforme protocolo CTAB DNA EXTRACTION FROM PLANT TISSUES; peso molecular 1 Kb; após o processo de limpeza. <b>Pistas P:</b> Padrão de 1 Kb <b>Pista 4:</b> DNA da <i>Schinus terebinthifolius</i> .....	92
<b>Figura 19</b>	Gel do RAPD-PCR usando DNA da <i>Mikania glomerata</i> (guaco) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro com os iniciadores OPA, OPC e OPG 1 a 20; extração do DNA conforme o protocolo com CTAB ISPRA; peso molecular 100 pb (P).....	93
<b>Figura 20</b>	Gel do RAPD-PCR usando DNA da <i>Maytenus ilicifólia</i> (espinheira santa) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro com os iniciadores OPA, OPC e OPG 1 a 20, extração do DNA conforme protocolo CTAB DNA EXTRACTION FROM PLANT TISSUES; peso molecular 100 pb (P).....	94
<b>Figura 21</b>	Gel do RAPD-PCR do DNA da <i>Schinus terebinthifolius</i> (aroeira da praia) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro com os iniciadores OPA, OPC e OPG 1 a 20, extração do DNA conforme protocolo CTAB DNA EXTRACTION FROM PLANT TISSUES, peso molecular 100 pb (P).....	95
<b>Figura 22</b>	Perfil dos fragmentos do RAPD-PCR das três plantas que foram gerados pelos iniciadores selecionados para a elaboração do perfil (fingerprint) entre 200 e 1100 pb. Pista P: padrão molecular 100 pb.....	98
<b>Figura 23</b>	Gel do RAPD-PCR usando DNA da <i>Mikania glomerata</i> do Rio de Janeiro (RJ) e do Paraná (PR) com os iniciadores OPA 1 e 10; extração do DNA conforme o protocolo com CTAB ISPRA; peso molecular 100 pb (P); DNA concentrado (C) e DNA Diluído (D).....	102
<b>Figura 24</b>	Gel do RAPD-PCR usando DNA da <i>Mikania glomerata</i> do Rio de Janeiro (RJ) e do Paraná (PR) com os iniciadores OPA 17 e OPC 9; extração do DNA conforme o protocolo com CTAB ISPRA; peso molecular 100 pb (P); DNA concentrado (C) e DNA Diluído (D).....	102



<b>Figura 25</b>	Gel do RAPD-PCR usando DNA da <i>Mikania glomerata</i> do Rio de Janeiro (RJ) e do Paraná (PR) com os iniciadores OPC 11 e OPC 19; extração do DNA conforme o protocolo com CTAB ISPRA; peso molecular 100 pb (P); DNA concentrado (C) e DNA Diluído (D).....	103
<b>Figura 26</b>	Gel do RAPD-PCR usando DNA da <i>Mikania glomerata</i> do Rio de Janeiro (RJ) e a do Paraná (PR) com os iniciadores OPG 3, OPG 5 e OPG 6; extração do DNA conforme o protocolo com CTAB ISPRA; peso molecular 100 pb (P); DNA concentrado (C) e DNA Diluído (D).....	103
<b>Figura 27</b>	Perfil dos fragmentos do RAPD-PCR das 2 plantas (Guaco). Pista P: padrão molecular 100 pb; PR: DNA do Paraná; RJ: DNA do Rio de Janeiro.....	105
<b>Figura 28</b>	Gel A (Figura X): Perfil em um gel (RAPD-PCR) usando o iniciador OPA 1 com DNA do guaco do Rio de Janeiro concentrado e diluído e DNA do Paraná concentrado e diluído; usando o iniciador OPA 10 com DNA do guaco do Rio de Janeiro concentrado e diluído e DNA do Paraná concentrado e diluído; Gel B: Perfil RAPD-PCR em um gel usando 10 iniciadores OPA (1 a 10) com DNA do guaco do Rio de Janeiro; extração do DNA conforme o protocolo com CTAB ISPRA (3.1.2.3); peso molecular 100 pb (P); DNA concentrado (C) e DNA Diluído (D)..... .....	110
<b>Figura 29</b>	Cromatograma da cumarina (MG 33), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40 µL.....	111
<b>Figura 30</b>	Perfil cromatográfico do guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por infusão (Inf). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40 µL.....	112
<b>Figura 31</b>	Perfil cromatográfico após a adição de cumarina no guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por infusão (Inf). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40 µL.....	113

<b>Figura 32</b>	Perfil cromatográfico do guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por extração em soxhlet (Ext). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40 µL.....	115
<b>Figura 33</b>	Perfil cromatográfico após a adição de cumarina no guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por extração em soxhlet (Ext). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40 µL .....	116
<b>Figura 34</b>	Perfil cromatográfico do guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40 µL.....	118
<b>Figura 35</b>	Perfil cromatográfico após adição de cumarina ao guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma). Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40 µL.....	119
<b>Figura 36</b>	Comparação dos perfis cromatográficos da planta guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (DAD). Solvente água. Preparações: infusão (Inf), extrato (Ext) e decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8mL/min; volume de injeção de 40 µL, detecção a 280 nm.....	120

- Figura 37** Comparação dos perfis cromatográficos antes e após a adição de cumarina no guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (DAD). Solvente água, preparação por infusão, extração em soxhlet e decocção diferenciada. Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40 µL, detecção a 280 nm..... 122
- Figura 38** Cromatograma do ácido gálico (ST 16), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 124
- Figura 39** Cromatograma da isoquercitrina (ST 5'), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL ..... 124
- Figura 40** Perfil cromatográfico da aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por infusão (Inf). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL ..... 126
- Figura 41** Perfil cromatográfico após a adição de ácido gálico na aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por infusão (Inf). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL ..... 127

- Figura 42** Perfil cromatográfico da aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por extração em soxhlet (Ext). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 129
- Figura 43** Perfil cromatográfico após a adição de ácido gálico e isoquercitrina na aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por extração em soxhlet (Ext). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 130
- Figura 44** Perfil cromatográfico da aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL ..... 132
- Figura 45** Perfil cromatográfico após adição de ácido gálico e isoquercitrina a aroeira da praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL ..... 133
- Figura 46** Comparação dos perfis cromatográficos da aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (DAD). Solvente água. Preparações: infusão (Inf), extrato (Ext) e decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8mL/min; volume de injeção de 60 µL, detecção a 250 nm..... 135

<b>Figura 47</b>	Comparação dos perfis cromatográficos antes e após a adição de ácido gálico e isoquercitrina na aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (DAD). Solvente água, preparação por infusão, extração em soxhlet e decocção diferenciada. Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm.....	138
<b>Figura 48</b>	Perfil cromatográfico da espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (DAD). Solvente água, preparação por infusão (Inf). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40 µL, detecção a 350 nm.....	140
<b>Figura 49</b>	Perfil cromatográfico do guaco, da aroeira-da-praia e da epinheira-santa, cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280, 250 e 350 nm respectivamente). Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40,60 e 60 µL respectivamente.....	141
<b>Figura 50</b>	Cromatograma da catequina (MI 42), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL.....	143
<b>Figura 51</b>	Cromatograma da epicatequina (MI 21), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL.....	143
<b>Figura 52</b>	Cromatograma da rutina (USP), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL.....	144

- Figura 53** Perfil cromatográfico da espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por infusão (Inf). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 146
- Figura 54** Perfil cromatográfico após a adição de catequina, epicatequina e rutina na espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por infusão (Inf). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 147
- Figura 55** Perfil cromatográfico da espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por extração em soxhlet (Ext). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 149
- Figura 56** Perfil cromatográfico após a adição de catequina, epicatequina e rutina na espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por extração em soxhlet (Ext). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 150
- Figura 57** Perfil cromatográfico da espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 152

- Figura 58** Perfil cromatográfico após a adição de catequina, epicatequina e rutina na espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 153
- Figura 59** Comparação dos perfis cromatográficos da espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (DAD). Solvente água. Preparações: infusão (Inf), extração em soxhlet (Ext) e decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL, detecção a 269 nm..... 155
- Figura 60** Comparação dos perfis cromatográficos antes e após a adição de catequina, epicatequina e rutina na espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (DAD). Solvente água, preparação por infusão (Inf), extração em soxhlet (Ext) e decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL, detecção a 269 ..... 158
- Figura 61** Cromatograma da cumarina (MG 33), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL ..... 161
- Figura 62** Perfil cromatográfico do guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 162

- Figura 63** Perfil cromatográfico após a adição de cumarina no guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 163
- Figura 64** Comparação dos perfis cromatográficos antes e após a adição de cumarina, no guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm). Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 164
- Figura 65** Cromatograma do ácido gálico (ST 16), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 166
- Figura 66** Perfil cromatográfico da aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 167
- Figura 67** Perfil cromatográfico após a adição de ácido gálico na aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 168



- Figura 68** Comparação dos perfis cromatográficos antes e após a adição de ácido gálico na aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm). Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 169
- Figura 69** Perfil cromatográfico do guaco, da aroeira-da-praia e da epinheira-santa, cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280, 250 e 269 nm respectivamente). Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 171
- Figura 70** Perfil do espectro de varredura de absorção molecular no UV-Vis no tempo de retenção dos sinais do perfil cromatográfico do guaco, da aroeira-da-praia e da epinheira-santa, cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280, 250 e 269 nm respectivamente). Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 172
- Figura 71** Cromatograma do ácido gálico (ST 16), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL; concentração de 0,05235 mg/mL..... 173
- Figura 72** Cromatograma da catequina (MI 42), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL; concentração de 0,15940 mg/mL..... 174

- Figura 73** Cromatograma da epicatequina (MI 21), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL; concentração de 0,09855 mg/mL..... 175
- Figura 74** Cromatograma da cumarina (MG 33), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL; concentração de 0,04288 mg/mL..... 176
- Figura 75** Cromatograma da rutina (USP), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL; concentração de 0,10100 mg/mL..... 177
- Figura 76** Perfil cromatográfico da mistura de padrões (MIX Pad), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água e acetonitrila (10 % v/v). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL; concentração: 0,05235 mg/mL de ácido gálico; 0,15940 mg/mL de catequina; 0,09855 mg/mL de epicatequina e 0,04288 mg/mL de cumarina..... 179
- Figura 77** Perfil cromatográfico da curva analítica da mistura de padrões (MIX pad) de ácido gálico, catequina, epicatequina e cumarina, cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm). Solvente água e acetonitrila (10 % v/v). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 181

- Figura 78** Perfil cromatográfico da mistura dos extratos das plantas guaco e espinheira-santa (MIX MGJB e MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 187
- Figura 79** Perfil cromatográfico da mistura dos extratos das plantas guaco e aroeira-da-praia (MIX MGJB e STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL ..... 189
- Figura 80** Perfil cromatográfico da mistura dos extratos das plantas espinheira-santa e aroeira-da-praia (MIX MIJB e STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 191
- Figura 81** Perfil cromatográfico da mistura dos extratos das plantas guaco, espinheira-santa e aroeira-da-praia (MIX MGJB+MIJB+STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL ..... 193
- Figura 82** Comparação dos perfis cromatográficos do guaco (MGJB) com o da cumarina, cromatograma obtido por CG (DIC). Solvente água, preparação por infusão (Inf), extração em soxhlet (ext) e decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 3: coluna 5 % fenil silicone (5 µm de diâmetro do filme, 30 m x 0,25 mm d.i); gás carreador: N<sub>2</sub>; gradiente de temperatura; fluxo 1,0 mL/min; volume de injeção de 1,0 µL ..... 194

<b>Figura 83</b>	Comparação dos perfis cromatográficos da aroeira-da-praia (STJB) com o do ácido gálico, cromatograma obtido por CG (DIC). Solvente água, preparação por infusão (Inf), extração em soxhlet (ext) e decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 3: coluna 5 % fenil silicone (5 µm de diâmetro do filme, 30 m x 0,25 mm d.i); gás carreador: N <sub>2</sub> ; gradiente de temperatura; fluxo 1,0 mL/min; volume de injeção de 1,0 µL .....	195
<b>Figura 84</b>	Comparação dos perfis cromatográficos da espinheira-santa (STJB) com o da rutina, cromatograma obtido por CG (DIC). Solvente água, preparação por infusão (Inf), extração em soxhlet (ext) e decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 3: coluna 5 % fenil silicone (5 µm de diâmetro do filme, 30 m x 0,25 mm d.i); gás carreador: N <sub>2</sub> ; gradiente de temperatura; fluxo 1,0 mL/min; volume de injeção de 1,0 µL .....	196
<b>Figura 85</b>	Comparação dos perfis cromatográficos do guaco (MGJB), cromatograma obtido por CG (DIC). Solvente água, acetonitrila e tolueno, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 3: coluna 5 % fenil silicone (5 µm de diâmetro do filme, 30 m x 0,25 mm d.i); gás carreador: N <sub>2</sub> ; gradiente de temperatura; fluxo 1,0 mL/min; volume de injeção de 1,0 µL .....	197
<b>Figura 86</b>	Comparação dos perfis cromatográficos da aroeira (STJB), cromatograma obtido por CG (DIC). Solvente água, acetonitrila e tolueno, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 3: coluna 5 % fenil silicone (5 µm de diâmetro do filme, 30 m x 0,25 mm d.i); gás carreador: N <sub>2</sub> ; gradiente de temperatura; fluxo 1,0 mL/min; volume de injeção de 1,0 µL .....	198
<b>Figura 87</b>	Comparação dos perfis cromatográficos da espineira (MIJB), cromatograma obtido por CG (DIC). Solvente água, acetonitrila e tolueno, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 3: coluna 5 % fenil silicone (5 µm de diâmetro do filme, 30 m x 0,25 mm d.i); gás carreador: N <sub>2</sub> ; gradiente de temperatura; fluxo 1,0 mL/min; volume de injeção de 1,0 µL.....	199
<b>Figura 88</b>	Perfis genético (RAPD-PCR, figura 22), químico (CLAE-UV) e do espectro de varredura de absorção molecular no UV-Vis no tempo de retenção dos sinais do perfil cromatografico do guaco, cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL .....	201

**Figura 89** Perfis genético (RAPD-PCR, figura 22), químico (CLAE-UV) e do espectro de varredura de absorção molecular no UV-Vis no tempo de retenção dos sinais do perfil cromatografico da aroeira-da-praia, cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 202

**Figura 90** Perfis genético (RAPD-PCR, figura 22), químico (CLAE-UV) e do espectro de varredura de absorção molecular no UV-Vis no tempo de retenção dos sinais do perfil cromatografico da espinheira-santa, cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL..... 203

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>31</b>
1.1	O PAPEL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA.....	31
1.2	COMPETÊNCIAS DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE.....	32
1.3	PANORAMA MUNDIAL E NACIONAL DO USO DAS PLANTAS MEDICINAIS.....	33
1.4	A BIOPIRATARIA.....	36
1.5	ARCABOUÇO REGULATÓRIO NACIONAL SOBRE AS PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS.....	38
1.5.1	Legislação principais nos últimos 10 anos.....	38
1.5.2	Pontos e definições importantes da RDC nº 18, de 03 abril de 2013 em relação ao controle de qualidade da matéria prima.....	38
1.5.3	Pontos e definições importantes da RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 em relação ao controle de qualidade da matéria prima.....	42
1.5.4	Pontos e definições importantes do Decreto nº 8077, de 14 de agosto de 2013.....	45
1.6	CARACTERIZAÇÃO (“ <i>fingerprint</i> ”) QUÍMICA .....	45
1.6.1	Técnicas cromatográficas combinadas.....	48
1.7	CARACTERIZAÇÃO (“ <i>fingerprint</i> ”) GENÉTICA.....	49
1.7.1	A técnica RAPD (“Random-primed polymerase chain reaction”).....	51
1.8	JUSTIFICATIVA E RELEVANCIA.....	52
1.9	FARMACOLOGIA E PRINCIPAIS CONSTITUÍNTES QUÍMICOS DAS PLANTAS ESCOLHIDAS PARA O ESTUDO.....	53
1.9.1	<i>Mikania glomerata</i> Sprengel (guaco).....	53
1.9.2	<i>Maytenus ilicifolius</i> (espinheira santa).....	54
1.9.3	<i>Schinus terebinthifolius</i> (aroeira da praia).....	57
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>61</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	61

2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	61
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
3.1	PREPARAÇÃO DO “fingerprint” GENÉTICO.....	63
3.1.1	Origem dos DNA utilizados nos estudos.....	63
3.1.2	Isolamento do DNA Genômico.....	63
3.1.3	Avaliação da concentração e da pureza do DNA extraído.....	65
3.1.4	Iniciadores (primers) utilizados.....	65
3.1.5	Reação em Cadeia pela Polimerase (RAPD-PCR).....	66
3.1.6	Análise de dados.....	67
3.1.6.1	<i>Primeiro estudo.....</i>	<i>67</i>
3.1.6.2	<i>Segundo estudo.....</i>	<i>68</i>
3.1.7	Equipamentos e insumos utilizados.....	69
3.1.7.1	<i>Equipamentos utilizados.....</i>	<i>69</i>
3.1.7.2	<i>Insumos utilizados.....</i>	<i>70</i>
3.2	PREPARAÇÃO DO “fingerprint” QUÍMICO.....	71
3.2.1	Origem das plantas utilizados nos estudos.....	71
3.2.2	Marcadores químicos utilizados.....	72
3.2.3	Preparação dos extratos das plantas em água (infusão, extração e decocção diferenciada).....	75
3.2.4	Preparação dos extratos das plantas em água (infusão, extração e decocção diferenciada) adicionados de marcadores .....	76
3.2.5	Preparação da mistura de marcadores (MIX pad) e da curva analítica: ácido gálico, catequina, epicatequina, cumarina e rutina.....	78
3.2.6	Preparação da mistura dos extratos das plantas em água (decocção diferenciada).....	81
3.2.7	Preparação dos extratos das plantas em acetoneitrila e tolueno (decocção diferenciada).....	82

3.2.8	Condições cromatograficas utilizadas no estudo.....	83
3.2.9	Análise de dados.....	85
3.2.10	Equipamentos e insumos utilizados.....	86
3.2.10.1	<i>Equipamentos utilizados.....</i>	86
3.2.10.2	<i>Insumos utilizados.....</i>	87
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>90</b>
4.1	RESULTADOS DA BIOLOGIA MOLECULAR.....	90
4.1.1	Avaliação dos procedimentos adotados para extração do DNA.....	90
4.1.2	Resultados do primeiro estudo.....	92
4.1.2.1	<i>Perfis obtidos no RAPD-PCR com os 60 iniciadores selecionados.....</i>	92
4.1.2.2	<i>Seleção dos iniciadores para elaboração de perfis (“fingerprint”) dos fragmentos obtidos no RAPD-PCR com os 60 iniciadores.....</i>	97
4.1.2.3	<i>Elaboração da matriz dos fragmentos obtidos no RAPD-PCR dos perfis (“fingerprint”) selecionados no estudo.....</i>	99
4.1.3	Resultados do segundo estudo.....	101
4.1.3.1	<i>Perfis obtidos no RAPD-PCR com os 9 iniciadores selecionados.....</i>	101
4.1.3.2	<i>Seleção dos iniciadores para elaboração de perfis (“fingerprint”) dos fragmentos obtidos no RAPD-PCR com os 9 iniciadores.....</i>	104
4.1.3.3	<i>Elaboração da matriz dos fragmentos obtidos no RAPD-PCR dos perfis (“fingerprint”) selecionados no estudo.....</i>	106
4.1.4	Avaliação da reprodutibilidade da Reação em Cadeia pela Polimerase (RAPD-PCR).....	109
4.2	RESULTADOS DA ANÁLISE QUÍMICA.....	110
4.2.1	Perfis cromatográficos obtidos por Cromatografia Líquida com detector UV/Vis (DAD) das plantas guaco (MGJB), aroeira-da-praia (STJB) e espinheira- santa (MIJB) utilizando o método 1.....	110
4.2.1.1	<i>Resultados dos extratos da planta guaco (MGJB) em água (infusão, extração e decocção diferenciada).....</i>	110
4.2.1.2	<i>Resultados dos extratos da planta aroeira-da-praia (STJB) em água (infusão, extrato e decocção diferenciada).....</i>	123



4.2.1.3	<i>Resultados dos extratos da planta espinheira-santa (MIJB) em água (infusão).....</i>	140
4.2.2	Perfis cromatográficos obtidos por Cromatografia Líquida com detector UV/Vis (DAD) das plantas espinheira-santa (MIJB), guaco (MGJB) e aroeira-da-praia (STJB) utilizando o método 2.....	142
4.2.2.1	<i>Resultados dos extratos da planta espinheira-santa (MIJB) em água (infusão, extrato e decocção diferenciada).....</i>	142
4.2.2.2	<i>Resultados dos extratos da planta guaco (MGJB) em água (decocção diferenciada).....</i>	160
4.2.2.3	<i>Resultados dos extratos da planta aroeira-da-praia (STJB) em água (decocção diferenciada).....</i>	165
4.2.3	Perfis cromatográficos obtidos por Cromatografia Líquida com detector UV/Vis (DAD) de uma mistura de padrões (“MIX Pad”) contendo ácido gálico, catequina, epicatequina e cumarina utilizando o método 2.....	173
4.2.3.1	<i>Cromatogramas individuais dos padrões de ácido gálico, catequina, epicatequina, cumarina e rutina.....</i>	173
4.2.3.2	<i>Cromatograma da mistura de marcadores (MIX pad) de ácido gálico, catequina, epicatequina e cumarina.....</i>	178
4.2.3.3	<i>Cromatogramas da curva analítica da mistura de padrões (MIX pad) de ácido gálico, catequina, epicatequina e cumarina utilizando o método 2.</i>	180
4.2.4	Perfis cromatográficos obtidos por Cromatografia Líquida com detector UV/Vis (DAD) de misturas (MIX) das plantas espinheira-santa (MIJB), guaco (MGJB) e aroeira-da-praia (STJB) utilizando o método 2.....	186
4.2.4.1	<i>Resultados da mistura dos extratos da planta guaco e da planta espinheira-santa (MIX MGJB e MIJB) em água (decocção diferenciada)</i>	186
4.2.4.2	<i>Resultados da mistura dos extratos da planta guaco e da planta aroeira-da-praia (MIX MGJB e STJB) em água (decocção diferenciada)</i>	188
4.2.4.3	<i>Resultados da mistura dos extratos da planta espinheira-santa e da planta aroeira-da-praia (MIX MIJB e STJB) em água (decocção diferenciada).....</i>	190
4.2.4.4	<i>Resultados da mistura dos extratos das plantas guaco, espinheira-santa e da planta aroeira-da-praia (MIX MGJB, MIJB e STJB) em água (decocção diferenciada).....</i>	192

4.2.5	Perfis cromatográficos obtidos por Cromatografia Gasosa com detector DIC das plantas guaco (MGJB), aroeira-da-praia (STJB) e espinheira-santa (MIJB) utilizando o método 3.....	194
4.2.5.1	<i>Resultados dos extratos da planta guaco (MGJB) em água (infusão, extrato e decocção diferenciada).....</i>	194
4.2.5.2	<i>Resultados dos extratos da aroeira-da-praia (STJB) em água (infusão, extrato e decocção diferenciada).....</i>	195
4.2.5.3	<i>Resultados dos extratos da espinheira-santa (MIJB) em água (infusão, extrato e decocção diferenciada).....</i>	196
4.2.5.4	<i>Resultados dos extratos do guaco (MGJB) em água, acetonitrila e tolueno (decocção diferenciada).....</i>	197
4.2.5.5	<i>Resultados dos extratos da aroeira (STJB) em água, acetonitrila e tolueno (decocção diferenciada).....</i>	198
4.2.5.6	<i>Resultados dos extratos da espinheira (MIJB) em água, acetonitrila e tolueno (decocção diferenciada).....</i>	199
4.3	LIMITAÇÕES E VANTAGENS DO PROJETO.....	200
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	205
6	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	207
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	209



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O PAPEL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA

O novo salto na concepção nacional de Vigilância Sanitária pode ser mais bem entendido através da definição constante na Lei nº. 8.080 de 1990, que regulamenta o SUS. “Entende-se por Vigilância Sanitária como um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens de serviços de interesse da saúde...” (SILVA, 2000).

No bojo das conquistas sociais advindas da promulgação da nova Constituição Federal, surgiu o Código de Defesa do Consumidor (Lei nº. 8.079, de 1990), que, entre outras determinações, busca a proteção da saúde do indivíduo contra os riscos do consumo de produtos considerados perigosos ou nocivos. O Código de Defesa do Consumidor externa o entendimento social de serem a qualidade e o risco responsabilidades do fabricante (SILVA, 2000).

A ação da Vigilância Sanitária deve ocorrer quando verificada a existência de riscos ou situações prováveis de ocorrências de riscos, de modo que, encontradas as causas, atue-se para evitar a reincidência desses fatores. Assim, o princípio da precaução é, por natureza, o mais típico dos atuais princípios relacionados à Vigilância Sanitária, porque é em função dele que os profissionais atuam. É para a existência (ou probabilidade de existência) de risco que se dirigem as ações da ANVISA (ZILDA & COROA, 1998).

No dia 27 de janeiro de 1999 o Congresso Nacional promulgou a lei 9782 que dispõe sobre o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e criou a Agência Nacional

de Vigilância Sanitária. Segundo esta lei, ficou definida que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) teria por finalidade “promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à Vigilância Sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos e fronteiras” (PIOVESAN, 2002).

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) assumiu um papel de acompanhar todas as alterações no cenário da vigilância sanitária. O Instituto teve suas atribuições ampliadas e suas ações acabaram por se tornar mais efetivas no âmbito da referência nacional e das ações científicas e tecnológicas, relacionadas ao controle de qualidade de produtos de interesse da saúde. Conforme a legislação vigente no período, o INCQS tornou-se subordinado tecnicamente à Anvisa e, administrativamente, à Fiocruz (PIOVESAN, 2002).

## 1.2 COMPETÊNCIAS DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde acumula diversas atribuições conforme consta no artigo número 32, do Decreto nº 4725 de 09 de junho de 2003, referentes ao Estatuto da Fiocruz. Dentre as diversas funções do Instituto consta àquela relacionada ao controle de qualidade de produtos para o consumo humano, em especial os medicamentos (BRASIL, 2008).

O INCQS atua em todo o território nacional atendendo ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. Entre os parceiros do INCQS pode-se citar a ANVISA, os

Laboratórios Centrais e Centros de Vigilância Sanitária das Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde (BRASIL, 2008).

As atribuições do INCQS resumem-se a atividades exclusivas de Estado. Suas missões mais destacadas são: perícia analítico-laboratorial no contexto legal da vigilância sanitária e desenvolvimento e transferência de tecnologia e cooperação técnica com organismos nacionais e internacionais. Desta forma, o INCQS acaba por desempenhar papel de principal órgão nacional para questões tecnológicas e normativas, relativas ao controle de qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços no contexto do SUS. Este conjunto de atribuições torna a atuação do INCQS estratégica para a vigilância sanitária e mais ainda para a ANVISA (BRASIL, 2008).

O INCQS tem como Missão – “Contribuir para a promoção e recuperação da saúde e a prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária” (BRASIL, 2008).

O INCQS tem como Visão – “Ser reconhecido como órgão de alta competência para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária” (BRASIL, 2008).

### 1.3 PANORAMA MUNDIAL E NACIONAL DO USO DAS PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas buscando o restabelecimento da saúde vem sendo utilizada ao longo dos séculos por diversas culturas, fundindo hoje os conhecimentos populares das mais variadas origens e agregando novas descobertas científicas

(RATES, 2001; OKIGBO et al., 2008). Como planta medicinal entende-se uma espécie vegetal cultivada ou não, utilizada em sua totalidade ou suas partes, com propósitos terapêuticos (OMS, 2003).

A Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população mundial, principalmente a dos países em desenvolvimento, utiliza a chamada 'medicina tradicional' para suprir as suas necessidades médicas primárias. Com base nestes dados, a OMS instituiu em 1977 um programa de incentivo ao estudo das plantas medicinais. Além disso, das 252 drogas consideradas básicas por esta organização, 11% são de origem vegetal (RATES, 2001).

As plantas medicinais respondem por cerca de 25% do total das prescrições médicas em países industrializados; nos países em desenvolvimento a participação de plantas medicinais no arsenal terapêutico alcança 80%. Utilizadas como matéria-prima para produção de extratos ou para o isolamento de substâncias naturais puras, representam uma área em franca expansão. Adquirem importância cada vez maior as substâncias naturais puras e os extratos purificados ou padronizados, que permitem melhor caracterização analítica e preenchem melhor os requisitos de qualidade, eficácia e segurança, exigidos de qualquer medicamento moderno, seja ele natural ou sintético (GILBERT, FERREIRA & ALVES, 2005).

Afirma-se que o mercado mundial de drogas de origem vegetal é estimado em US\$ 12,4 bilhões, sendo o consumo da Europa responsável por aproximadamente 50% deste mercado (CRAGG, NEWMAN & SNADER, 1997). Outras estimativas revelam que o mercado mundial de produtos farmacêuticos movimenta US\$ 320 bilhões/ano, dos quais US\$ 20 bilhões são originados de substâncias ativas de plantas (ROBBERS, SPEEDLE & TYLER, 1996).

No Brasil, quanto ao mercado de fitoterápicos, estima-se que o mesmo gire em torno de 1 bilhão de reais / ano. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80 % da população mundial faz uso de medicamentos derivados de plantas medicinais. Enquanto que pesquisas realizadas no Brasil demonstram que 91,9 % da população já fez uso de alguma planta medicinal, sendo que 46 % da população mantem um cultivo caseiro de plantas medicinais (MARQUES & PETROVICK, 2007).

Mesmo assim, apenas três países da América Latina (Argentina, Brasil e México) possuem farmacopéias oficiais atualizadas ou em processo de atualização. Nas farmacopéias oficiais, a grande maioria das monografias corresponde a fármacos sintéticos. As monografias de plantas medicinais constituem minoria e são, principalmente, de plantas de origem européia. A IV edição da Farmacopéia Brasileira contém 41 monografias de plantas medicinais, das quais, apenas algumas são de plantas brasileiras. A falta de especificações para determinar a autenticidade, a pureza e qualidade do material vegetal é um dos fatores limitantes para isto (GILBERT, FERREIRA & ALVES, 2005).

Na América Latina, e o Brasil em particular a indústria de fármacos, baseada em plantas medicinais, é incipiente e pouco desenvolvida. Um diagnóstico determinou que os produtos a base de plantas medicinais produzidos na América Latina apresentam, em geral, baixa qualidade. Contribuem para isso a dificuldade de obter plantas medicinais em quantidade e em qualidade desejadas, à falta de conhecimentos tecnológicos e o desconhecimento ou a inexistência de processos de controle de qualidade (GILBERT, FERREIRA & ALVES, 2005; GONÇALVES, 2009). O estudo da variabilidade genética de plantas medicinais é de muita importância, tanto em nível da variabilidade interespecífica, quanto em nível da variabilidade



intraespecífica. Entretanto, em nível intraespecífico essas diferenças ainda não estão suficientemente estudadas. Atualmente, a preocupação com a perda da variabilidade e a extinção de espécies com potencial medicinal têm gerado demanda por trabalhos de coleta, preservação e estudo sobre tais plantas. Portanto para conservação e manejo eficiente destas espécies medicinais, a composição genética dos acessos coletados em diferentes regiões deve ser avaliada (CARVALHO et al., 2009).

Um exemplo é a comercialização da ipeca (*Psychotria ipecacuanha*), cujo uso farmacológico está ligado à presença de dois alcaloides em suas raízes (a emetina e a cefalina) que conferem à planta o poder emético e amebicida. O Brasil é o principal exportador, seguido do Panamá e Costa Rica, para laboratórios de países, tais como: Estados Unidos, Inglaterra e Canadá (mercado estimado em 5 milhões de dólares). Devido ao intenso processo extrativo nos dois séculos passados e, também, por ter suas áreas de ocorrência natural reduzidas, atualmente é uma espécie ameaçada de erosão genética ou em vias de extinção. Porém, sendo uma espécie passível de ser adequar a um sistema de cultivo economicamente viável, ela pode ser um modelo para estudo de sistemas aproveitáveis da biodiversidade em áreas florestais que estão sob alta pressão econômica (LAMEIRA, 2002).

#### 1.4 A BIOPIRATARIA

Outro grande problema que concerne as plantas medicinais é a biopirataria. Conforme Valéria Silva Galdino não existe uma definição clara para a biopirataria, mas o termo está associado a empresas e instituições de pesquisas que exploram ilegalmente plantas e animais e os conhecimentos de comunidades tradicionais. A partir daí, elas elaboram novos produtos e passam a deter, por meio de patentes,

toda a renda da comercialização. Desde 2003, o Comitê de Gestão do Patrimônio Genético, discute um projeto de lei definitivo sobre o assunto. A idéia é estabelecer regras para beneficiar as comunidades com o uso comercial de seus conhecimentos e definir a biopirataria como crime. Existe, também, a necessidade de regular a questão internacionalmente, visto que muitos países, especialmente os desenvolvidos, não reconhecem o direito das nações sobre o patrimônio genético nativo, o que, na prática, incentiva suas empresas a continuarem com a biopirataria<sup>1</sup>.

Plantas como o cumaru ou erva tonca (6,700 kg) no ano de 1991 foram objeto de grande exportação para a Alemanha, e o pau-de-rosa (*Aniba rosaeodora*) (37,079 Kg) para a Europa e os Estados Unidos. O guaraná (*Paullinia* sp.), o ipecacuanha (*Psychotria ipecacuanha* Stokes), o ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*), a casca-sagrada (*Rhamnus purshiana*), o boldo (*Peumus boldus*), a copaíba (*Copaifera multijuga*) também estão no rol das inúmeras ervas exportadas (SILVA *et al*, 2005).

Um exemplo ilustrativo de biopirataria em nosso país é o que ocorre com o chá de quebra-pedra (*Phyllanthus* sp.), o qual, nas comunidades tradicionais, é utilizado para fins diuréticos e problemas renais. Esta planta foi processada sinteticamente por um laboratório norte-americano, revendida para o Brasil na forma de remédio industrializado e consumido pelos próprios brasileiros, sem que o país ou a população fossem beneficiados financeiramente (SILVA *et al*, 2005).

---

<sup>1</sup> Mestre e Doutora em Direito das Relações Sociais pela Pontifícia Universidade Católica de São Paulo; Professora da Universidade Estadual de Maringá, do Centro Universitário de Maringá e da Universidade Paranaense (campus de Paranavá); Advogada em Maringá - PR.

## 1.5 ARCABOUÇO REGULATÓRIO NACIONAL SOBRE AS PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

### 1.5.1. Legislação principais nos últimos 10 anos

Com relação aos produtos industrializados, encontram-se registrados na ANVISA, 432 fitoterápicos simples e 80 compostos. O setor produtivo industrial possui uma legislação ampla (Tabela 1) no tocante aos aspectos da produção e comercialização de fitoterápicos (CARVALHO *et al.*, 2008).

### 1.5.2. Pontos e definições importantes da RDC nº 18, de 03 abril de 2013 em relação ao controle de qualidade da matéria prima

A RDC nº 18 (03/04/2013) determina os requisitos mínimos exigidos para o exercício das atividades de preparação de plantas medicinais e fitoterápicos em **farmácias vivas**, visando à garantia de sua qualidade, segurança, efetividade e promoção do seu uso seguro e racional. Para os efeitos desta Resolução, consideram-se farmácias vivas aquelas instituídas pela Portaria nº 886, de 20 de abril de 2010, do Ministério da Saúde, que instituiu a farmácia viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), e que realizam as etapas de cultivo, coleta, processamento, armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos (Art. 1º). As disposições desta Resolução aplicam-se somente aos estabelecimentos que realizam as atividades de preparação de plantas medicinais e fitoterápicos oriundos de horta ou horto oficial ou comunitário a serem dispensados no âmbito do SUS, não sendo permitida sua comercialização. Caso necessário, as matérias-primas de origem vegetal poderão ser adquiridas de fornecedores qualificados (Art. 2º).

**Tabela 01:** Regulamentação federal criada pela ANVISA para o controle da qualidade dos medicamentos fitoterápicos industrializados e insumos farmacêuticos

<b>Ato</b>	<b>Conteúdo</b>
RDC nº 140/2003	Estabelece regras de bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde.
RDC nº 210/2003	Aprova as Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos.
RDC nº 48/2004	Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.
RE nº 88/2004	Determina a publicação da "Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de Fitoterápicos".
RE nº 90/2004	Determina a publicação da "Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade pré-clínica de Fitoterápicos".
RE nº 91/2004	Determina a publicação da "Guia para realização de alterações, inclusões, Notificações e cancelamentos pós registro de Fitoterápicos".
RDC nº 249/2005	Estabelece o regulamento técnico das boas práticas de fabricação de produtos intermediários e insumos farmacêuticos ativos.
CP nº 98/2005	Propõe o regulamento técnico sobre produtos derivados de droga vegetal.
RDC nº 204/2006	Determina a todos os estabelecimentos que exerçam as atividades de importar, exportar, distribuir, expedir, armazenar, fracionar e embalar insumos farmacêuticos o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico de Boas Práticas de Distribuição e Fracionamento de Insumos Farmacêuticos.
RDC nº 67/2007	Magistrais.
RDC nº 95/2008	Regulamenta o texto de bula de medicamentos fitoterápicos
IN nº 05/2008	Determina a publicação da "Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado".
RDC nº 04/2009	Dispõe sobre as normas de farmacovigilância para os detentores de registro de medicamentos de uso humano.
CP nº 63 de 2009	Insumos.
Portaria MS 886 de 2010	Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) sob gestão estadual, municipal ou do Distrito Federal.
RDC nº 10/2010	Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais.
RDC nº 14/2010	Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.
RDC nº 17/2010	Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.
CP nº 85 de 2010	Proposta de Resolução que dispõe sobre as Boas Práticas de Processamento e Manipulação de Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Farmácias Vivas.
RDC nº 18, de 03 abril de 2013	Dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).
Decreto nº 8077, de 14 agosto de 2013	Regulamenta as condições para o funcionamento de empresas sujeitas ao licenciamento sanitário, e o registro, controle e monitoramento, no âmbito da vigilância sanitária, dos produtos de que trata a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976, e dá outras providências.
RDC nº 26, de 13 maio de 2014	Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos
IN nº 2, de 13 maio de 2014	Publica a "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado" e a "Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado"

Fonte: Gonçalves (2009) atualizada

Para efeito deste Regulamento Técnico são adotadas as seguintes definições (Art. 3º):

I) Derivado vegetal: produto da extração da planta medicinal *in natura* ou da droga vegetal, podendo ocorrer na forma de extrato, tintura, alcoolatura, óleo fixo e volátil, cera, exsudato e outros.

II) Droga vegetal: planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada.

III) Fitoterápico: produto obtido de planta medicinal, ou de seus derivados, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa.

IV) Fórmula padrão: documento ou grupo de documentos que especificam as matérias-primas com as respectivas quantidades e materiais de embalagem, juntamente com a descrição dos procedimentos, incluindo instruções sobre o controle em processo e precauções necessárias para a preparação de determinada quantidade (lote) de um produto.

V) Matéria-prima vegetal: compreende a planta medicinal, a droga vegetal ou o derivado vegetal; preparação magistral: aquela preparada na farmácia viva, a partir de uma prescrição de profissional habilitado, destinada a um paciente individualizado, e que estabeleça em detalhes sua composição, forma farmacêutica, posologia e modo de usar; preparação oficial: aquela preparada na farmácia viva, cuja fórmula esteja inscrita no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira ou em outros reconhecidos pela ANVISA

Cada lote da matéria-prima deve ser acompanhado do respectivo Certificado de Análise do fornecedor, que deve permanecer arquivado, no mínimo, durante 6 (seis) meses após o término do prazo de validade do último produto preparado. No caso de matéria-prima obtida de horta/horto oficial ou comunitário, não é necessária a apresentação de certificado de análise, cabendo apenas a qualificação do fornecedor (Art. 89). Para fins de controle, deve ser realizada a montagem da coleção de amostras das espécies trabalhadas (excicatas), que servirão como padrão, contendo a parte utilizada seca e inteira, acondicionada em embalagem apropriada (Art. 108). As matérias-primas devem ser analisadas, no seu recebimento, efetuando-se no mínimo os testes abaixo, quando aplicáveis, respeitando-se as suas características físicas e mantendo os resultados por escrito: caracteres organolépticos; solubilidade; pH; peso; volume; ponto de fusão; densidade; e avaliação do laudo de análise do fabricante/fornecedor, exceto para matéria-prima obtida de horta/horto oficial ou comunitário (Art. 109). Devem ser realizados nas matérias-primas de origem vegetal os seguintes testes e avaliações: testes para determinação de materiais estranhos e adulterantes, pesquisas de contaminação microbiológica (contagem total, fungos e leveduras), umidade e determinação de cinzas totais, **prospecção fitoquímica ou perfil cromatográfico**, e índice de acidez (quando aplicável); avaliação dos caracteres macroscópicos para plantas íntegras ou grosseiramente rasuradas; e avaliação dos caracteres microscópicos para materiais fragmentados ou pó. Para as matérias-primas líquidas de origem vegetal, além dos testes mencionados no "caput" deste artigo, quando aplicável, deve ser realizada a determinação da densidade (Art. 110). É facultado à farmácia viva terceirizar o controle de qualidade de preparações manipuladas do estoque mínimo, com laboratórios tecnicamente capacitados para este fim (Art. 142).

A determinação do prazo de validade das preparações deve ser baseada na sua avaliação físico-química e microbiológica, quando aplicável. Deve ser estabelecido um procedimento operacional para a determinação do prazo de validade dos produtos acabados. Não havendo estudos conclusivos para a validade dos produtos, deverá ser estabelecido um prazo máximo de validade de 3 (três) meses. Fontes de informações sobre a estabilidade físico-química dos fitoterápicos devem incluir referências de compêndios oficiais, recomendações dos produtores e publicações em revistas indexadas. Na interpretação das informações sobre estabilidade dos produtos, devem ser consideradas todas as condições de armazenamento e conservação (Art. 158).

1.5.3) Pontos e definições importantes da RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 em relação ao controle de qualidade da matéria prima

A Resolução da Diretoria Colegiada nº 26 (13/05/2014) tem em sua redação a resolução que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Esta Resolução define as categorias de medicamento fitoterápico e **produto tradicional fitoterápico** e estabelece os requisitos mínimos para o registro e renovação de registro de medicamento fitoterápico, e para o registro, renovação de registro e notificação de produto tradicional fitoterápico (Art. 1).

Esta Resolução se aplica aos produtos que se enquadram nas categorias de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos. São considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas vegetais, cuja segurança e eficácia seja baseada em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. São considerados produtos

tradicionais fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas vegetais, cuja segurança e efetividade seja baseada na tradicionalidade de uso e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. Os produtos tradicionais fitoterápicos são utilizados exclusivamente no uso interno ou externo para o alívio sintomático de doenças de baixa gravidade, não podendo se referir a doenças, distúrbios, condições ou ações consideradas graves, e não podendo conter matérias-primas de risco tóxico conhecido. Não se considera medicamento fitoterápico ou produto tradicional fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais. Os medicamentos fitoterápicos são passíveis de registro, enquanto os produtos tradicionais fitoterápicos são passíveis de **registro ou notificação**. São considerados produtos tradicionais fitoterápicos passíveis de notificação os descritos na última edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (FFFB) e que possuam monografia específica de controle de qualidade publicada em farmacopeias reconhecidas pela Anvisa. Os medicamentos à base de derivados de fungos multicelulares e algas deverão ser avaliados conforme esta Resolução até que tenham regulamentação específica. As preparações extemporâneas notificadas não podem conter excipientes em suas formulações, sendo constituídas apenas de drogas vegetais. As preparações caseiras manipuladas pelas comunidades e povos tradicionais do país, de utilização e distribuição gratuita para a comunidade local, não são objeto de registro ou notificação sanitária (Art. 2).

Para efeito desta Resolução, são adotadas as seguintes definições (Art. 3º):



I) Controle biológico: método alternativo à análise quantitativa do(s) marcador(es) da matéria-prima vegetal e produto acabado, baseado na avaliação da atividade biológica proposta para o fitocomplexo.

II) Decocção: preparação que consiste na ebulição da droga vegetal em água potável por tempo determinado, método indicado para partes de drogas vegetais com consistência rígida, tais como cascas, raízes, rizomas, caules, sementes e folhas coriáceas, ou que contenham substâncias de interesse com baixa solubilidade em água.

III) Fitocomplexo: substâncias, originadas no metabolismo primário ou secundário, responsáveis, em conjunto, pelos efeitos biológicos de uma planta medicinal ou de seus derivados; folheto informativo: cartilha que acompanha os produtos tradicionais fitoterápicos contendo informações de composição e uso do produto para instruir o consumidor final.

IV) Infusão: preparação que consiste em verter água fervente sobre a droga vegetal e, em seguida, tampar ou abafar o recipiente por um período de tempo determinado, método indicado para partes de drogas vegetais de consistência menos rígida, tais como folhas, flores, inflorescências e frutos, ou com substâncias ativas voláteis, ou ainda, com boa solubilidade em água.

V) Marcador: substância ou classe de substâncias (ex.: alcaloides, flavonoides, ácidos graxos, etc.) presentes na matéria-prima vegetal, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do fitoterápico, o marcador pode ser do tipo ativo, quando relacionado com a atividade terapêutica do fitocomplexo, ou analítico, quando não relacionado com a atividade terapêutica do fitocomplexo.

VI) **Perfil cromatográfico:** padrão cromatográfico de constituintes característicos, obtido em condições definidas, que possibilite a identificação da espécie vegetal em estudo e a diferenciação de outras espécies.

VII) **Preparação extemporânea:** aquela para uso imediato pelo consumidor final na forma de infuso, decocto ou macerado, obtido da droga vegetal, sem adição de excipientes, e notificada conforme o FFFB.

VIII) **Prospecção fitoquímica:** testes de triagem, qualitativos ou semiquantitativos, que utilizam reagentes de detecção específicos para evidenciar a presença de grupos funcionais característicos na matéria-prima vegetal e que auxiliam na identificação da espécie vegetal e na diferenciação de outras espécies.

IX) **Uso tradicional:** aquele alicerçado no longo histórico de utilização e de experiência dos conhecimentos, saberes e práticas de comunidades e povos tradicionais e locais, **sem evidências conhecidas ou informadas de risco à saúde do usuário.**

#### 1.5.4 Pontos e definições importantes do Decreto nº 8077, de 14 de agosto de 2013

O Decreto nº 8077 (14/agosto/2013) define que as plantas medicinais sob a forma de droga vegetal serão **dispensadas de registro**, conforme critérios estabelecidos em regulamentação específica pela Anvisa. O reconhecimento da efetividade das drogas vegetais poderá ser realizado com base no **uso tradicional**, a partir de experiências existentes no País e no exterior (Art. 22).

#### 1.6 CARACTERIZAÇÃO (“*fingerprint*”) QUÍMICA

As plantas medicinais contêm mais de um princípio ativo, em quantidades variáveis, mas sempre pequenas, e grande quantidade de material secundário que

pode afetar significativamente a ação farmacológica, a tecnologia da extração e a formulação farmacêutica (GILBERT, FERREIRA & ALVES, 2005).

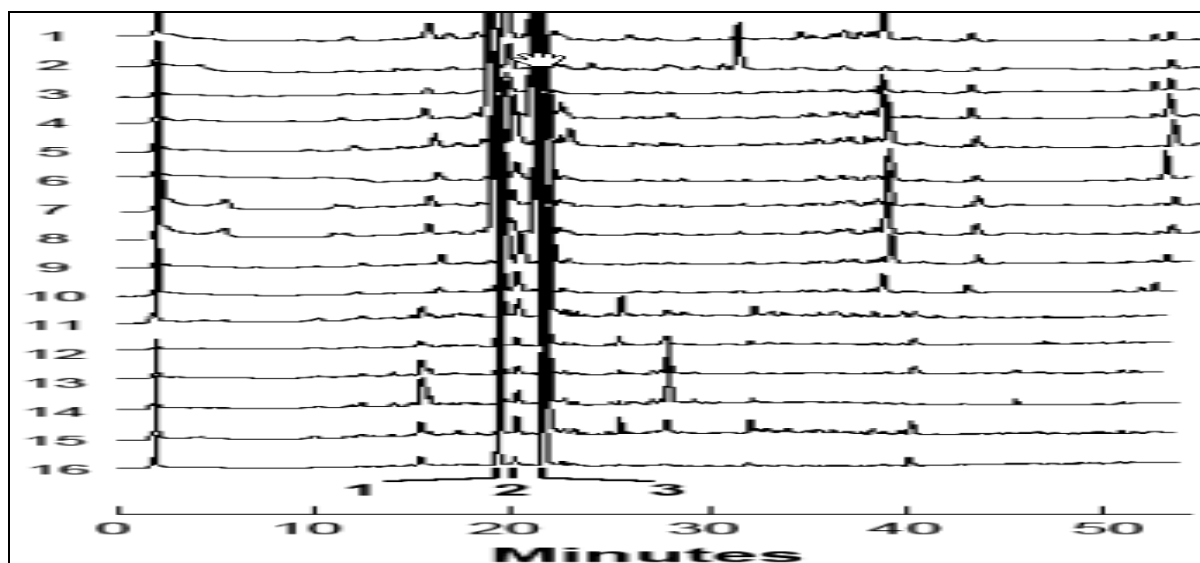
Adicionalmente, os medicamentos fitoterápicos apresentam diferenças importantes quando comparados com os sintéticos. A primeira, é que ao contrário dos medicamentos sintéticos, os princípios ativos dos fitoterápicos raramente são conhecidos. Outra diferença fundamental é que o controle de qualidade e a padronização dos fitoterápicos são tarefas bem mais complexas do que no caso dos medicamentos sintéticos (CALIXTO, 2001).

Quando a análise morfológica não é possível de ser realizada ou impossibilita a identificação das espécies vegetais, pode-se utilizar marcadores moleculares característicos (*fingerprints*) para este objetivo. O estabelecimento de um *fingerprint* característico, geralmente cromatográfico, e sua utilização para identificação de uma espécie ou variedade vegetal é consistente, independente do tecido e da idade da planta (SHAW & BUT, 1995).

Assim, a análise química através do *fingerprint* constitui uma maneira racional e estratégica para assegurar a autenticidade, consistente qualidade e estabilidade das plantas medicinais e suas preparações. Na China, por exemplo, o uso dos *fingerprints* já tem se constituído em importante ferramenta para o monitoramento da qualidade nas preparações fitoterápicas da Medicina Chinesa tradicional (XIE *et al.*, 2006).

Gao *et al.* (2006) usando a técnica de CLAE-UV (detector com arranjo de fotodiodos) desenvolveu e validou metodologia cromatográfica baseada no *fingerprint* que possibilitou a identificação e a quantificação do princípio ativo (*gentiopicrin*) (Figuras 1 e 2) em 16 ervas de duas espécies botânicas (*Gentiana scabra* e *Gentiana rigescens*) cultivadas em diferentes localidades na China.

**Figura 1:** Identificação de marcadores em 16 ervas de duas espécies botânicas



Fonte: (GAO *et al.*, 2006)

**Figura 2:** Resultados da quantificação do princípio ativo nas 16 ervas das duas espécies botânicas

<sup>a</sup> Population Number	Voucher Number	Species	<sup>b</sup> Cultivation Region	<sup>c</sup> Gentiopicrin (mg/g)
1	LDS002	<i>G. scabra</i>	Zuojia, Jilin	41.6 ± 0.77
2	LDS003	<i>G. scabra</i>	Fuyu, Heilongjiang	13.9 ± 0.07
3	LDS006	<i>G. scabra</i>	Qiqihaer, Heilongjiang	26.7 ± 0.12
4	LDS008	<i>G. scabra</i>	Jiamusi, Heilongjiang	34.6 ± 0.13
5	LDS009	<i>G. scabra</i>	Beian, Heilongjiang	28.8 ± 0.05
6	LDS010	<i>G. scabra</i>	Jixi, Heilongjiang	41.0 ± 0.07
7	LDC001	<i>G. scabra</i>	HK Market	8.54 ± 0.08
8	LDC002	<i>G. scabra</i>	HK Market	5.67 ± 0.06
9	LDC003	<i>G. scabra</i>	HK Market	16.2 ± 0.29
10	LDC004	<i>G. scabra</i>	HK Market	9.15 ± 0.02
11	LDS001	<i>G. rigescens</i>	Dali, Yunnan	38.1 ± 0.51
12	LDS004	<i>G. rigescens</i>	Dushan, Guizhou	8.93 ± 0.07
13	LDS005	<i>G. rigescens</i>	Yuxi, Yunnan	6.47 ± 0.20
14	LDS007	<i>G. rigescens</i>	Anshun, Guizhou	30.0 ± 0.35
15	LDS011	<i>G. rigescens</i>	Bijie, Guizhou	30.5 ± 1.20
16	LDS012	<i>G. rigescens</i>	Bijie, Guizhou	24.6 ± 0.01

Fonte: (GAO *et al.*, 2006)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica físico-química de separação onde os analitos se distribuem por duas fases que se encontram em íntimo contato, a fase estacionária (fe) e a fase móvel líquida (fm). Na prática, a fase

estacionária é o “suporte” contido no interior da coluna, pela qual passa um fluxo contínuo de fase móvel ou eluente (CASS *et al.*, 2001; USP 30, 2007).

Os componentes da amostra são retidos, seletivamente, na fase estacionária, resultando em migrações diferenciais, devido ao fato de terem maior ou menor afinidade com a fase móvel. O grau de migração é determinado pela magnitude das interações da fase estacionária e da amostra com a fase móvel (CASS *et al.*, 2001; USP 30, 2007).

As separações por CLAE são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. A maioria das análises farmacêuticas está baseada no método de separação por partição em fase reversa (CASS *et al.*, 2001; USP 30, 2007).

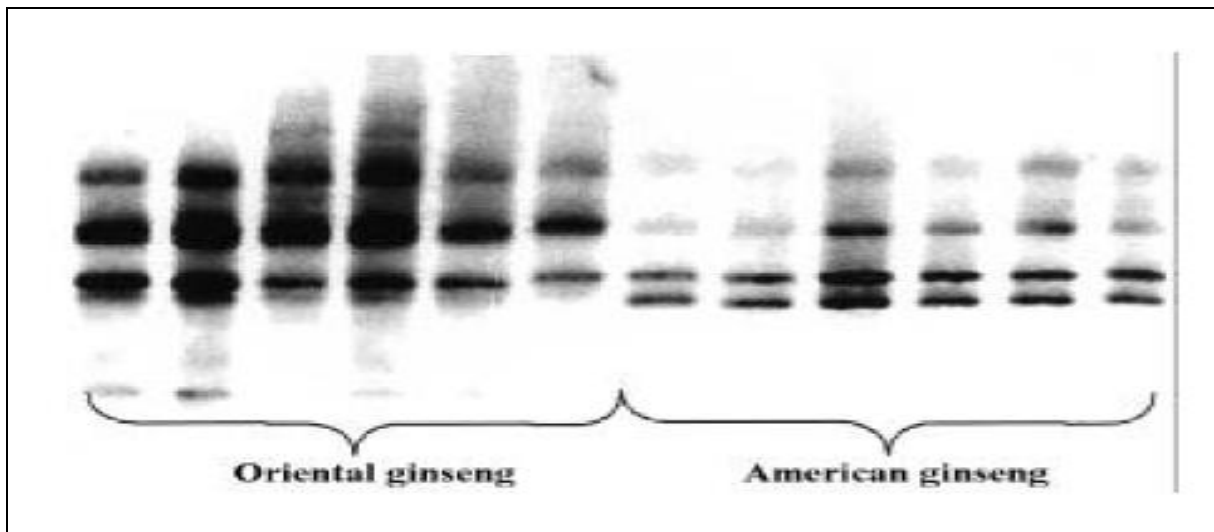
#### 1.6.1 Técnicas cromatográficas combinadas

Estudos dos processos de purificação, isolamento e caracterização estrutural das substâncias de origem vegetal têm permitido a possibilidade de estabelecer estratégias apropriadas para análise dos processos de padronização de preparações fitoterápicas de forma a manter suas homogeneidade e qualidade. Técnicas analíticas como a cromatografia em camada fina (CCD), a cromatografia a gás (CG), a cromatografia a líquido (CLAE), a espectrometria de massa (EM), a espectrometria na região do infravermelho (IV), a espectrometria na região do ultravioleta/visível (UV/VIS), etc., ou, a combinação destas técnicas (CLAE/UV, CLAE/EM-EM, CG/EM-EM e etc.) tem sido usadas com sucesso na padronização e no controle de qualidade das plantas e de seus produtos (CALIXTO, 2000; MARSTON, 2007).

## 1.7 CARACTERIZAÇÃO (“*fingerprint*”) GENÉTICA

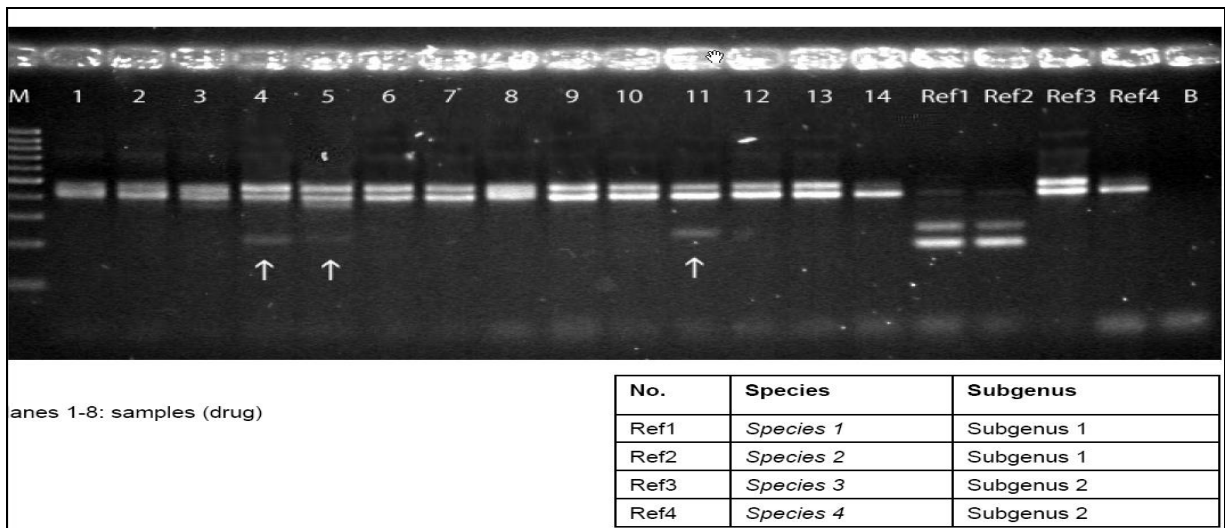
Entretanto a composição química de várias espécies vegetais pode variar com o crescimento e ser afetada pelas condições de estocagem e pelos processos pós-colheita. Nestes casos, o uso do *fingerprint* químico pode ser prejudicado, mas, a inspeção do mapeamento genético permite a identificação botânica independente da forma física, da fisiologia e de condições externas que a planta foi cultivada. Com os avanços na biotecnologia nas últimas décadas, diferentes técnicas de manipulação no DNA tem sido desenvolvidas e utilizadas na autenticação da variedade das espécies de plantas e de localidades de plantio. Métodos como o *DNA fingerprinting using low-cot DNA probes* (Figura 3), *Random-primed polymerase chain reaction* (RAPD), *PCR-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) (Figura 4) e *Polymorphic microsatellite marker technology* são algumas das técnicas atualmente usadas nestas identificações (HON *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2007; NOVAK, 2007; VURAL, 2009).

**Figura 3:** Caracterização de ginseng através da técnica do DNA *fingerprint* using low-Cot probes



Fonte: (HON *et al.*, 2003)

**Figura 4:** Caracterização de espécies botânicas com utilização da técnica de PCR "restriction fragment length polymorphism"



Fonte: (NOVAK, 2007)

O conhecimento da diversidade genética dos recursos naturais ou cultivados é de fundamental importância para o manejo correto desses estoques. Surpreendentemente, as informações sobre a diversidade genética de espécies de plantas medicinais são incipientes.

### 1.7.1 A técnica RAPD (“Random-primed polymerase chain reaction”)

Conforme Lacerda *et al* (2001) a técnica de RAPD consiste na amplificação de DNA genômico em PCR utilizando primers de seqüência arbitrária com 10 nucleotídeos. Tipicamente utiliza-se apenas um tipo de primer em cada reação, sendo este normalmente formado por diferentes combinações das quatro bases nitrogenadas, com um conteúdo de G+C entre 50 e 70% (FRITSCH & RIESEBERG, 1996). O princípio da técnica é que o primer se liga à seqüências complementares em fitas opostas do DNA alvo e ocorre a amplificação *in vitro* do segmento de DNA entre dois primers adjacentes com o auxílio da enzima Taq polimerase. Os sítios de ligação dos primers devem estar separados por no máximo 3 a 4 mil pares de bases, uma vez que a Taq polimerase não é capaz de percorrer segmentos maiores nas condições normalmente usadas durante a amplificação (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; FRITSCH & RIESEBERG, 1996). Por serem pequenos, é grande a possibilidade de que os primers encontrem diversas regiões do genoma para se ligarem, fazendo com que diversos fragmentos de tamanhos diferentes resultem de uma reação (WILLIAMS *et al.*, 1990). A quantidade de fragmentos a serem produzidos para uma análise é virtualmente ilimitada, dependendo apenas do número de primers utilizados. Um “perfil RAPD” será formado pelo conjunto dos produtos de amplificação de diversos primers diferentes. A separação dos produtos amplificados pode ser feita em gel de agarose (em concentrações que variam de 0,8 a 2%), corado com brometo de etídio, ou em gel de poliacrilamida.

Em plantas, o locus do rRNA 18S-5.8S-25S tem sido freqüentemente utilizado para estudos de sistemática molecular. As regiões do genoma localizadas entre estas subunidades, conhecidas como Internal Transcribed Spacers (ITS1 e ITS2), possuem taxa de evolução mais rápida e as diferenças encontradas em suas



seqüências são suficientes para uma comparação entre diferentes espécies, sendo, porém raras dentro de uma mesma espécie (SHEN, 1998).

## 1.8 JUSTIFICATIVA E RELEVANCIA

No que se refere a plantas medicinais e fitoterápicos, é mister destacar a ampla e profunda revisão promovida recentemente no seu arcabouço regulatório pelo Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. As novas e rigorosas exigências, sobretudo relacionadas aos padrões de qualidade de processos e produtos, têm provocado fortes impactos no mercado como um todo, isto é, ao longo de toda cadeia produtiva. Dentre outras conseqüências, vieram à tona a fragilidade da base técnico-científica de parte considerável das empresas da área, fato reconhecido pelos especialistas (SIANI *et al.*, 2003).

Considerando a aprovação e a regulamentação da produção, distribuição e o uso de 71 plantas medicinais (BRASIL, 2010a), particularmente sob a forma de drogas vegetais no Sistema Único de Saúde (SUS), é necessário o desenvolvimento de metodologias efetivas para suportar programas de monitoramentos da qualidade destas plantas.

A relevância deste trabalho está pautada no estabelecimento (inicial) de um banco de “*fingerprint*” químico e/ou genético para utilização na identificação de uma espécie ou variedade vegetal dessas plantas disponibilizadas pelo SUS e a utilização deste banco de “*fingerprint*” na caracterização eficiente de matérias primas vegetais utilizadas na produção destes medicamentos.

Para este estabelecimento (inicial) foram escolhidas as plantas medicinais *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), *Maytenus ilicifolia* (Schrad)Planch (espinheira santa) e *Schinus terebenthifolia* Raddi (aroeira da praia) que fazem parte do grupo das 71 plantas medicinais do Anexo 1 da RDC nº 10.

## 1.9 FARMACOLOGIA E PRINCIPAIS CONSTITUÍNTES QUÍMICOS DAS PLANTAS ESCOLHIDAS PARA O ESTUDO

### 1.9.1 *Mikania glomerata* Sprengel (guaco)

O guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) é subarbusto silvestre (Figura 05), trepador de folhagem densa e perene. O caule é cilíndrico e ramificado. As flores são pecioladas, cordiforme-deltóides, oval-lanceoladas, tri-ou pentanervadas, agudas no ápice. O guaco é uma planta medicinal brasileira empregada em medicamentos para tosse e problemas respiratórios (PANIZZA, 1997). Encontra-se comercializado, principalmente nas formas farmacêuticas de extrato fluido, tintura e xarope. Amplamente utilizada na medicina popular como remédio para aliviar tosse, bronquite e resfriado (DI STASI *et al.*, 1994; PANIZZA, 1997).

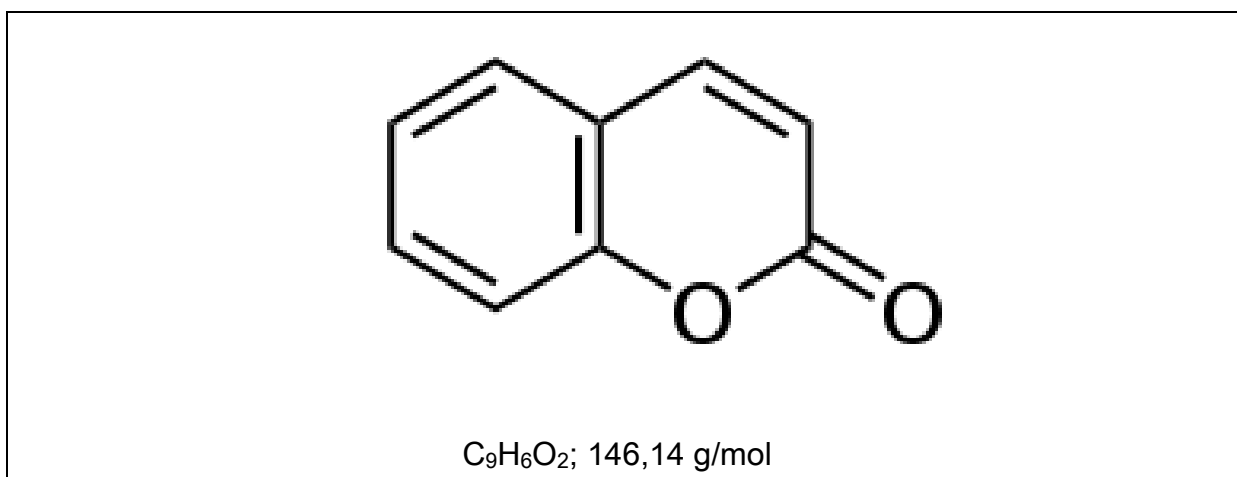
**Figura 05:** *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro



Esta espécie possui atividades bronco-pulmonar; espasmolítica e antiinflamatória; analgésica e antimicrobiana. Entre os componentes químicos principais está a cumarina (usada como marcador) (Figura 06). As cumarinas são lactonas do ácido o-hidroxi-cinâmico. São amplamente distribuídos nos vegetais, como o guaco e a castanha da Índia, (muito utilizada contra varizes), emburana, agrião, cumaru e canela, entre outras, e em frutas como morango, cereja e damasco. Possuem um odor forte e característico de baunilha, sendo amplamente

utilizadas como aromatizantes de produtos industrializados e como fixadores de perfumes. Apresentam atividade antibiótica, broncodilatadora, fungicida, anticoagulante, vasodilatadora, espasmolítica e antitrombótica. A cumarina tem sido usada também como aromatizante de fumos e algumas bebidas alcoólicas, embora seja proibido o seu uso como flavorizante de alimentos, em razão de sua possível hepatotoxicidade (GILBERT, 2005).

**Figura 06:** Cumarina



#### 1.9.2 *Maytenus ilicifolia* (Schrad)Planch (espinheira santa)

A espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* (Schrad)Planch) é um subarbusto ou árvore de pequeno porte (Figura 07), perene, freqüentemente ramificado desde a base, medindo cerca de 3 a 5 cm de altura. Ocorre, predominantemente, no sub-bosque de remanescentes da Floresta Ombrófila Mista na região sul do Brasil e nos países vizinhos, Paraguai, Uruguai e Leste da Argentina (CARVALHO & OKANO, 1992). Na Floresta Ombrófila Densa Atlântica parece estar restrita às porções superiores da Serra do Mar (KLEIN, 1968).

**Figura 07:** *Maytenus ilicifolia* (Schrad)Planch (espinheira santa) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro



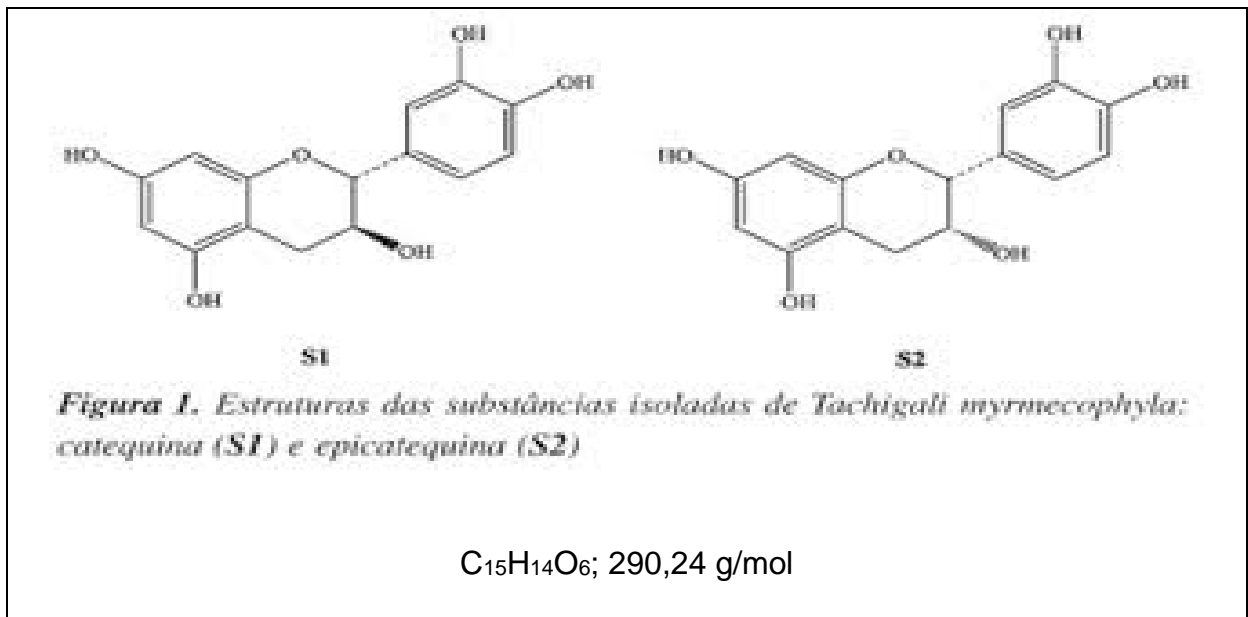
As folhas desta espécie possuem ampla e consagrada utilização popular, principalmente para combater displasias, gastralgias hiperclorídricas; como analgésico (úlceras gástricas, pilóricas e duodenais) e anti-flatulência (CONCEIÇÃO, 1987) e anti-ulcerogênico (PEREIRA, 1993).

Os taninos condensados, que são formados por unidades de catequina unidas entre si por ligações entre o carbono 3 de uma unidade e o carbono 8 de outra unidade, são apontados como constituintes químicos majoritários em extratos aquosos de *Maitenus ilicifolia*, além da Rutina eles são utilizados como marcadores no controle de qualidade de extratos e de medicamentos fitoterápicos (PESSUTO, 2006).

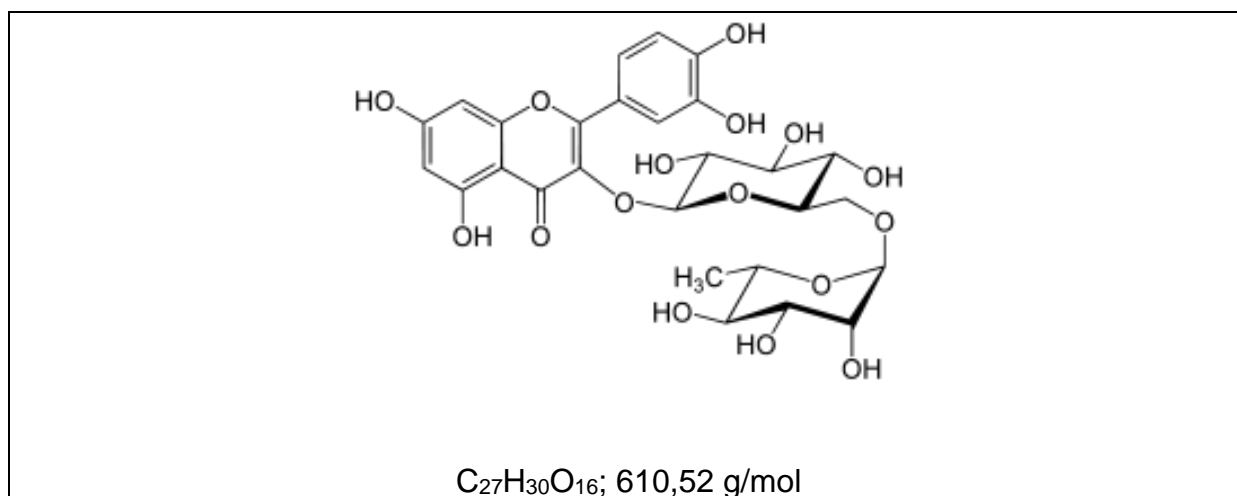
Catequina (Figura 08; S1) é um fitonutriente da família dos polifenóis, e tem uma forte acção antioxidante. Está presente de forma natural em alguns alimentos. Inúmeros estudos demonstram que os polifenóis presentes na planta do chá verde (*Camellia sinensis*) apresentam propriedades que actuam de forma benéfica em algumas doenças como a diabetes mellitus tipo 1, as cardiopatias, as infecções virais, as inflamações em doenças degenerativas ou mesmo o cancro e o envelhecimento, sua composição inclui epicatequinas (EC)(Figura 08; S2),

epicatequinas gallate (ECG), epigallocatechin (EGC) e epigallocatechin gallate (EGCG), sendo que este último é o mais abundante no chá e o que merece maior atenção do ponto de vista farmacológico. As catequinas são incolores, solúveis na água e não existem referências de contra-indicação para a saúde.

**Figura 08:** Catequina e epicatequina



A rutina (Figura 09) é um bioflavonóide solúvel em metanol, também conhecida como Vitamina P., descoberta em 1936 pelo bioquímico húngaro Albert Szent-Györgyi. As principais fontes são os vegetais folhosos e frutas cítricas, como por exemplo: o trigo-sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), Uncária (*Uncaria eliptica*), nas folhas e pecíolos das espécies do género *Rheum* e no fruto da árvore brasileira Fava-d'Anta (*Dimorphandra mollis*). Sua ação é de antfragilidade capilar, fortalecendo os capilares reduz os sintomas de hemofilia e previne edemas nas pernas e sua carência provoca o aparecimento de microvarizes e problemas vasculares.

**Figura 09:** Rutina

### 1.9.3 *Schinus terebenthifolia* Raddi (aroeira da praia)

A *Schinus terebenthifolia* Raddi (aroeira da praia) é uma árvore mediana de 5 a 10 metros de altura tendendo a dominar a custo de outras espécies (Figura 10). Copa larga, o tronco pode chegar a de 30 a 60 cm de diâmetro com casca grossa. Folhas compostas de 3 a 10 pares de folíolos imparipinados, aromáticos medindo de 3 a 5 cm de comprimento por 2 a 3 cm de largura (LORENZI & MATOS, 2008).

**Figura 10:** *Schinus terebenthifolia* Raddi (aroeira da praia) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro

Segundo Gilbert & Favoreto (2011) a *Schinus terebinthifolius* Raddi possui atividades antialérgica e anti-inflamatória; antibacteriana e antifúngica; antioxidante;

antiulcerogênica; cicatrizante; aplicações em odontologia; atividades anticâncer; atividade inseticida e acaricida.

Galatos de metila e etila foram identificados no extrato etanólico das folhas (CERUKS *et al*, 2007). O ácido gálico e pentagaloilglicose também foram achados no extrato metanólico das folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi (CARVALHER-MACHADO *et al*, 2008). Polifenóis foram isolados das folhas, mas apenas um, isoquercitrina (Figura 12), foi identificada (QUEIRES *et al*, 2006).

O ácido gálico (Figura 11) é um ácido orgânico, também conhecido como ácido 3,4,5-triidroxibenzóico, encontrado na noz-de-galha, no sumagre, na hamamélis, nas folhas de chá, no súber do carvalho, e outras plantas, sendo encontrado na forma livre e também como parte de taninos. Sais e ésteres de ácido gálico são denominados galatos, apesar de seu nome, não contém gálio, usado como um padrão para a quantificação de fenol em diversos analitos pelo reagente de Folin-Ciocalteu; os resultados são dados em equivalentes de ácido gálico. Seu uso é frequente na indústria farmacêutica para síntese de fármacos, ele também pode ser usado para sintetizar o alcalóide alucinógeno mescalina.

Figura 11: Ácido gálico

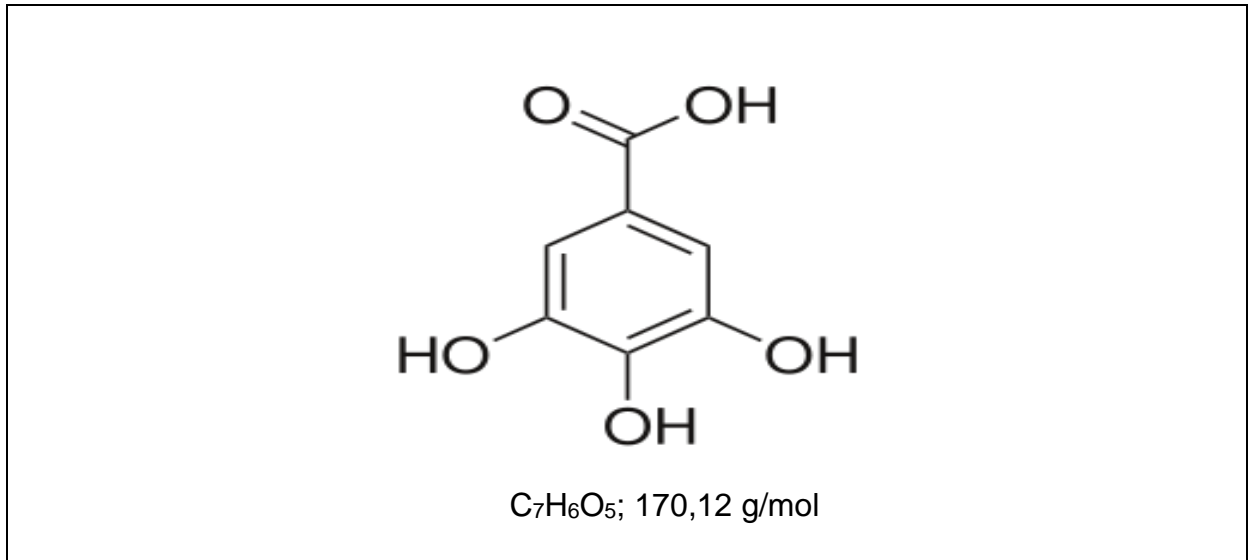
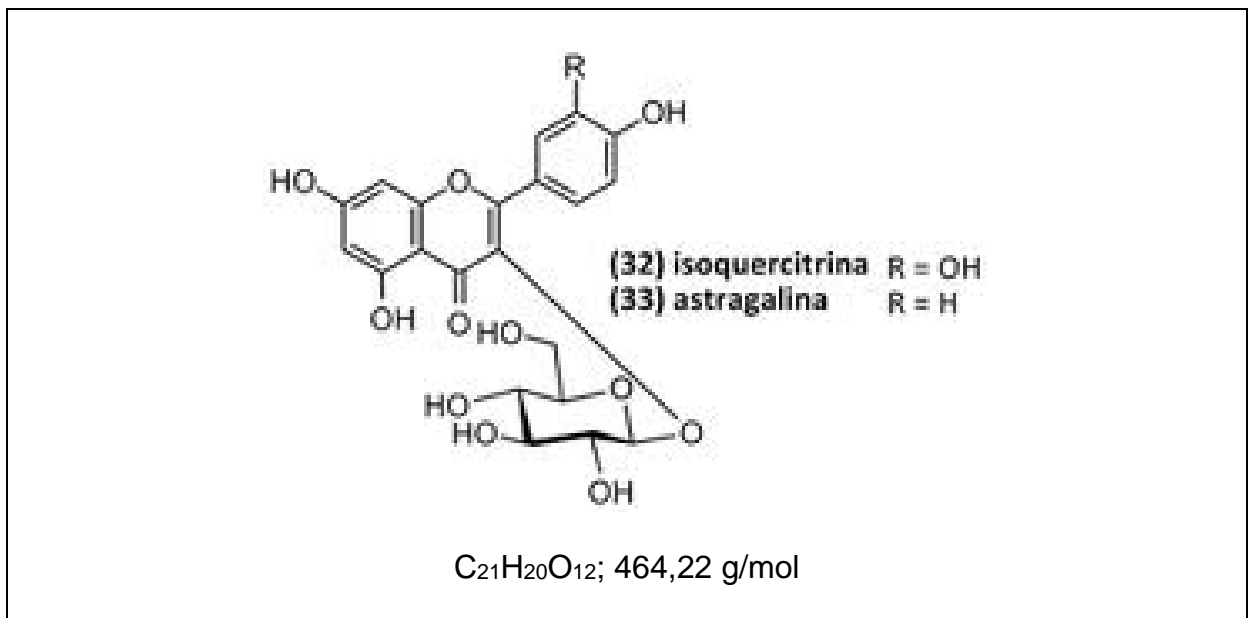


Figura 12: Isoquercitrina







## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Considerando a aprovação e a regulamentação da produção, distribuição e o uso de 71 plantas medicinais, particularmente, sob a forma de drogas vegetais regulamentadas no Sistema Único de Saúde (SUS), pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (CARVALHO, 2008). Este trabalho teve por objetivo principal a formulação de procedimentos genéticos e químicos capazes de caracterizar as 3 espécies de plantas medicinais regulamentadas pelo Sistema Único de Saúde do Brasil: a *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), a *Maytenus ilicifolia* (Schrad) Planch (espinheira santa) e a *Schinus terebenthifolia* Raddi (aroeira da praia), contribuindo desta forma para a avaliação da qualidade das matérias primas vegetais utilizadas na fabricação dos medicamentos fitoterápicos no Brasil.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

No primeiro estudo demonstrar a utilização da técnica de RAPD-PCR na identificação através do desenvolvimento de “*fingerprints*” genético das 3 espécies de plantas medicinais do Rio de Janeiro.

No segundo estudo demonstrar a utilização da técnica de RAPD-PCR na comparação dos “*fingerprints*” genético da mesma espécie de planta medicinal de localidade diferente, *Mikania glomerata* (guaco) do Paraná e do Rio de Janeiro.

No terceiro estudo demonstrar a utilização das técnicas cromatográficas (CLAE/UV e CG/DIC) na identificação através do desenvolvimento de “*fingerprints*” químico das 3 espécies de plantas medicinais do Rio de Janeiro.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PREPARAÇÃO DO “fingerprint” GENÉTICO

##### 3.1.1 Origem dos DNA utilizados nos estudos

As folhas das três espécies de plantas estudadas foram obtidas por meio de coletas provenientes da Coleção Temática de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e uma amostra da planta (folhas) *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) foi obtida do Horto Refúgio Biológico Bela Vista no Paraná. As folhas foram colocadas em sacos seláveis de polietileno, transportadas para o laboratório do Setor de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da Fiocruz. As folhas foram desinfetadas com álcool (70% v/v), em seguida, lavadas com água esterilizada e álcool (96% v/v) e mantidas congeladas à - 20 °C até a extração do DNA.

##### 3.1.2 Isolamento do DNA Genômico

O DNA genômico foi isolado a partir de amostras de folhas que foram desinfetadas. Retiraram-se as partes duras e as nervuras das folhas. As amostras foram colocadas em um gral estéril contendo nitrogênio líquido, completamente moídas, com auxílio de um pistilo estéril e, em seguida, submetidas à extração de DNA. Na extração do DNA do guaco foram utilizados os detergentes Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS 20% m/v) (CARDARELLI, 2005). A massa de 150 mg do material moído foi extraída com 1000 µL de detergente CTAB (20 g CTAB/L; 1,4 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl; 20 mM EDTA, pH 8,0) e aquecida a 65 °C, em banho seco durante 90 minutos e posteriormente centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos. Em 500 µL de sobrenadante foram

adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e, após centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Neste tubo foi adicionado tampão de precipitação CTAB (5 g CTAB/L; 40 mM NaCl; pH 8,0). Foi incubado à temperatura ambiente, por 90 minutos e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi dissolvido em NaCl (1,2 M) e de 350  $\mu\text{L}$  de clorofórmio foram adicionados. Após nova centrifugação, a 14000 rpm por 10 minutos o sobrenadante foi tratado com igual volume de álcool isopropílico resfriado a 0 °C. O tubo foi incubado por 24 h a - 20 °C, em seguida, foi centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o precipitado foi seco à temperatura ambiente. Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de água esterilizada. O material foi deixado por 24 h a 4 °C e, posteriormente, ressuspendido com leve agitação. Na extração do DNA da espinheira santa e aroeira-da-praia foi utilizado uma solução de CTAB com  $\beta$ -mercaptoetanol. Este protocolo utiliza PVPP (polivinilpolipyrrolidona) a 2 % (m/v) em água para eliminar produtos interferentes nas reações de PCR (ALDRICH & CULLIS, 1993). A massa de 150 mg do material moído foi extraída, com 700  $\mu\text{L}$  de tampão de extração EB CTAB (para 100 mL de tampão: 2 g CTAB/L; 2 g PVPP; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA pH 8,0; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mL mercaptoetanol) e aquecida a 65 °C, em banho seco durante 120 minutos e, posteriormente, centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos. A 500  $\mu\text{L}$  de sobrenadante foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v), com agitação por 5 minutos. Após centrifugação, a 14000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Neste tubo foi adicionado isopropanol (2/3 do volume de sobrenadante). O tubo foi incubado à temperatura ambiente por 90 minutos e após centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos o precipitado foi lavado com tampão WB (76 % Etanol; 10 mM acetato de amônia). Após secagem ao ar, o resíduo foi ressuspendido com 300

$\mu\text{L}$  de TE 1 X (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0). Foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de RNase (10 mg/mL) e o tubo foi incubado por 30 minutos a 37 °C. Adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de solução de NaCl (5 M) e o resíduo foi precipitado com 2/3 do volume do conteúdo com etanol resfriado a 0 °C (absoluto). O tubo foi novamente incubado por 20 minutos a -20 °C e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi seco à temperatura ambiente. A seguir foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de água esterilizada e o material foi deixado por 24 h a 4 °C e, posteriormente, ressuspendido com leve agitação.

### 3.1.3 Avaliação da concentração e da pureza do DNA extraído

Para visualização dos fragmentos de DNA foi preparado um gel contendo 1% de agarose em tampão TBE 1X, adicionado de 3  $\mu\text{L}$  de brometo de etídio. Foi feita uma homogeneização de 5  $\mu\text{L}$  de DNA (concentrado), 5  $\mu\text{L}$  de água e 3  $\mu\text{L}$  corante e em seguida, uma aplicação em um poço do gel. Para acompanhar a eletroforese foram aplicados em dois poços 7  $\mu\text{L}$  de padrão 1 Kb. A eletroforese foi desenvolvida por 50 minutos, com voltagem de 85 V, em cuba apropriada para eletroforese. As imagens foram obtidas no ImageQuant 300/350/400/RT ECL. A estimativa da concentração do DNA extraído das plantas de referência foi realizada através da medida espectrofotométrica da densidade ótica (DO) a 260nm ( $A_{260}$ ) e 280nm ( $A_{280}$ ) em espectrofotômetro GeneQuant pro (Amersham Biosciences) e a pureza verificada através da relação entre  $A_{260} / A_{280}$  e  $A_{260} / A_{230}$ .

### 3.1.4 Iniciadores (primers) utilizados

Para padronizar o protocolo de RAPD, amostras de DNA das três espécies foram estudadas inicialmente com 60 iniciadores (Operon Technology and Life

Biosynthesis Incorporated). A Tabela 02 mostra a sequência de bases destes iniciadores.

**Tabela 02:** Sequência de bases dos 60 iniciadores usados no trabalho (Operon Technology and Life Biosynthesis Incorporated)

PRIMER	SEQUÊNCIA	PRIMER	SEQUÊNCIA	PRIMER	SEQUÊNCIA
OPA-01	CAGGCCCTTC	OPC-01	TTCGAGCCAG	OPG-01	CTACGGAGGA
OPA-02	TGCCGAGCTG	OPC-02	GTGAGGCGTC	OPG-02	GGCACTGAGG
OPA-03	AGTCAGCCAC	OPC-03	GGGGGTCTTT	OPG-03	GAGCCCTCCA
OPA-04	AATCGGGCTG	OPC-04	CCGCATCTAC	OPG-04	AGCGTGTCTG
OPA-05	AGGGGTCTTG	OPC-05	GATGACCGCC	OPG-05	CTGAGACGGA
OPA-06	GGTCCCTGAC	OPC-06	GAACGGACTC	OPG-06	GTGCCTAACC
OPA-07	GAAACGGGTG	OPC-07	GTCCCGACGA	OPG-07	GAACCTGCGG
OPA-08	GTGACGTAGG	OPC-08	TGGACCGGTG	OPG-08	TCACGTCCAC
OPA-09	GGGTAACGCC	OPC-09	CTCACCGTCC	OPG-09	CTGACGTCAC
OPA-10	GTGATCGCAG	OPC-10	TGTCTGGGTG	OPG-10	AGGGCCGTCT
OPA-11	CAATCGCCGT	OPC-11	AAAGCTGCGG	OPG-11	TGCCCGTCGT
OPA-12	TCGGCGATAG	OPC-12	TGTCATCCCC	OPG-12	CAGCTCACGA
OPA-13	CAGCACCCAC	OPC-13	AAGCCTCGTC	OPG-13	CTCTCCGCCA
OPA-14	TCTGTGCTGG	OPC-14	TGCGTGCTTG	OPG-14	GGATGAGACC
OPA-15	TTCCGAACCC	OPC-15	GACGGATCAG	OPG-15	ACTGGGACTC
OPA-16	AGCCAGCGAA	OPC-16	CACACTCCAG	OPG-16	AGCGTCCTCC
OPA-17	GACCGCTTGT	OPC-17	TTCCCCCAG	OPG-17	ACGACCGACA
OPA-18	AGGTGACCGT	OPC-18	TGAGTGGGTG	OPG-18	GGCTCATGTG
OPA-19	CAAACGTCGG	OPC-19	GTTGCCAGCC	OPG-19	GTCAGGGCAA
OPA-20	GTTGCGATCC	OPC-20	ACTTCGCCAC	OPG-20	TCTCCCTCAG

### 3.1.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (RAPD-PCR)

No presente estudo, para aumentar a reprodutibilidade foi utilizado o “kit Ready-To-Go RAPD Analysis Bead” (Amersham Biocsciences), especialmente desenvolvido para reações de RAPD. Este Kit é composto por 100 reações individuais, que se apresentam sob a forma de esferas liofilizadas, denominadas beads, contidas em tubos de 500 µl. Cada bead é composto por enzimas DNA Polimerase termoestáveis (AmpliTaQ™ DNA Polymerase e Stoffel Fragment), 0,4 mM de cada dNTP (sendo 25 µl de volume de reação), 2,5 µg de BSA e tampão (3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 30 mM de KCl e 10 mM Tris (pH 8,3)) sendo 25 µl de volume de reação. Para sua utilização, foram feitos ajustes em relação ao ciclo de reação e em relação às concentrações dos iniciadores e das amostras de DNA utilizadas. No

primeiro estudo foram utilizados 60 iniciadores com cada DNA das três plantas de espécies diferentes: OPA (1 a 20), OPC (1 a 20) e OPG (1 a 20) (Operon Technology and Life Biosynthesis Incorporated). No segundo estudo foram utilizados 9 iniciadores com cada DNA da planta de mesma espécie de localidade diferente (PR e RJ): OPA 0(1, 10 e 17); OPC (9, 11 e 19); OPG (3, 5 e 6) (Operon Technology and Life Biosynthesis Incorporated). A otimização referente à diluição do DNA e à avaliação da repetibilidade e reprodutibilidade da Reação em Cadeia pela Polimerase (RAPD-PCR), com “bead” foi realizada através de RAPD-PCR, utilizando o DNA do guaco de procedência do Rio de Janeiro usando o DNA concentrado (após a extração) e o DNA diluído 10 vezes com os iniciadores OPA 1 e OPA 10. As reações de RAPD-PCR foram realizadas homogenizando 15 µL de água (grau BM), uma “bead”, 5 µL de iniciador diluído e 5 µL de DNA diluído (10 vezes), sendo a quantidade de DNA entre 25 e 50 ng para as três espécies. As condições da termociclagem foram: um ciclo de 95 °C por 5 minutos; seguido de 45 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 36 °C por 1 minuto e 72 °C durante 2 minutos; extensão final a 72°C por 7 minutos. Para visualização dos fragmentos da RAPD-PCR foi preparado um gel contendo 2% (p/v) de agarose em tampão TBE pH 8,0 contendo de 3 µL de brometo de etídio (10 mg/mL). A eletroforese foi desenvolvida por 120 minutos a tensão constante de 85 V em cuba apropriada. As Imagens foram obtidas no ImageQuant 300/350/400/RT ECL.

### 3.1.6 Análise de dados

#### 3.1.6.1 *Primeiro estudo*

Foram determinados o número de fragmentos visíveis a olho nu com intensidade média e alta no RAPD-PCR do DNA de cada espécie de planta



medicinal e o total de fragmentos das 3 espécies utilizando os 60 iniciadores do estudo (COLLARD & MACKILL, 2009). Foram selecionados três iniciadores para cada espécie de planta medicinal, que geraram entre 200 e 1100 pb: zero fragmento (iniciador ausência de fragmento), quando não foi encontrado este tipo de iniciador. Foi escolhido o iniciador que gerou o menor número de fragmentos (iniciador mínimo de fragmento); um único fragmento (iniciador fragmento específico); o maior número de fragmentos (iniciador máximo de fragmentos). Foram selecionados, também, dois iniciadores que produziram fragmentos distintos (iniciador fragmentos distintos) para as três espécies de plantas do estudo, com os cinco iniciadores selecionados foram gerados um perfil genético inequívoco (“fingerprint”) para cada espécie de planta. Foi gerada uma matriz, onde os fragmentos RAPD-PCR foram pontuados como ausência de fragmento (0), presença de um fragmento (1). Em alguns intervalos de 100 pb houve a presença de dois fragmentos (1,1) e presença de três fragmentos (1,1,1). Os perfis obtidos, utilizando os iniciadores que produziram fragmentos distintos (iniciador fragmentos distintos) para as três espécies de plantas, foram comparados par a par, através dos cálculos do coeficiente de dissimilaridade  $((b+c)/(2a+b+c))$  e dos coeficientes de similaridade Sorensen-Dice  $(2a/(2a+b+c))$ , sendo  $a=1,1$  (presença de banda de mesmo peso molecular nos perfis comparados);  $b=1,0$  e  $c=0,1$  (bandas distintas) e  $d=0,0$  (ausência de banda de mesmo peso molecular nos perfis comparados) (EMYGDIO *et al*, 2003).

### 3.1.6.2 Segundo estudo

Foram determinados o número de fragmentos visíveis a olho nu com intensidade média e alta no RAPD-PCR do DNA de cada planta medicinal da mesma espécie de localidade diferente e o total de fragmentos entre 200 e 1100 pb

utilizando os 9 iniciadores do estudo (COLLARD & MACKILL, 2009). Foi gerada uma matriz, onde os fragmentos RAPD-PCR foram pontuados como ausência de fragmento (0) e presença de um fragmento (1). Os perfis obtidos para as duas plantas foram comparados par a par, e calculados os coeficientes de similaridade (%) de Jaccard ( $a/(a+b+c)$ ), Sorensen-Dice ( $2a/(2a+b+c)$ ), Ochiai ( $a/((a+b)(a+c))^{1/2}$ ) e Kulczynski 2 ( $1/2(a/(a+b)+a/(a+c))$ ), a dissimilaridade (%) entre os perfis obtidos ( $(b+c)/(2a+b+c)$ ) foi calculada, sendo  $a=1,1$  (presença de fragmento de mesmo peso molecular nos perfis comparados);  $b=1,0$  e  $c=0,1$  (fragmentos distintos) e  $d=0,0$  (ausência de fragmento de mesmo peso molecular nos perfis comparados) (EMYGDIO et al., 2003).

### 3.1.7 Equipamentos e insumos utilizados

Os estudos realizados para caracterização genética foram executados utilizando os equipamentos e insumos do Laboratório de Biologia Molecular e do Departamento de Microbiologia (Bloco 8) situado no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fiocruz. A Figura 13 mostra algumas fotografias dos equipamentos e insumos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

#### 3.1.7.1 Equipamentos utilizados

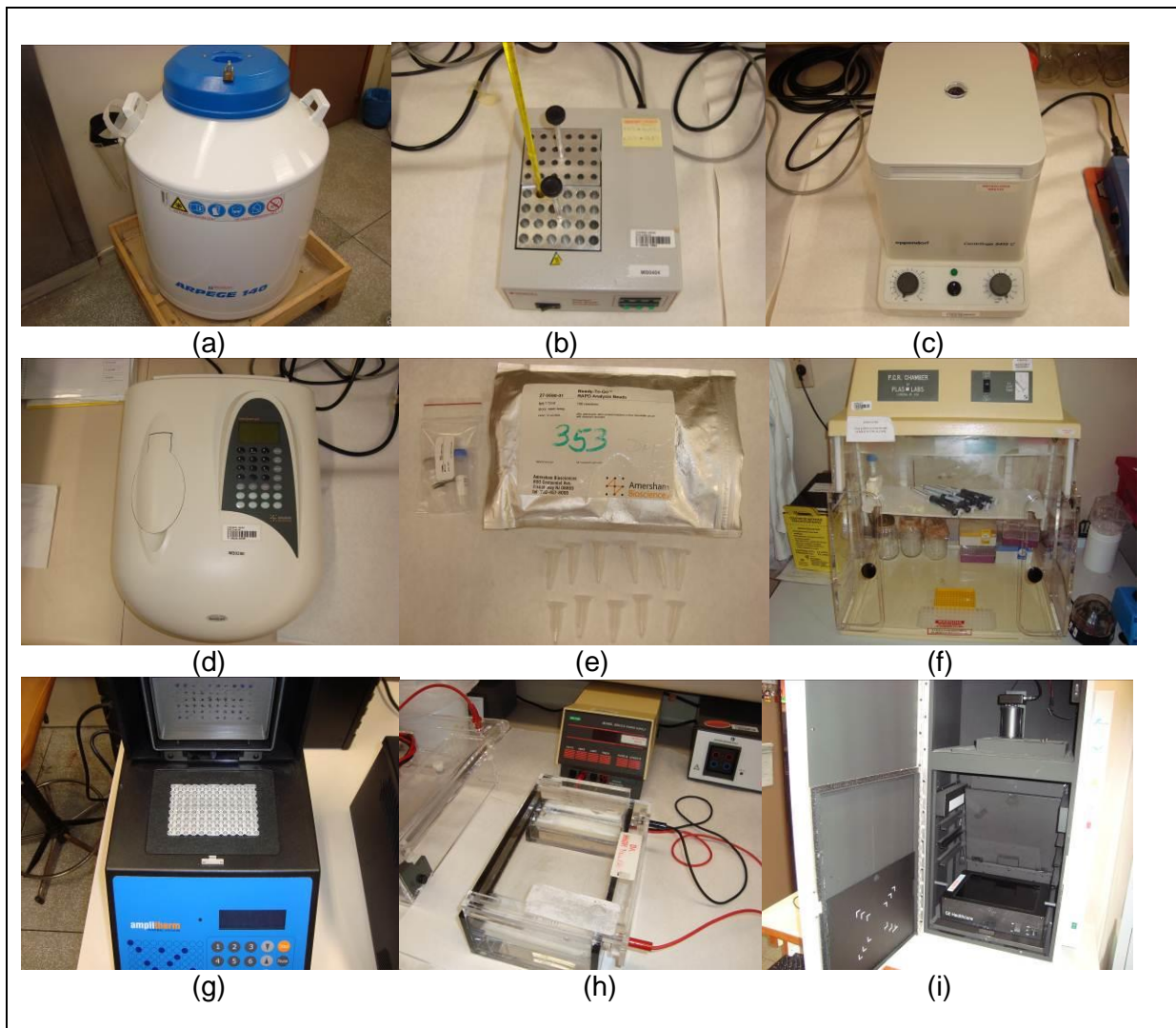
- I) Termociclador Amplither TX 96. Fabricante Thermal Cycles localizado no laboratório 112.
- II) Banho a seco Digital Dry Bath Incubator. Fabricante Boekel Scientific, localizado no laboratório 112.
- III) Centrifuga Refrigerada Excelsa 3, modelo 280. Fabricante Fanem São Paulo-Brasil, localizada no laboratório 113.

- IV) Centrífuga 5415. Fabricante Eppendorf, localizada no laboratório 112.
- V) Espectrofotômetro GeneQuant Pro UV/Vis. Fabricante Amersham Biosciences, Série 79000, localizado no laboratório 112.
- VI) Cabine de segurança para PCR. Fabricante PLAS LABS, localizada no laboratório 112.
- VII) Cuba para eletroforese localizada no laboratório 112.
- VIII) Transillumination ImageQuant 300. Fabricante GE, série 300/350/400/RT ECL, localizado no laboratório 113.

#### 3.1.7.2 *Insumos utilizados*

- I) Nitrogênio líquido. Fabricante Arpege 140.
- II) kit Ready-To-Go RAPD Analysis Bead. Fabricante Amersham Biocsciences, lote 17250.

**Figura 13:** Equipamentos e insumos utilizados no perfil genético: (a) nitrogênio líquido, (b) banho a seco, (c) centrifuga, (d) espectrofotômetro, (e) beads para RAPD, (f) cabine de segurança (g) termociclador, (h) cuba para eletroforese e (i) transillumination



## 3.2 PREPARAÇÃO DO “fingerprint” QUÍMICO

### 3.2.1 Origem das plantas utilizados nos estudos

As folhas das 3 espécies de plantas estudadas foram obtidas por meio de coletas provenientes da Coleção Temática de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. As folhas foram colocadas em

sacos seláveis de polietileno, transportadas para o laboratório do Setor de Medicamentos do Departamento de Química do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da Fiocruz. As folhas foram lavadas em água corrente até que todo o material estranho da superfície fosse retirado. Em seguida o material vegetal foi lavado com água destilada. O material foi seco em estufa, mantida sob controle de temperatura ( $38 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (FB 5ª ed, 2010). Após a secagem, as folhas foram transferidas para frascos âmbar e mantidas a temperatura controlada ( $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) no laboratório até a extração química.

### 3.2.2 Marcadores químicos utilizados

Os extratos das três espécies foram estudados com 6 marcadores. A Tabela 03 mostra o código no INCQS e a procedência dos marcadores.

**Tabela 03:** Marcadores químicos utilizados no estudo

<b><i>Planta</i></b>	<b><i>Marcador</i></b>	<b><i>Código no INCQS</i></b>	<b><i>Fabricante</i></b>
<b><i>Guaco</i></b>	Cumarina	MG 33	Merck
	Ácido gálico	ST 16	Sigma
<b><i>Aroeira</i></b>	Isoquercitrina	ST 5'	Roth
	Catequina	MI 42	Roth
<b><i>Espinheira</i></b>	Epicatequina	MI 21	Aldrich
	Rutina	USP	USP

A preparação dos marcadores: cumarina, ácido gálico, isoquercitrina, catequina, epicatequina e rutina, utilizados na caracterização das espécies e na adição nos extratos, esta descrita abaixo.

I) Marcador do guaco

a) Cumarina (MG 33)

Pesaram-se 10,72 mg de cumarina (MG 33). Foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  de diluente acetonitrila e água (1:1) em frasco de 1500  $\mu\text{L}$  (solução estoque). Foram

transferidos 40  $\mu\text{L}$  da solução estoque com auxílio da micropipeta e foram adicionados 960  $\mu\text{L}$  de diluente (diluição 1) e, em seguida, 182  $\mu\text{L}$  da diluição 1 e 818  $\mu\text{L}$  de diluente (diluição 2). A diluição 2 (Cumarina MG 33) foi injetada nos cromatógrafos à líquido e à gas.

## II) Marcadores da aroeira

### a) Ácido gálico (ST 16)

Pesaram-se 10,47 mg de ácido gálico (ST 16). Foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  diluente acetonitrila e água (1:1) em frasco de 1500  $\mu\text{L}$  (solução estoque). Foram transferidos 7  $\mu\text{L}$  da solução estoque com auxílio da micropipeta e foram adicionados 993  $\mu\text{L}$  de água (diluição 1). A diluição 1 (Ácido gálico ST 16) foi injetada nos cromatógrafos à líquido e à gas.

### b) Isoquercitrina (ST 5')

Pesaram-se 2,90 mg de isoquercitrina (ST 5') em balão volumétrico de 10,00 mL. Adicionou-se diluente (acetonitrila e água, 1:1) para completar o volume (solução estoque). Foram transferidos 48  $\mu\text{L}$  da solução estoque com auxílio da micropipeta e foram adicionados 952  $\mu\text{L}$  de diluente (diluição 1). A diluição 1 (Isoquercitrina ST 5') foi injetada nos cromatógrafos à líquido e à gas.

## III) Marcadores da espinheira

### a) Catequina (MI 42)

Pesaram-se 5,68 mg de catequina (MI 42). Foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  diluente acetonitrila e água (1:1) em frasco de 1500  $\mu\text{L}$  (solução estoque). Foram transferidos 33,3  $\mu\text{L}$  da solução estoque com auxílio da micropipeta e foram adicionados 966,7  $\mu\text{L}$  de diluente (diluição 1). A diluição 1 (Catequina MI 42) foi injetada nos cromatógrafos à líquido e à gas.

## b) Epicatequina (MI 21)

Pesaram-se 2,19 mg de epicatequina (MI 21). Foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  diluente acetonitrila e água (1:1) em frasco de 1500  $\mu\text{L}$  (solução estoque). Foram transferidos 50  $\mu\text{L}$  da solução estoque com auxílio da micropipeta e foram adicionados 950  $\mu\text{L}$  de diluente (diluição 1). A diluição 1 (Epicatequina MI 21) foi injetada nos cromatógrafos à líquido e à gas.

## c) Rutina (USP)

Pesaram-se 2,02 mg de rutina (USP). Foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  diluente acetonitrila e água (1:1) em frasco de 1500  $\mu\text{L}$  (solução estoque). Foram transferidos 50  $\mu\text{L}$  da solução estoque com auxílio da micropipeta e foram adicionados 950  $\mu\text{L}$  de diluente (diluição 1). A diluição 1 (Rutina USP) foi injetada nos cromatógrafos à líquido e à gas.

A Tabela 04 mostra as concentrações das soluções estoque e a da diluição de trabalho.

**Tabela 04:** Concentrações das soluções estoque e a da diluição de trabalho dos marcadores utilizados

	<i>Massa</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração</i>	<i>Diluição 1</i>	<i>Diluição 2</i>
	<i>(<math>\mu\text{g}</math>)</i>	<i>(<math>\mu\text{L}</math>)</i>	<i>(<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</i>	<i>(<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</i>	<i>(<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</i>
<i>Cumarina</i>	10720	1000	10,72	0,42880	0,07804
<i>Ácido gálico</i>	10470	1000	10,47	0,07329	-
<i>Isoquercitrina</i>	2900	10000	0,290	0,01392	-
<i>Catequina</i>	5680	1000	5,68	0,18914	-
<i>Epicatequina</i>	2190	1000	2,19	0,10950	-
<i>Rutina</i>	2020	1000	2,02	0,10100	-

### 3.2.3 Preparação dos extratos das plantas em água (infusão, extração e decocção diferenciada)

As amostras secas foram colocadas em placa de petri estéril, cortadas em pequenos pedaços, com auxílio de um estilete estéril. Em seguida, foi submetida à extração com água, nas preparações infusão e extrato, utilizando-se soxhlet (FB 5ª ed, 2010) e uma decocção diferenciada (a 60 °C por 60 minutos). Na extração por infusão, 2416,7 mg do guaco; 2256,9 mg de aroeira-da-praia e 2247,1 mg de espinheira-santa foram adicionados 100 mL de água tipo 1 em ebulição. Os frascos Becker, contendo os materiais, foram tampados com vidros de relógio e, após atingirem a temperatura ambiente, os conteúdos foram transferidos para balão volumétrico de 100 mililitros âmbar e, em seguida, os balões foram completados e os conteúdos homogeneizados. Na extração, utilizando soxhlet, 2270,6 mg do guaco; 1805,3 mg de aroeira-da-praia e 2229,0 mg de espinheira-santa foram transferidos para cartuchos soxhlet e extraídos com 200 mL de água tipo 1 em ebulição, com refluxo por quatro horas. Após atingirem a temperatura ambiente foram transferidos para balão volumétrico de 200 mililitros âmbar e, em seguida, foram completados e os conteúdos homogeneizados. Na extração por decocção diferenciada, 1020,5 mg do guaco; 1022,0 mg de aroeira-da-praia e 1027,2 mg de espinheira-santa foram adicionados a 100 mL de água tipo 1, à temperatura ambiente. Os frascos erlemayer, contendo os materiais, foram tampados e aquecidos em banho-maria por 60 minutos à temperatura controlada de  $60 \pm 2$  °C com agitação suave, por 30 segundos a cada 5 minutos. Em seguida, foram resfriados em água corrente até a temperatura ambiente. Os conteúdos foram transferidos para balão volumétrico de 100 mililitros âmbar e, em seguida, os balões foram completados e os conteúdos homogeneizados. As preparações por infusão (MGJB Inf, STJB Inf e MIJB Inf), por



extração (MGJB Ext, STJB Ext e MIJB Ext) e por decocção diferenciada (MGJB Dec 60C 60 min, STJB Dec 60C 60 min e MIJB Dec 60C 60 min) foram filtradas em membrana de 0,45 µm e transferidas para dois “vials” e injetadas em um cromatografo a líquido com detector UV/VIS com arranjo de diodos (DAD) usando métodos diferentes (método 1 e método 2) e em um cromatógrafo a gás com detector DIC (método 3). A Tabela 05 mostra as concentrações das soluções dos extratos das plantas em água.

**Tabela 05:** Concentrações do material vegetal (em água)

		<b>Massa (mg)</b>	<b>Balão (mL)</b>	<b>Concentração (mg/mL)</b>
<b>Guaco (MGJB)</b>	Infusão	2416,7	100	24,167
	Extração	2270,6	200	11,353
	Dec 60C 60 min	1020,5	100	10,205
<b>Aroeira (STJB)</b>	Infusão	2256,9	100	22,569
	Extração	1805,3	200	9,0265
	Dec 60C 60 min	1022,0	100	10,220
<b>Espinheira (MIJB)</b>	Infusão	2247,1	100	22,471
	Extração	2229,0	200	11,145
	Dec 60C 60 min	1027,2	100	10,272

3.2.4 Preparação dos extratos das plantas em água (infusão, extração e decocção diferenciada) adicionados de marcadores

I) Extratos do guaco (MGJB):

Foram adicionados 5,5 µL da solução estoque de cumarina (ver 3.2.2) em 994,5 µL dos extratos de guaco por Infusão (MGJB Inf AP2), por extração (MGJB Ext AP2) e por decocção diferenciada (MGJB Dec 60C 60 min AP2). Estas preparações foram filtradas em membrana de 0,45 µm para um “vial” e injetadas em um cromatografo a líquido com detector UV/VIS com arranjo de diodos (DAD) em dois métodos distintos (método 1 e método 2).

## II) Extratos da aroeira (STJB):

Foram adicionados, 17  $\mu\text{L}$  da solução estoque de ácido gálico (ver 3.2.2) e 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque de isoquercitrina (ver 3.2.2) em 883  $\mu\text{L}$  de extrato de aroeira por Infusão (STJB Inf AP); 3  $\mu\text{L}$  da solução estoque de ácido gálico e 20  $\mu\text{L}$  da solução estoque de isoquercitrina em 977  $\mu\text{L}$  de extrato de aroeira por extração (STJB Ext AP) e 4  $\mu\text{L}$  da solução estoque de ácido gálico e 27  $\mu\text{L}$  da solução estoque de isoquercitrina em 969  $\mu\text{L}$  de extrato de aroeira por decocção diferenciada (STJB Dec 60C 60 min AP). Estas preparações foram filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  para um “vial” e injetadas em um cromatografo a líquido com detector UV/VIS com arranjo de diodos (DAD), usando dois métodos distintos (método 1 e método 2).

## III) Extratos da espinheira:

Foram adicionados: 45  $\mu\text{L}$  da solução estoque de catequina (ver 3.2.2), 40  $\mu\text{L}$  da solução estoque de epicatequina (ver 3.2.2) e 20  $\mu\text{L}$  da solução estoque de rutina (ver 3.2.2) em 895  $\mu\text{L}$  de extratos de espinheira por Infusão (MIJB Inf AP), por extração (MIJB Ext AP2) e por decocção diferenciada (MIJB Dec 60C 60 min AP2). Estas preparações foram filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  para um “vial” e injetadas em um cromatografo a líquido, com detector UV/VIS com arranjo de diodos (DAD), utilizando dois métodos diferentes (método 1 e método 2).

A Tabela 06 mostra os volumes das soluções estoques dos marcadores adicionados aos extratos.

**Tabela 06:** Volumes das soluções estoques dos marcadores adicionados aos extratos do estudo

		<i>cumarina</i>	<i>ác. gálico</i>	<i>isoquercitrina</i>	<i>catequina</i>	<i>epicatequina</i>	<i>rutina</i>
		( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )	( $\mu\text{L}$ )
	Infusão	5,5	-	-	-	-	-
<b>Guaco</b>	Extração	5,5	-	-	-	-	-
<b>(MGJB)</b>	Dec 60C	5,5	-	-	-	-	-
	Infusão	-	17	100	-	-	-
<b>Aroeira</b>	Extração	-	3	20	-	-	-
<b>(STJB)</b>	Dec 60C	-	4	27	-	-	-
	Infusão	-	-	-	45	40	20
<b>Espinheira</b>	Extração	-	-	-	45	40	20
<b>(MIJB)</b>	Dec 60C	-	-	-	45	40	20

### 3.2.5 Preparação da mistura de marcadores (MIX pad) e da curva analítica: ácido gálico, catequina, epicatequina, cumarina e rutina

I) Preparação individual dos marcadores cumarina, ácido gálico, catequina, epicatequina e rutina utilizados na preparação da mistura de marcadores (MIX pad).

Todas as diluições foram injetadas no cromatógrafo a líquido (método 2).

#### a) Cumarina (MG 33)

Pesaram-se 10,72 mg de cumarina (MG 33). Foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  diluente acetonitrila e água (1:1) em frasco de 1500  $\mu\text{L}$  (solução estoque). Foram transferidos 6  $\mu\text{L}$  da solução estoque com auxílio da micropipeta e foram adicionados 1494  $\mu\text{L}$  de água (diluição 1).

#### b) Ácido gálico (ST 16)

Pesaram-se 10,47 mg de ácido gálico (ST 16). Foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  diluente acetonitrila e água (1:1) em frasco de 1500  $\mu\text{L}$  (solução estoque). Foram

transferidos 7,5  $\mu\text{L}$  da solução estoque com auxílio da micropipeta e foram adicionados 1492,5  $\mu\text{L}$  de água (diluição 1).

c) Catequina (MI 42)

Pesaram-se 5,68 mg de catequina (MI 42). Foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  diluente acetonitrila e água (1:1) em frasco de 1500  $\mu\text{L}$  (solução estoque). Foram transferidos 42  $\mu\text{L}$  da solução estoque com auxílio da micropipeta e foram adicionados 1458  $\mu\text{L}$  de água (diluição 1).

d) Epicatequina (MI 21)

Pesaram-se 2,19 mg de epicatequina (MI 21). Foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  diluente acetonitrila e água (1:1) em frasco de 1500  $\mu\text{L}$  (solução estoque). Foram transferidos 67,5  $\mu\text{L}$  da solução estoque com auxílio da micropipeta e foram adicionados 1432,5  $\mu\text{L}$  de água (diluição 1).

e) Rutina (USP)

Pesaram-se 2,02 mg de rutina (USP). Foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  diluente acetonitrila e água (1:1) em frasco de 1500  $\mu\text{L}$  (solução estoque). Foram transferidos 75  $\mu\text{L}$  da solução estoque com auxílio da micropipeta e foram adicionados 1425  $\mu\text{L}$  de água (diluição 1). A Tabela 07 mostra as concentrações dos marcadores nas soluções estoques e nas diluições.

**Tabela 07:** Concentrações das soluções estoque e a da diluição de trabalho dos marcadores utilizados

	<i>Massa</i> ( $\mu\text{g}$ )	<i>Volume</i> ( $\mu\text{L}$ )	<i>Concentração</i> ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	<i>Diluição 1</i> ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
<i>Cumarina</i>	10720	1000	10,72	0,04288
<i>Ácido gálico</i>	10470	1000	10,47	0,05235
<i>Catequina</i>	5680	1000	5,68	0,15940
<i>Epicatequina</i>	2190	1000	2,19	0,09855
<i>Rutina</i>	2020	1000	2,02	0,10100

## II) Preparação da mistura de marcadores (MIX pad)

Foram transferidos das soluções estoques dos marcadores: 7,5  $\mu\text{L}$  ácido gálico; 42,0  $\mu\text{L}$  de catequina; 67,5  $\mu\text{L}$  de epicatequina e 6,0  $\mu\text{L}$  de cumarina e foram adicionados 1377,0  $\mu\text{L}$  de água (MIX pad). A mistura de marcadores (MIX pad) foi injetada no cromatógrafo a líquido (método 2). A Tabela 08 mostra as concentrações dos marcadores na mistura.

**Tabela 08:** Concentrações dos marcadores na mistura (MIX pad)

	<i>Massa</i> ( $\mu\text{g}$ )	<i>Volume</i> ( $\mu\text{L}$ )	<i>Concentração</i> ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	<i>Diluição 1</i> ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
<b>Ácido gálico</b>	10470	1000	10,47	0,05235
<b>Catequina</b>	5680	1000	5,68	0,15940
<b>Epicatequina</b>	2190	1000	2,19	0,09855
<b>Cumarina</b>	10720	1000	10,72	0,04288

III) Curva analítica (estimada) da mistura de marcadores (MIX pad): ácido gálico, catequina, epicatequina e cumarina.

Foi injetada no cromatógrafo a líquido (método 2) dez volumes diferentes da mistura de marcadores (MIX pad). A Tabela 09 mostra as concentrações equivalentes aos volumes injetados, em relação ao nível 7. Para avaliação inicial foi gerada uma curva analítica para cada marcador considerando o intervalo do nível 2 ao nível 8 (sete níveis).

**Tabela 09:** Concentrações equivalentes aos volumes injetados da mistura de marcadores (MIX pad) utilizados na preparação da curva

	<b>Volume</b>	<b>Ácido gálico</b>	<b>Catequina</b>	<b>Epicatequina</b>	<b>Cumarina</b>
	<b>(1)</b>	<b>(2)</b>	<b>(3)</b>	<b>(4)</b>	<b>(5)</b>
	<b>(<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b><math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b><math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b><math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b><math>\mu\text{g/mL}</math></b>
<b>LD 1</b>	1	0,8725	2,6567	1,6425	0,71467
	1	0,8725	2,6567	1,6425	0,71467
<b>LD 2</b>	2	1,7450	5,3133	3,2850	1,42933
	2	1,7450	5,3133	3,2850	1,42933
<b>Nível 1</b>	5	4,3625	13,2833	8,2125	3,57333
	5	4,3625	13,2833	8,2125	3,57333
<b>Nível 2</b>	10	8,7250	26,5667	16,4250	7,14667
	10	8,7250	26,5667	16,4250	7,14667
<b>Nível 3</b>	20	17,450	53,1333	32,8500	14,2933
	20	17,450	53,1333	32,8500	14,2933
<b>Nível 4</b>	30	26,175	79,7000	49,2750	21,4400
	30	26,175	79,7000	49,2750	21,4400
<b>Nível 5</b>	40	34,900	106,267	65,7000	28,5867
	40	34,900	106,267	65,7000	28,5867
<b>Nível 6</b>	50	43,625	132,833	82,1250	35,7333
	50	43,625	132,833	82,1250	35,7333
<b>Nível 7</b>	60	52,350	159,400	98,5500	42,8800
	60	52,350	159,400	98,5500	42,8800
<b>Nível 8</b>	70	61,075	185,967	114,975	50,0267
	70	61,075	185,967	114,975	50,0267

**Legenda:** LD=limite de detecção 1 e 2; (2)=\$((1)/60) \times 52,350; (3)=\$((1)/60) \times 159,400; (4)=\$((1)/60) \times 98,5500; (5)=\$((1)/60) \times 42,8800

### 3.2.6 Preparação da mistura dos extratos das plantas em água (decoção diferenciada)

Foram preparadas quatro misturas de extratos (por decoção diferenciada) das plantas do estudo. As misturas dos extratos foram submetidas à técnica CLAE (método 2).

I) Misturaram-se 500  $\mu\text{L}$  do extrato do guaco com 500  $\mu\text{L}$  do extrato da espinheira (MIX MGJB+MIJB).

II) Misturaram-se 500 µL do extrato do guaco com 500 µL do extrato da aroeira (MIX MGJB+STJB)

III) Misturaram-se 500 µL do extrato da espinheira com 500 µL do extrato da aroeira (MIX MIJB+STJB)

IV) Misturaram-se 500 µL do extrato do guaco mais 500 µL do extrato da espinheira e 500 µL do extrato da aroeira (MIX MGJB+MIJB+STJB)

### 3.2.7 Preparação dos extratos das plantas em acetonitrila e tolueno (decoção diferenciada)

Na extração por decoção diferenciada, 1010,1 mg do guaco; 1025,2 mg de aroeira-da-praia e 1017,3 mg de espinheira-santa foram adicionados a 100 mL de acetonitrila (grau CLAE), à temperatura ambiente. Os frascos (erlemayer) contendo os materiais foram tampados e aquecidos em banho-maria por 60 minutos, à temperatura controlada de  $(60 \pm 2)$  °C, com agitação suave por 30 segundos a cada 5 minutos. Em seguida, foram resfriados em água corrente até a temperatura ambiente. Os conteúdos foram transferidos para balão volumétrico de 100 mililitros âmbar e, em seguida, os balões foram aferidos e homogeneizados. O mesmo procedimento acima foi seguido trocando-se a acetonitrila por tolueno e utilizando-se as seguintes massas: 1015,5 mg do guaco; 1007,2 mg de aroeira-da-praia e 1018,8 mg de espinheira-santa. As preparações foram filtradas em membrana de 0,45 µm para um “vial” e injetada em um cromatógrafo a gás com detector DIC (método 3). As Tabelas 10 e 11 mostram as concentrações do material vegetal (em acetonitrila e em tolueno) do estudo.

**Tabela 10:** Concentrações do material vegetal (em acetonitrila) do estudo

		<b>Massa</b> <b>(mg)</b>	<b>Balão</b> <b>(mL)</b>	<b>Concentração</b> <b>(mg/mL)</b>
<b>Guaco</b>	Dec 60C 60 min	1010,1	100	10,101
<b>Aroeira</b>	Dec 60C 60 min	1025,2	100	10,252
<b>Espinheira</b>	Dec 60C 60 min	1017,3	100	10,173

**Tabela 11:** Concentrações do material vegetal (em tolueno) do estudo

		<b>Massa</b> <b>(mg)</b>	<b>Balão</b> <b>(mL)</b>	<b>Concentração</b> <b>(mg/mL)</b>
<b>Guaco</b>	Dec 60C 60 min	1015,5	100	10,155
<b>Aroeira</b>	Dec 60C 60 min	1007,2	100	10,072
<b>Espinheira</b>	Dec 60C 60 min	1018,8	100	10,188

### 3.2.8 Condições cromatograficas utilizadas no estudo

Durante todo o estudo, foram tomados alguns cuidados. Verificou-se se o cromatógrafo a líquido estava com a qualificação e verificações dentro da validade, conforme o procedimento interno. Verificaram-se se as colunas usadas estavam dentro da validade e, as verificações estavam conforme o procedimento interno. Foram monitoradas as variações das temperaturas de ambiente do laboratório e de acondicionamento da coluna (30 e 50 °C). Foram monitoradas as variações da pressão na coluna durante todo o estudo. A pureza dos picos foram monitoradas com auxílio de um detector de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (espectrofotométrico) com conjunto de diodos (DAD).



## I) Método 1:

Os cromatogramas foram obtidos por CLAE UV-Vis, com detecção a 280 nm (guaco), 250 nm (aroeira) e 350 nm (espinheira). Os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis foram obtidos com auxílio de detector com arranjos de diodos (DAD). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e ATF 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40 µL (guaco), 60 µL (aroeira) e 40 µL (espinheira). A Tabela 12 mostra o gradiente utilizado.

**Tabela 12:** Gradiente utilizado no método 1

<i>Tempo (min)</i>	<i>Bomba A (ACN grau CLAE)</i>	<i>Bomba B (TFA 0,05 % v/v)</i>
<b>0 (início)</b>	5 %	95 %
<b>0 a 45</b>	95 %	5 %
<b>45 a 50</b>	5 %	95 %
<b>50 a 60</b>	5 %	95 %

## II) Método 2

Os cromatogramas foram obtidos por CLAE UV-Vis com detecção a 269 nm (espinheira), 280 nm (guaco) e 250 nm (aroeira). Os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis foram obtidos com auxílio de detector com arranjos de diodos (DAD). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e ATF 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL. A Tabela 13 mostra o gradiente utilizado.

**Tabela 13:** Gradiente utilizado no método 2

<b>Tempo (min)</b>	<b>Bomba A (Metanol grau CLAE)</b>	<b>Bomba B (TFA 0,05 % v/v)</b>
<b>0 (início)</b>	5 %	95 %
<b>0 a 45</b>	95 %	5 %
<b>45 a 50</b>	5 %	95 %
<b>50 a 60</b>	5 %	95 %

### III) Método 3

Os cromatogramas foram obtidos por CGAR-DIC. Condições cromatográficas do método 3: coluna 5 % fenil silicone, (5 µm de diâmetro do filme, 30 m x 0,25 mm d.i); gás carreador: N<sub>2</sub>; fluxo 1,0 mL/min; volume de injeção de 1,0 µL; programação de temperatura: 50 °C por 4 min; aumento de 50 °C/min até 300 min; mantendo a temperatura constante por 10 min.

#### 3.2.9 Análise de dados

A obtenção dos perfis dos componentes químicos (“fingerprint”) dos extratos das plantas foram detectados por meio de métodos cromatográficos CLAE e/ou CGAR (CALIXTO, 2000; MARSTON, 2007; GAO et al., 2006). Neste terceiro estudo inicialmente foi realizada uma infusão e uma extração em água, conforme preconizado na farmacopeia brasileira (FB 5<sup>a</sup> ed, 2010). Foi desenvolvido um sistema de extração por meio de uma decocção diferenciada, também em água, com detecção por CLAE/UV-Vis (método 1 e 2) e CGAR/DIC (método 3). Foi calculada a eficiência de cada modo de extração. Também foi realizada uma extração por meio de uma decocção diferenciada em acetonitrila e tolueno com detecção em CGAR/DIC. A detecção (CLAE/UV-Vis e CGAR/DIC) foi avaliada para cada forma de extração, objetivando gerar perfis cromatográficos com maior números de picos

resolvidos e com boa intensidade. Os perfis foram comparados com os cromatogramas dos marcadores específicos de cada planta, preparados individualmente. A identificação e a pureza de cada sinal referente ao marcador foi avaliada através de um detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD). Foi realizada uma adição de marcador específico aos extratos de cada planta. A pureza de cada sinal referente ao marcador adicionado foi também avaliada através do mesmo detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD). O cálculo da recuperação de cada marcador adicionado foi obtido e o teor de cada marcador na planta foi estimado. Foi preparada uma mistura de quatro marcadores das plantas em estudo e avaliada a faixa linear da resposta, através de uma estimativa da curva analítica, com sete níveis de concentrações (INMETRO, 2010; BAZILIO *et al*, 2012) de cada marcador contido na mistura. Foram preparadas quatro misturas dos extratos das plantas e estas foram comparadas ao extrato da mistura de marcadores.

### 3.2.10 Equipamentos e insumos utilizados

Os estudos realizados para caracterização química foram executados utilizando os equipamentos e insumos do Laboratório de Medicamentos e do Departamento de Química (Bloco 2 e 3) situado no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fiocruz. A Figura 14 mostra algumas fotografias dos equipamentos e insumos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

#### 3.2.10.1 Equipamentos utilizados

- I) Sistema de extração (manta, soxhlet e condensador)
- II) Cromatógrafo líquido de alta eficiência, fabricante Shimadzu com detector ultravioleta-visível (espectrofotométrico) com conjunto de diodos SPD-M10A, forno

CTO-20A, bomba LC-10AD e injetor automático SIL-20A. Programa usado para aquisição de dados Class-vp® (Departamento de Química do INCQS-Fiocruz, bloco 3, laboratório 115, número 3)

III) Cromatógrafo a gas CP-3380 com detector de ionização de chama (DIC). Fabricante Varian localizado no laboratório 115 (Departamento de Química do INCQS-Fiocruz, bloco 3, laboratório 115, número 1)

IV) Balança analítica com precisão de 0,01 mg, fabricante Mettler Toledo AX 205 (Departamento de Química do INCQS-Fiocruz, bloco 3, laboratório 116)

V) Sistema de purificação de água Milli-Q, fabricante Millipore modelo A-10 (Departamento de Química do INCQS-Fiocruz, bloco 3)

VI) Aparelho de ultrassom, fabricante Branson modelo 3210 (Departamento de Química do INCQS-Fiocruz, bloco 3)

#### 3.2.10.2 *Insumos utilizados*

I) Água grau CLAE (0,22 µm) (Milli-Q-Millipore)

II) Acetonitrila grau CLAE, fabricante Merck

III) Metanol grau CLAE, fabricante Merck

IV) Tolueno grau CLAE, fabricante Merck

V) Ácido trifluoracético grau PA, fabricante Merck

VI) Coluna Symmetry octadecilsilano (C18) 5 µm, (250 mm x 4,6 mm d.i), fabricante Waters lote W41821J

VII) Coluna LiChorosorb RP-select B octadecilsilano (C18) 5 µm, (250 mm x 4,0 mm d.i), fabricante Merck lote OB 310598

**Figura 14:** Equipamentos utilizados no perfil cromatográfico: (a): comatógrafo à líquido com detector UV/Vis com arranjos de fotodiodos; (b): comatógrafo à gas com detector



DIC



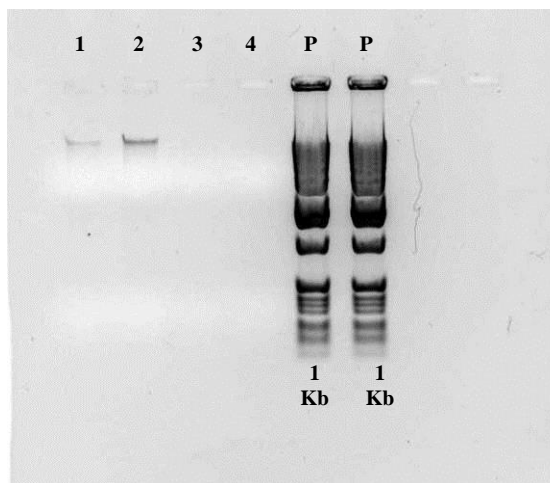
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RESULTADOS DA BIOLOGIA MOLECULAR

#### 4.1.1 Avaliação dos procedimentos adotados para extração do DNA

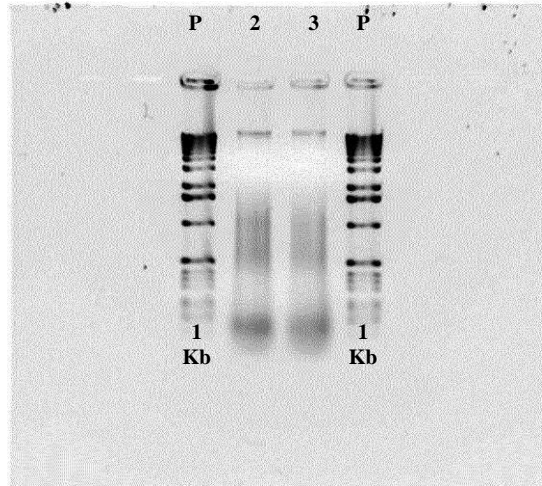
O Método de extração com CTAB (ISPRA) apresentou bom rendimento para a planta *Mikania glomerata*, sendo possível visualizar o DNA desta planta no gel de agarose, conforme as pistas 1 e 2. Entretanto, não foi obtido um bom rendimento para as plantas *Maytenus ilicifolius* e *Schinus terebinthifolius*. Não foi possível visualizar os DNA destas plantas no gel, conforme as pistas 3 e 4 (Figura 15).

**Figura 15:** Gel do DNA da *Mikania glomerata* (guaco), DNA da *Schinus terebinthifolius* (aroeira da praia) e DNA da *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, extração do DNA conforme protocolo com CTAB ISPRA; peso molecular 1 Kb. **Pista 1 e 2:** DNA da *Mikania glomerata* **Pista 3:** DNA da *Schinus terebinthifolia* **Pista 4:** DNA da *Maytenus ilicifolia* **Pistas P:** Padrão de 1 Kb



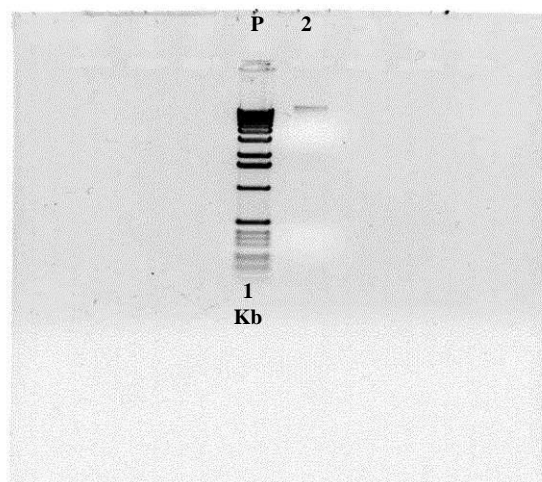
O Método de extração CTAB “DNA extraction from plant tissues (modified from: ALDRICH and CULLIS, 1993 – plant molecular biology reporte 11(2) 128-141)” apresentou bom rendimento para a planta *Maytenus ilicifolius*, mesmo antes de efetuar o processo de limpeza do DNA, conforme visualizado nas pistas 2 e 3 do gel de agarose (Figura 16).

**Figura 16:** Gel do DNA da *Maytenus ilicifólius* (espinheira santa) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, extração do DNA conforme protocolo CTAB DNA EXTRACTION FROM PLANT TISSUES; peso molecular 1 Kb; antes do processo de limpeza. **Pistas P:** Padrão de 1 Kb **Pista 2:** DNA concentrado *Maytenus ilicifólia*, replicata 1. **Pista 3:** DNA concentrado *Maytenus ilicifólia*, replicata 2



Após efetuado o processo de limpeza, os DNA extraídos nas duas replicatas foram misturados e aplicados em um novo gel de agarose, conforme pode ser visualizado na pista 2 (Figura 17). A limpeza do DNA por este protocolo demonstrou ser eficiente.

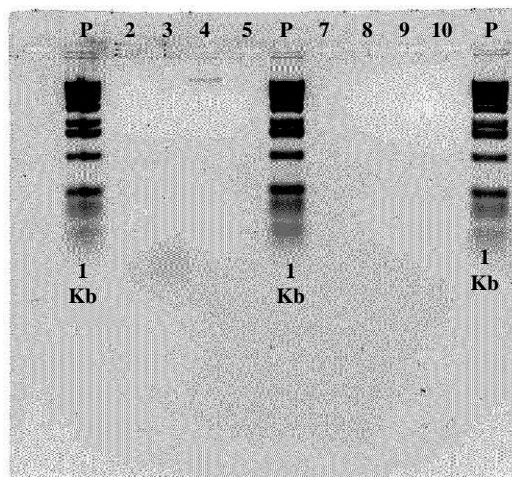
**Figura 17:** Gel do DNA da *Maytenus ilicifólius* (espinheira santa) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, extração do DNA conforme protocolo CTAB DNA EXTRACTION FROM PLANT TISSUES; peso molecular 1 Kb; após o processo de limpeza. **Pistas P:** Padrão de 1 Kb **Pista 2:** DNA concentrado *Maytenus ilicifólius*





O Método de extração CTAB “DNA extraction from plant tissues (modified from: ALDRICH and CULLIS, 1993 – plant molecular biology reporte 11(2) 128-141)” também apresentou um bom rendimento para a planta *Schinus terebinthifólius*, conforme visualizado nas pistas 4 do gel de agarose (Figura 18).

**Figura 18:** Gel do DNA da *Schinus terebinthifólius* (aroeira da praia) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, extração do DNA conforme protocolo CTAB DNA EXTRACTION FROM PLANT TISSUES; peso molecular 1 Kb; após o processo de limpeza. **Pistas P:** Padrão de 1 Kb **Pista 4:** DNA da *Schinus terebinthifolius*



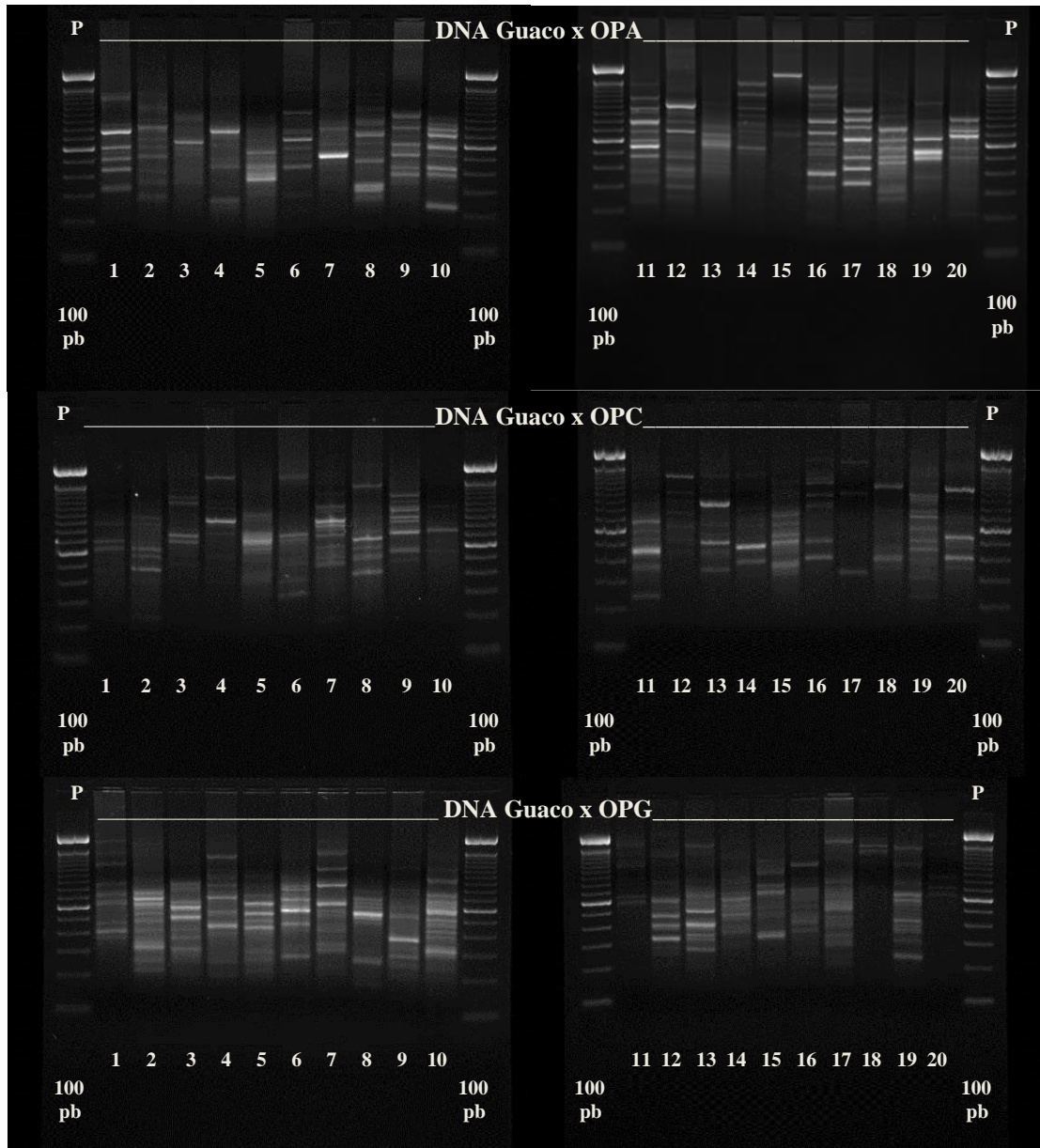
#### 4.1.2 Resultados do primeiro estudo

##### 4.1.2.1 Perfis obtidos no RAPD-PCR com os 60 iniciadores selecionados

Foram obtidos os perfis genéticos (“fingerprint”) utilizando os sessenta iniciadores das séries OPA (1 a 20), OPC (1 a 20) e OPG (1 a 20) e o DNA de cada planta do estudo cedidas pela Coleção Temática de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (Figuras 19, 20 e 21).

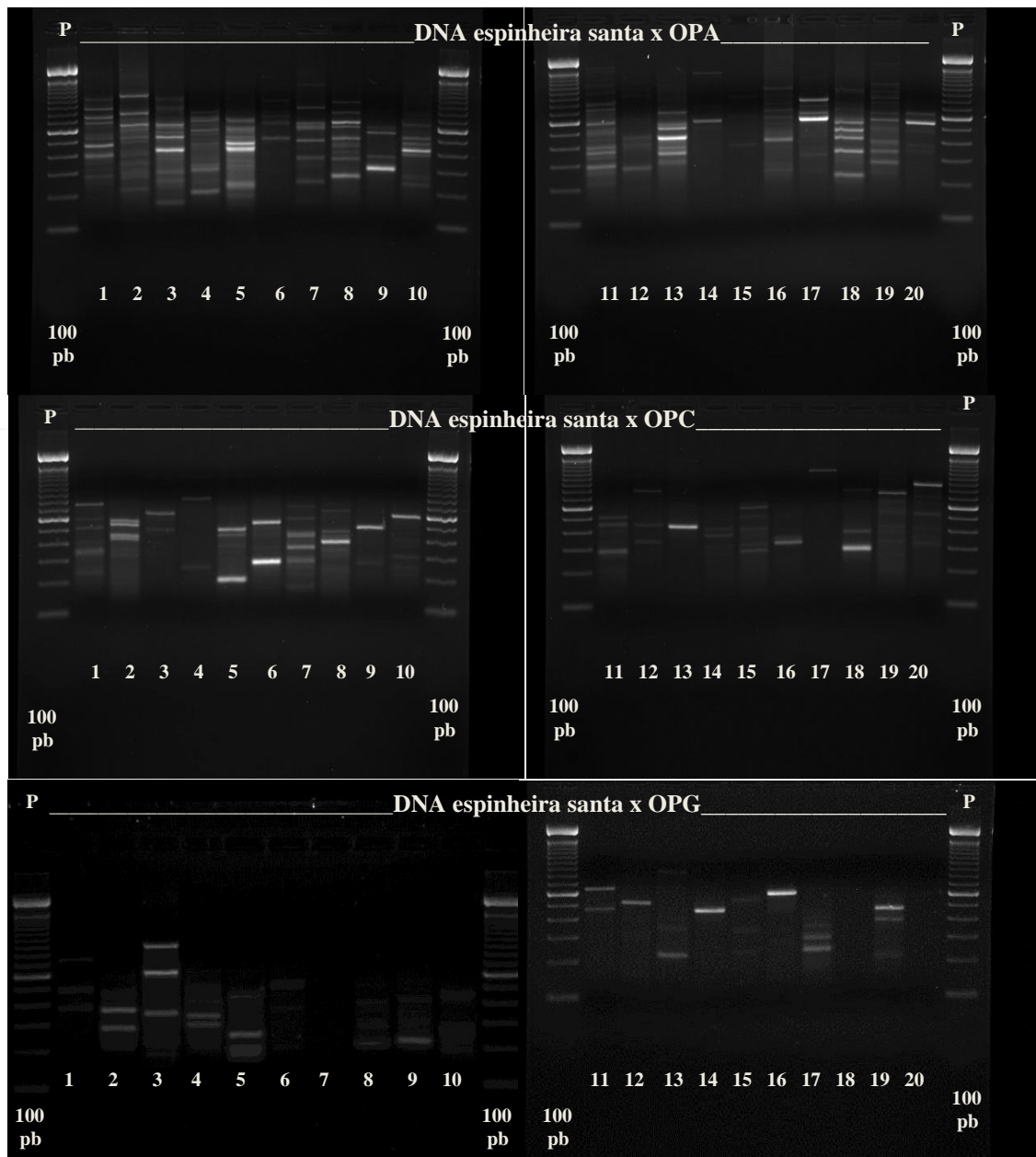
a) Perfis obtidos no RAPD-PCR utilizando o DNA da *Mikania glomerata* (guaco)

**Figura 19:** Gel do RAPD-PCR usando DNA da *Mikania glomerata* (guaco) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro com os iniciadores OPA, OPC e OPG 1 a 20; extração do DNA conforme o protocolo com CTAB ISPRA; peso molecular 100 pb (P)



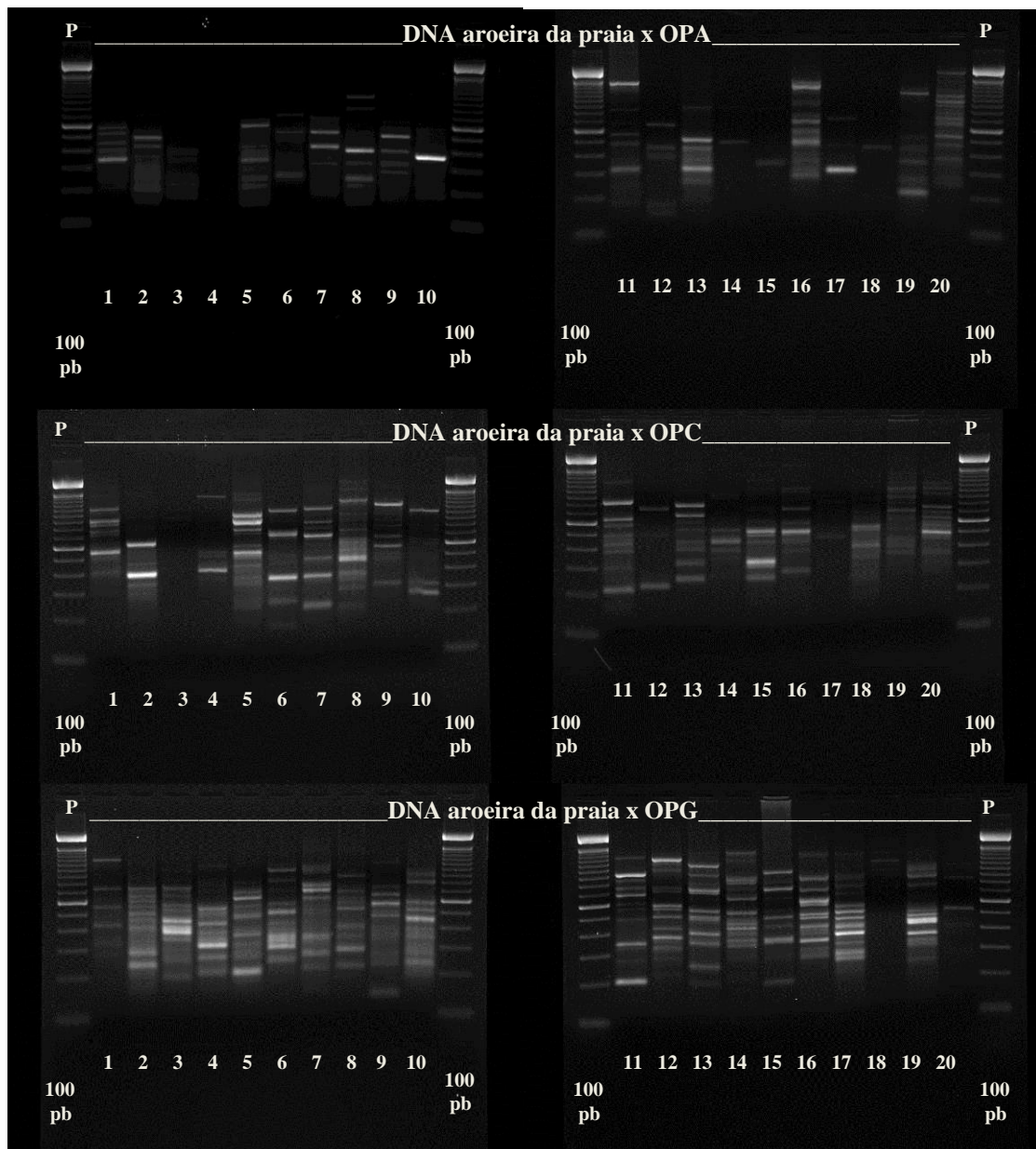
b) Perfis obtidos no RAPD-PCR utilizando o DNA da *Maytenus ilicifólius* (espinheira santa)

**Figura 20:** Gel do RAPD-PCR usando DNA da *Maytenus ilicifólia* (espinheira santa) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro com os iniciadores OPA, OPC e OPG 1 a 20, extração do DNA conforme protocolo CTAB DNA EXTRACTION FROM PLANT TISSUES; peso molecular 100 pb (P)



c) Perfis obtidos no RAPD-PCR utilizando o DNA da *Schinus terebinthifolius* (aroeira da praia)

**Figura 21:** Gel do RAPD-PCR do DNA da *Schinus terebinthifolius* (aroeira da praia) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro com os iniciadores OPA, OPC e OPG 1 a 20, extração do DNA conforme protocolo CTAB DNA EXTRACTION FROM PLANT TISSUES, peso molecular 100 pb (P)



Os perfis RAPD-PCR, utilizando o DNA das 3 espécies de plantas com os 60 iniciadores, geraram produtos amplificados que variaram de 100 a 1500 pb. Foram gerados 436 fragmentos pelos iniciadores OPA(1-20), 398 fragmentos gerados pelos iniciadores OPC(1-20) e 450 fragmentos gerados pelos iniciadores OPG(1-20), totalizando 1284 fragmentos observados para as 3 espécies de plantas (Tabela 14). Os iniciadores que geraram um único fragmento poderão servir para desenhar iniciadores para a PCR específica, para utilização na identificação da planta em produtos como monofarmacos ou em associações de plantas.

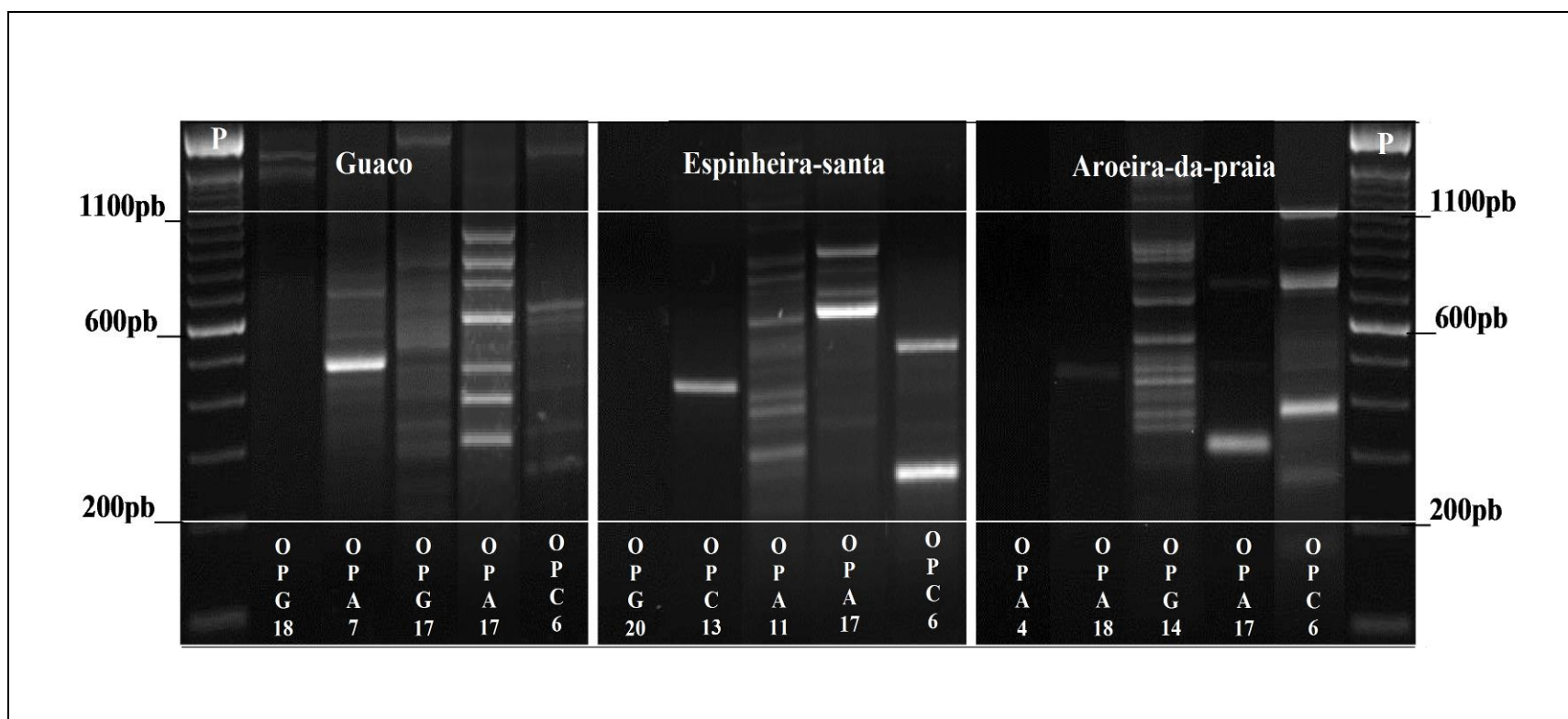
**Tabela 14:** Número de fragmentos obtidos do RAPD-PCR (entre 100-1500 pb) das 3 espécies de plantas medicinais e os 60 iniciadores do estudo. Guaco (G), Espinheira-santa (E) e aroeira-da-praia (A)

Primer	G	E	A	Primer	G	E	A	Primer	G	E	A
OPA01	7	12	5	OPC01	3	7	8	OPG01	11	3	6
OPA02	8	11	5	OPC02	10	6	6	OPG02	11	4	11
OPA03	6	10	4	OPC03	8	2	0	OPG03	11	6	11
OPA04	8	9	0	OPC04	7	2	5	OPG04	10	4	12
OPA05	5	7	9	OPC05	11	4	14	OPG05	9	4	10
OPA06	10	6	3	OPC06	7	2	6	OPG06	7	0	11
OPA07	4	8	4	OPC07	11	9	8	OPG07	10	0	11
OPA08	13	10	7	OPC08	7	6	13	OPG08	7	2	10
OPA09	10	4	5	OPC09	9	2	10	OPG09	7	2	11
OPA10	9	7	5	OPC10	5	4	7	OPG10	14	4	10
OPA11	12	15	7	OPC11	6	4	10	OPG11	8	2	11
OPA12	12	5	6	OPC12	8	3	3	OPG12	12	6	14
OPA13	4	8	7	OPC13	8	1	8	OPG13	9	3	12
OPA14	10	2	1	OPC14	8	4	6	OPG14	7	1	17
OPA15	4	3	1	OPC15	11	5	10	OPG15	12	3	10
OPA16	13	9	13	OPC16	9	2	10	OPG16	9	1	13
OPA17	7	6	3	OPC17	3	1	1	OPG17	15	3	13
OPA18	9	12	1	OPC18	4	3	9	OPG18	2	0	2
OPA19	6	11	7	OPC19	11	6	17	OPG19	12	3	12
OPA20	9	6	16	OPC20	9	6	13	OPG20	4	0	5
Total		436		Total		398		Total		450	

#### 4.1.2.2 Seleção dos iniciadores para elaboração de perfis (“fingerprint”) dos fragmentos obtidos no RAPD-PCR com os 60 iniciadores

O perfil (“fingerprint”) dos fragmentos entre 200 e 1100 pb de RAPD-PCR para cada espécie do estudo, gerados pelos iniciadores selecionados, pode ser observado na Figura 22. Para o guaco, foram selecionados: OPG18 (5'-GGCTCATGTG-3'), pois não gerou fragmento na faixa selecionada; OPA7 (5'-GAAACGGGTG-3'), por ter gerado um fragmento muito intenso a olho nu entre 500-600 pb e por não haver iniciador que gerou um fragmento específico; OPG17 (5'-ACGACCGACA-3'), por ser o iniciador que gerou o máximo de fragmentos. Para a espinheira-santa foram selecionados: OPG20 (5'-TCTCCCTCAG-3'), pois não gerou fragmento; OPC13 (5'-AAGCCTCGTC-3'), por ter gerado um fragmento específico; OPA11 (5'-CAATCGCCGT-3'), por ser o iniciador que gerou o máximo de fragmentos. Para a aroeira-da-praia foram selecionados: OPA4 (5'-AATCGGGCTG-3'), pois não gerou fragmento; OPA18 (5'-AGGTGACCGT-3'), por ter gerado um fragmento específico; OPG14 (5'-GGATGAGACC-3'), por ser o iniciador que gerou o máximo de fragmento. Também, foram selecionados os iniciadores OPA17 (5'-GACCGCTTGT-3') e OPC6 (5'-GAACGGACTC-3') que geraram fragmentos distintos com as três espécies.

**Figura 22:** Perfil dos fragmentos do RAPD-PCR das três plantas que foram gerados pelos iniciadores selecionados para a elaboração do perfil (fingerprint) entre 200 e 1100 pb. Pista P: padrão molecular 100 pb



#### 4.1.2.3 *Elaboração da matriz dos fragmentos obtidos no RAPD-PCR dos perfis (“fingerprint”) selecionados no estudo*

A matriz dos fragmentos entre 200 e 1100 pb apresentou um total de 76 fragmentos gerados pelos iniciadores selecionados, dos quais: 30 fragmentos gerados com o DNA foram do guaco, 22 fragmentos gerado com o DNA da espinheira-santa e 24 fragmentos gerados com o DNA da aroeira-da-praia (Tabela 2). A soma dos coeficientes de similaridade de Sorensen-Dice (% SD) e de dissimilaridade (% D), utilizando os iniciadores OPA17 e OPC6 individualmente na comparação entre o guaco e a espinheira-santa, entre o guaco e a aroeira-da-praia e entre a espinheira-santa e a aroeira-da-praia foi de 100% (Tabela 15). O produto de RAPD-PCR obtido nos permitiu distinguir as 03 espécies de plantas, mesmo com o uso de dois iniciadores (OPA17 ou OPC6). Uma dissimilaridade média foi verificada entre o guaco e a espinheira-santa (84,6 %), entre a espinheira-santa e a aroeira-da-praia (63,5 %) e entre guaco e aroeira-da-praia (52,7 %). Entretanto, a combinação de mais 3 iniciadores: iniciador ausência de fragmento ou o iniciador mínimo de fragmento, iniciador fragmento específico e iniciador máximo de fragmento, mostraram uma melhor confiabilidade.



**Tabela 15:** Matriz dos fragmentos que foram gerados pelos iniciadores selecionados para a elaboração do perfil (fingerprint) entre 200 e 1100 pb. Coeficientes de similaridade Sorensen-Dice (%SD); Dissimilaridade (%D); Dissimilaridade média (%D<sub>m</sub>). Guaco (G), Espinheira-santa (E) e Aroeira-da-praia (A)

	Guaco					Espinheira-santa					Aroeira-da-praia				
	OPG 18	OPA 7	OPG 17	OPA 17	OPC 6	OPG 20	OPC 13	OPA 11	OPA 17	OPC 6	OPA 4	OPA 18	OPG 14	OPA 17	OPC 6
1100 pb	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
1000-1100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9000-1000	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
800-900	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1,1	0	0
800	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
700-800	0	0	1	0	1,1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
700	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
600-700	0	1	1,1	1	1	0	0	1	1,1	0	0	0	1	0	0
600	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
500-600	0	1	1,1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
500	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
400-500	0	1	1,1	1	1	0	1	1,1	0	0	0	1	1,1	1	1
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
300-400	0	0	1,1	1	1,1	0	0	1,1,1	1	0	0	0	1,1,1	1	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
200-300	0	0	1,1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1
200 pb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>			30					22					24		
	G - E					E - A					G - A				
	OPA17		OPC6			OPA17		OPC6			OPA17		OPC6		
a	2		0			2		1			2		3		
b	5		6			4		1			5		3		
c	4		2			1		4			1		2		
%SD	30,8		0,0			44,4		28,6			40,0		54,5		
%D	69,2		100,0			55,6		71,4			60,0		45,5		
%D <sub>m</sub>	84,6					63,5					52,7				

**Legenda:** Ausência de fragmento (0), presença de um fragmento (1), presença de dois fragmentos (1,1) e presença de três fragmentos (1,1,1). Sendo a=1,1; b=1,0; c=0,1 e d=0,0.

Tradicionalmente, os métodos subjetivos, com base nas características morfológicas, tais como: forma, cor, textura e odor são utilizados para a discriminação de medicamentos à base de plantas medicinais. No entanto, estes métodos são difíceis de serem aplicados com precisão para a discriminação e autenticação. O uso de técnicas cromatográficas e marcador químico para padronizar preparações botânicas também é limitado porque os medicamentos têm fontes variáveis e complexidade química, que é afetada pelo crescimento, condições de armazenamento e épocas de colheita. Portanto, são urgentemente necessárias desenvolver novas metodologias adequadas para a caracterização das espécies de

plantas (JOSHI *et al*, 2010; ARIF *et al*, 2010). A técnica RAPD-PCR foi escolhida, principalmente devido à sua rapidez, relativa acessibilidade, alto polimorfismo, pequena quantidade de material biológico necessário para a extração do DNA, não ser necessário conhecimento prévio do genoma, possuir menor custo, necessitar de um pequeno número de etapas, pouco tempo para obter os resultados e facilidade de implementação (WEDER, 2002).

Com os resultados do primeiro estudo foi elaborado um artigo e submetido a Revista Vigilância Sanitária em Debate (submetido em 17/01/2014, situação: em avaliação).

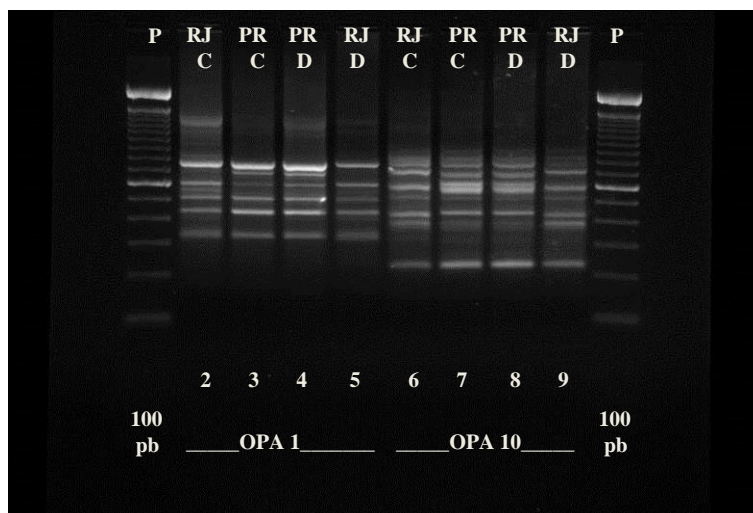
#### 4.1.3 Resultados do segundo estudo

##### 4.1.3.1 Perfis obtidos no RAPD-PCR com os 9 iniciadores selecionados

Foram obtidos os perfis genético (“fingerprint”) utilizando os nove iniciadores das séries OPA (1, 10 e 17); OPC (9, 11 e 19); OPG (3, 5 e 6) e o DNA concentrado e diluído da *Mikania glomerata Sprengel* (guaco) provenientes da Coleção Temática de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e do Horto Refúgio Biológico Bela Vista no Paraná (Figuras 23, 24, 25 e 26).

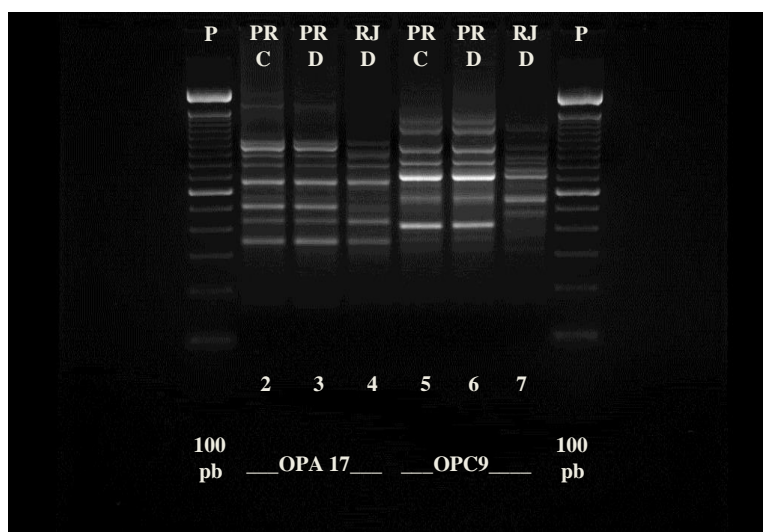
a) Perfis obtidos no RAPD-PCR utilizando os iniciadores OPA 1 e OPA 10

**Figura 23:** Gel do RAPD-PCR usando DNA da *Mikania glomerata* do Rio de Janeiro (RJ) e do Paraná (PR) com os iniciadores OPA 1 e 10; extração do DNA conforme o protocolo com CTAB ISPRA; peso molecular 100 pb (P); DNA concentrado (C) e DNA Diluído (D)



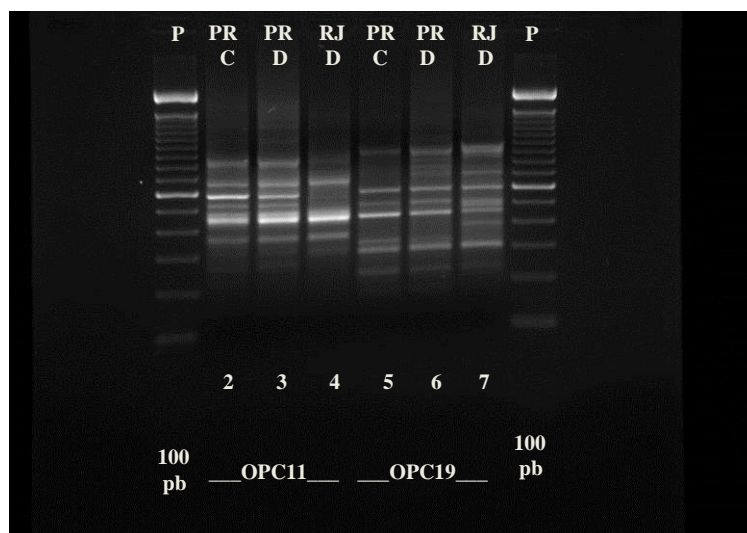
b) Perfis obtidos no RAPD-PCR utilizando os iniciadores OPA 17 e OPC 9

**Figura 24:** Gel do RAPD-PCR usando DNA da *Mikania glomerata* do Rio de Janeiro (RJ) e do Paraná (PR) com os iniciadores OPA 17 e OPC 9; extração do DNA conforme o protocolo com CTAB ISPRA; peso molecular 100 pb (P); DNA concentrado (C) e DNA Diluído (D)



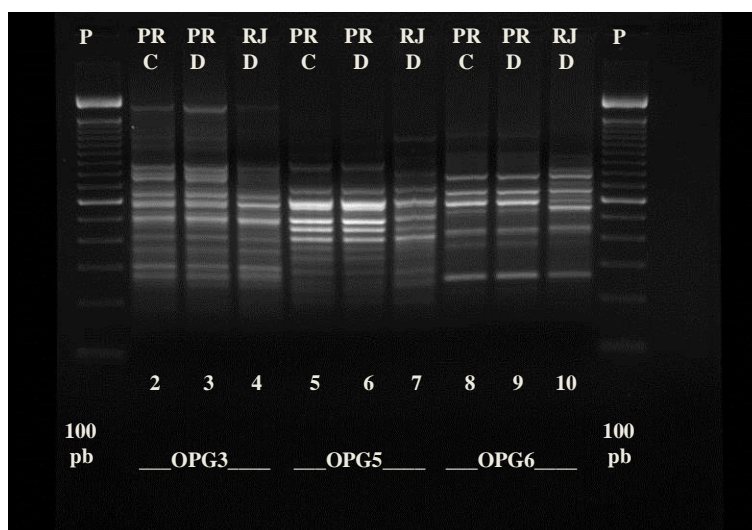
c) Perfis obtidos no RAPD-PCR utilizando os iniciadores OPC 11 e OPC 19

**Figura 25:** Gel do RAPD-PCR usando DNA da *Mikania glomerata* do Rio de Janeiro (RJ) e do Paraná (PR) com os iniciadores OPC 11 e OPC 19; extração do DNA conforme o protocolo com CTAB ISPRA; peso molecular 100 pb (P); DNA concentrado (C) e DNA Diluído (D)



d) Perfis obtidos no RAPD-PCR utilizando os iniciadores OPG 3, OPG 5 e OPG 6

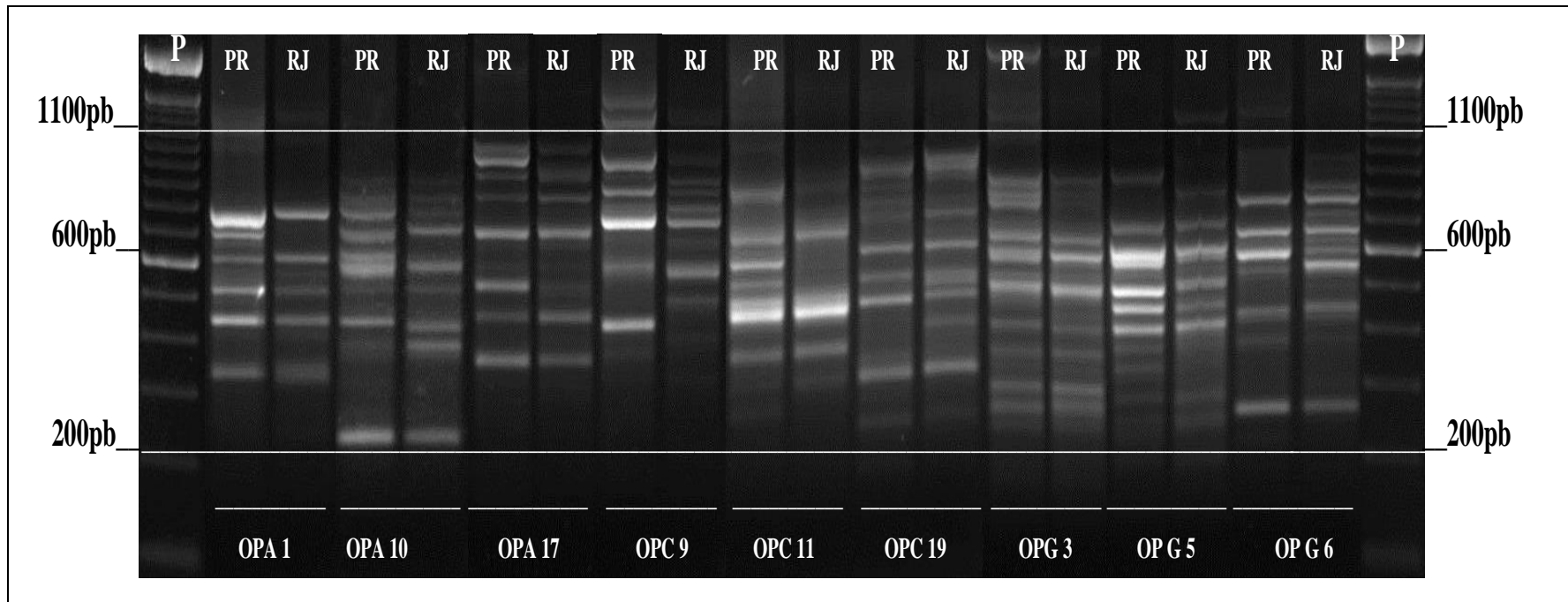
**Figura 26:** Gel do RAPD-PCR usando DNA da *Mikania glomerata* do Rio de Janeiro (RJ) e a do Paraná (PR) com os iniciadores OPG 3, OPG 5 e OPG 6; extração do DNA conforme o protocolo com CTAB ISPRA; peso molecular 100 pb (P); DNA concentrado (C) e DNA Diluído (D)



4.1.3.2 *Seleção dos iniciadores para elaboração de perfis (“fingerprint”) dos fragmentos obtidos no RAPD-PCR com os 9 iniciadores*

São ilustrados (Figura 27) os perfis dos padrões dos fragmentos de RAPD-PCR das 2 plantas (PR e RJ) com os 9 iniciadores.

**Figura 27:** Perfil dos fragmentos do RAPD-PCR das 2 plantas (Guaco). Pista P: padrão molecular 100 pb; PR: DNA do Paraná; RJ: DNA do Rio de Janeiro



#### 4.1.3.3 *Elaboração da matriz dos fragmentos obtidos no RAPD-PCR dos perfis (“fingerprint”) selecionados no estudo*

Como mostrado na Tabela 16, alguns iniciadores no intervalo de 100 par de base, apresentaram dois fragmentos (1,1), três fragmentos (1,1,1) e quatro fragmentos (1,1,1,1). Um total de 171 fragmentos foram gerados: os iniciadores OPA (1,10,17) geraram 52 fragmentos, sendo 27 fragmentos com o DNA do PR e 25 fragmentos com o DNA do RJ; os iniciadores OPC (9,11,19) geraram 57 fragmentos, sendo 29 fragmentos com o DNA do PR e 28 com o DNA do RJ; os iniciadores OPG (3,5,6) geraram 62 fragmentos, sendo 34 fragmentos com o DNA do PR e 28 fragmentos com o DNA do RJ.

**Tabela 16:** Matriz dos fragmentos entre 200 e 1100 pb que foram gerados pelos iniciadores selecionados (Figura 1). Ausência de fragmento (0), presença de um fragmento (1). Presença de dois fragmentos 1,1 (2), presença de três fragmentos 1,1,1 (3) e presença de quatro fragmentos 1,1,1,1 (4)

	OPA 1		OPA 10		OPA 17		OPC 9		OPC 11		OPC 19		OPG 3		OPG 5		OPG 6	
	PR	RJ	PR	RJ	PR	RJ	PR	RJ	PR	RJ	PR	RJ	PR	RJ	PR	RJ	PR	RJ
1100 pb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000-1100	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900-1000	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
900	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
800-900	0	0	1	1	0	0	1	2	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1
800	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
700-800	1	1	1	1	0	0	2	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
700	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
600-700	2	0	1	0	1	2	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
500-600	2	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	0	1	1	1	1
500	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
400-500	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1	0	1	1	1	1
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
300-400	1	1	0	1	1	1	1	1	2	2	1	0	1	1	2	0	1	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
200-300	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	2	2	4	3	1	1
200 pb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	9	6	9	9	9	10	9	10	10	6	10	12	13	9	13	10	8	9

A Tabela 17 mostra os valores dos coeficientes de similaridade e de dissimilaridade (%) para cada iniciador. Observou-se que a soma dos dois parâmetros é de 100% quando for utilizado o coeficiente de similaridade média de SD (80,0 %) e o coeficiente de dissimilaridade média (20,0 %). Observou-se também uma variação máxima de 5% entre os coeficientes SD, O e K2 (OPC11) e a média de 1,6 %, entretanto houve uma variação máxima de -16,7% em relação ao coeficiente J (OPG3) quando comparado ao SD e a média de -12,5 %.

**Tabela 17:** Coeficientes de similaridade Jaccard (%J); Sorensen-Dice (%SD); Ochiai (%O); Kulczynski 2 (%K2). A dissimilaridade (%D); Variação máxima entre SD, O e K2 (%V); Diferença entre J e SD (%J-SD). Sendo a=1,1; b=1,0; c=0,1 e d=0,0

	OPA1	OPA10	OPA17	OPC9	OPC11	OPC19	OPG3	OPG5	OPG6	média
a	6	8	9	8	6	7	6	9	7	-
b	3	1	0	1	4	2	5	4	1	-
c	0	1	1	2	0	4	1	1	2	-
%J	66,7	80,0	90,0	72,7	60,0	53,8	50,0	64,3	70,0	67,5
%SD	80,0	88,9	94,7	84,2	75,0	70,0	66,7	78,3	82,4	80,0
%O	81,6	88,9	94,9	84,3	77,5	70,4	68,4	78,9	82,5	80,8
%K2	83,3	88,9	95,0	84,4	80,0	70,7	70,1	79,6	82,6	81,6
%D	20,0	11,1	5,3	15,8	25,0	30,0	33,3	21,7	17,6	20,0
%V	3,3	0,0	0,3	0,2	5,0	0,7	3,5	1,4	0,3	1,6
%J-SD	-13,3	-8,9	-4,7	-11,5	-15,0	-16,2	-16,7	-14,0	-12,4	-12,5

A escolha do coeficiente de similaridade é muito importante para a confiabilidade da análise. Existe um grande número de coeficientes de similaridade encontrados na literatura. Podemos observar diferentes coeficientes sendo utilizados com o mesmo propósito ou os mesmos coeficientes sendo aplicados com propósitos diferentes, entretanto, nem todos os autores justificam a razão da escolha, portanto, a escolha subjetiva do método de agrupamento ou coeficiente de similaridade pode causar problemas, comprometendo a natureza da análise (JACKSON et al., 1989). Emygdio et al. (2003) estudando a eficiência da projeção das distâncias genéticas em um espaço bidimensional, por meio do grau de distorção, correlação entre as distâncias originais e estimadas e valores de stress de dez coeficientes de



similaridade verificou que o coeficiente de Jaccard não é adequado nos estudos realizados por meio de marcadores de RAPD e concluiu que os coeficientes de Sorensen-Dice, Ochiai e Kulczynski 2 são, respectivamente, os mais adequados neste tipo de estudo. O nosso estudo também indicou não ser adequado o uso do coeficiente de similaridade de Jaccard, por apresentar uma grande variação média (-12,5 %) quando comparado ao coeficiente de similaridade Sorensen-Dice.

O coeficiente de similaridade médio de 80,0 %, entre as duas plantas de mesma espécie, conforme Sorensen-Dice determinado, foi ratificado pela dissimilaridade média de 20,0% verificada, dissimilaridade intraespecífica originada de mutação, seleção e contaminação. Tanto que a preservação de recursos genéticos de plantas cultivadas em bancos de germoplasma (BAG) tem sido enfatizada no mundo inteiro, com o objetivo de preservar uma amostra da extensa diversidade genética de determinada espécie, preferivelmente, com a classificação dos genótipos, das características e da organização genética, além de manter os acessos na sua constituição genética original, diminuindo a possibilidade de mutação, seleção e contaminação (CARVALHO et al., 2009).

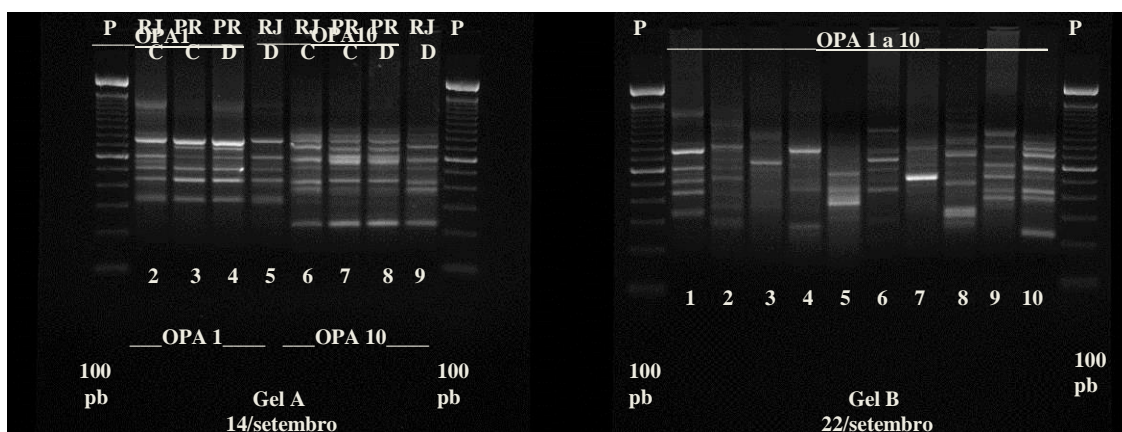
Os iniciadores e os produtos químicos necessários para a RAPD-PCR, utilizados neste estudo, são facilmente disponíveis no mercado. Laboratórios sem “cara” instrumentação de sequenciamento seriam capazes de caracterizar as plantas estudadas.

Com os resultados do segundo estudo foi elaborado um artigo e submetido a Revista Ciência Rural (submetido em 09/12/2013, situação: em avaliação).

#### 4.1.4 Avaliação da reprodutibilidade da Reação em Cadeia pela Polimerase (RAPD-PCR)

O aumento do rendimento do DNA extraído e a reprodutibilidade da técnica pode ser observada pela comparação dos dados obtidos no segundo estudo com os dados do primeiro estudo no RAPD-PCR utilizando o DNA da *Mikania glomerata* do Rio de Janeiro concentrado (após a extração) e diluído 10 vezes com os iniciadores da OPA 1 e 10. Podemos visualizar conforme ilustrado na figura 28, que ao comparar as pistas nos RAPD-PCR usando os DNA concentrado e diluído (das plantas de mesma procedência), um maior grau de número de bandas e uma maior intensidade das bandas nos RAPD-PCR quando o DNA extraído foi diluído 10 vezes. A repetibilidade pode ser verificada quando comparamos os fragmentos obtidos de replicatas de RAPD-PCR no gel “A” mesmo com o DNA concentrado ou diluído 10 vezes (pista 2 e 5 com OPA 1 e pistas 6 e 9 com OPA 10). A reprodutibilidade é observada quando comparamos os géis “A” e “B” obtidos de RAPD-PCR desenvolvidas em dias diferentes, verificamos os mesmos fragmentos de pb obtidos utilizando o OPA 1 (pistas 2 e 5 do gel “A” com a pista 1 do gel “B”) e OPA 10 (pistas 6 e 9 do gel “A” com a pista 10 do gel “B”) (Figura 28). As condições para o desenvolvimento da Reação em Cadeia pela Polimerase (RAPD-PCR) mostrou-se adequadamente otimizada, os perfis mostraram-se eficientes, evidenciando um padrão de amplificação reprodutível. Portanto, sugere-se quando possível a utilização dos reagentes necessários à PCR na forma de esferas (kit Ready-To-Go RAPD Analysis Bead, Amersham Biosciences).

**Figura 28:** Gel A (Figura X): Perfil em um gel (RAPD-PCR) usando o iniciador OPA 1 com DNA do guaco do Rio de Janeiro concentrado e diluído e DNA do Paraná concentrado e diluído; usando o iniciador OPA 10 com DNA do guaco do Rio de Janeiro concentrado e diluído e DNA do Paraná concentrado e diluído; Gel B: Perfil RAPD-PCR em um gel usando 10 iniciadores OPA (1 a 10) com DNA do guaco do Rio de Janeiro; extração do DNA conforme o protocolo com CTAB ISPRA (3.1.2.3); peso molecular 100 pb (P); DNA concentrado (C) e DNA Diluído (D)



## 4.2 RESULTADOS DA ANÁLISE QUÍMICA

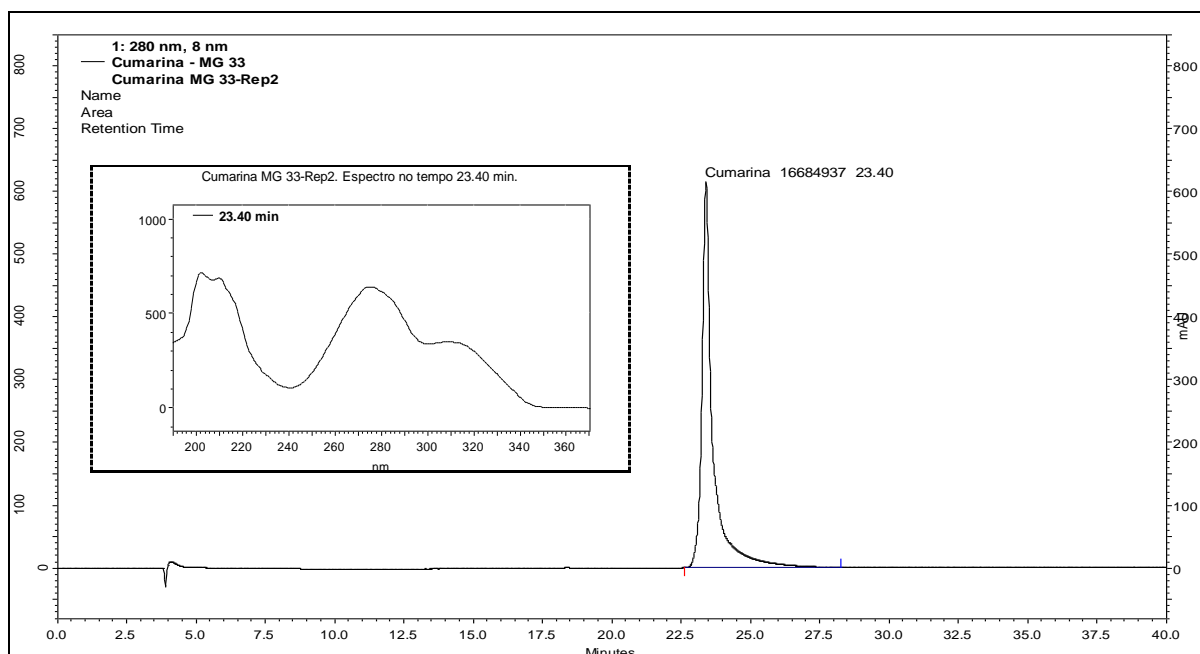
4.2.1 Perfis cromatográficos obtidos por Cromatografia Líquida com detector UV/VIS (DAD) das plantas guaco (MGJB), aroeira-da-praia (STJB) e espinheira-santa (MIJB) utilizando o método 1

4.2.1.1 *Perfis cromatográficos dos extratos da planta guaco (MGJB) em água (infusão, extração e decocção diferenciada)*

I) Marcador do guaco (cumarina)

O cromatograma (Cumarina - MG 33) da solução contendo o marcador cumarina e o espectro de absorção molecular na região do UV/VIS, no tempo de retenção referente a cumarina foi registrado (Figura 29).

**Figura 29:** Cromatograma da cumarina (MG 33), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40 µL

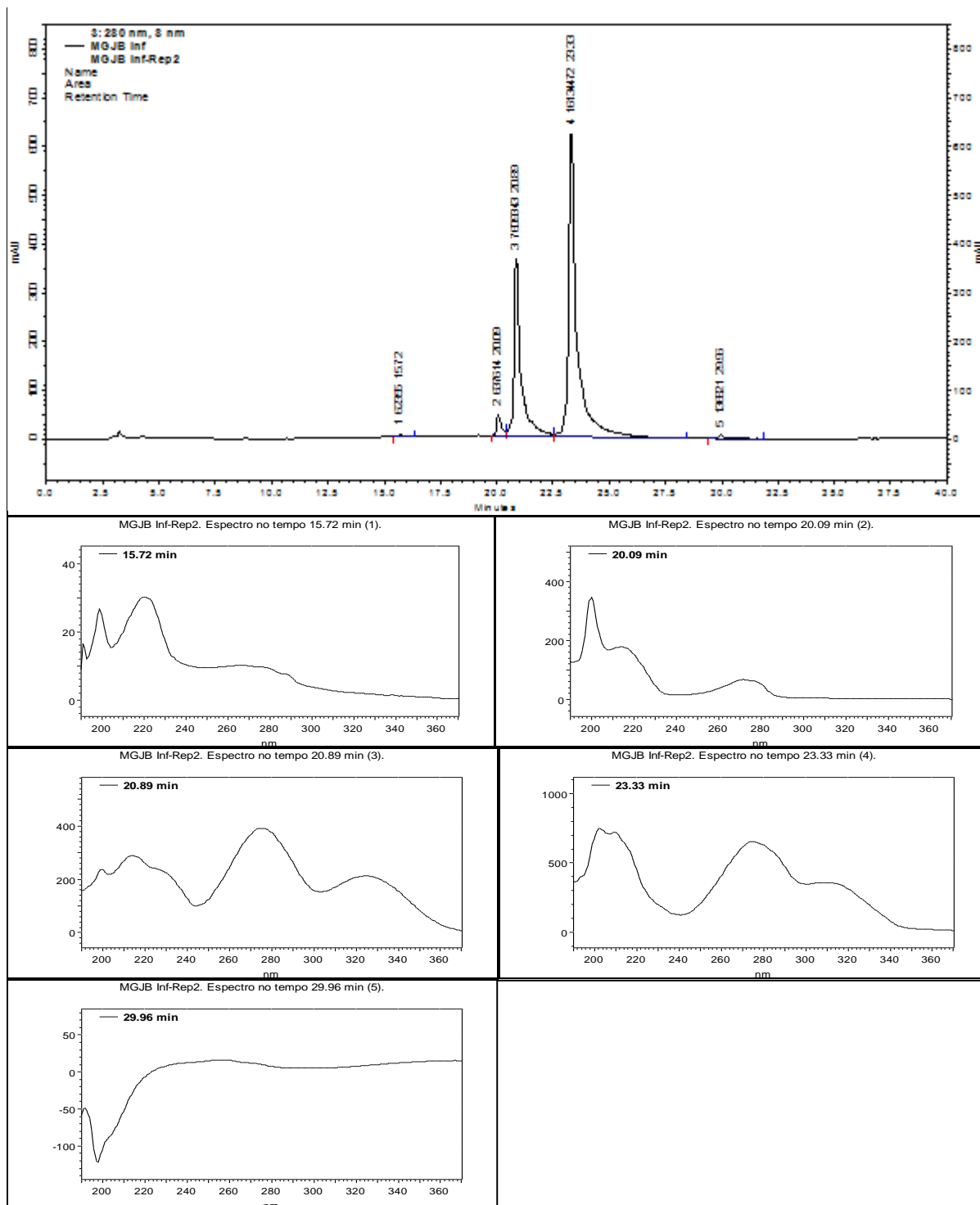


## II) Extrato por infusão

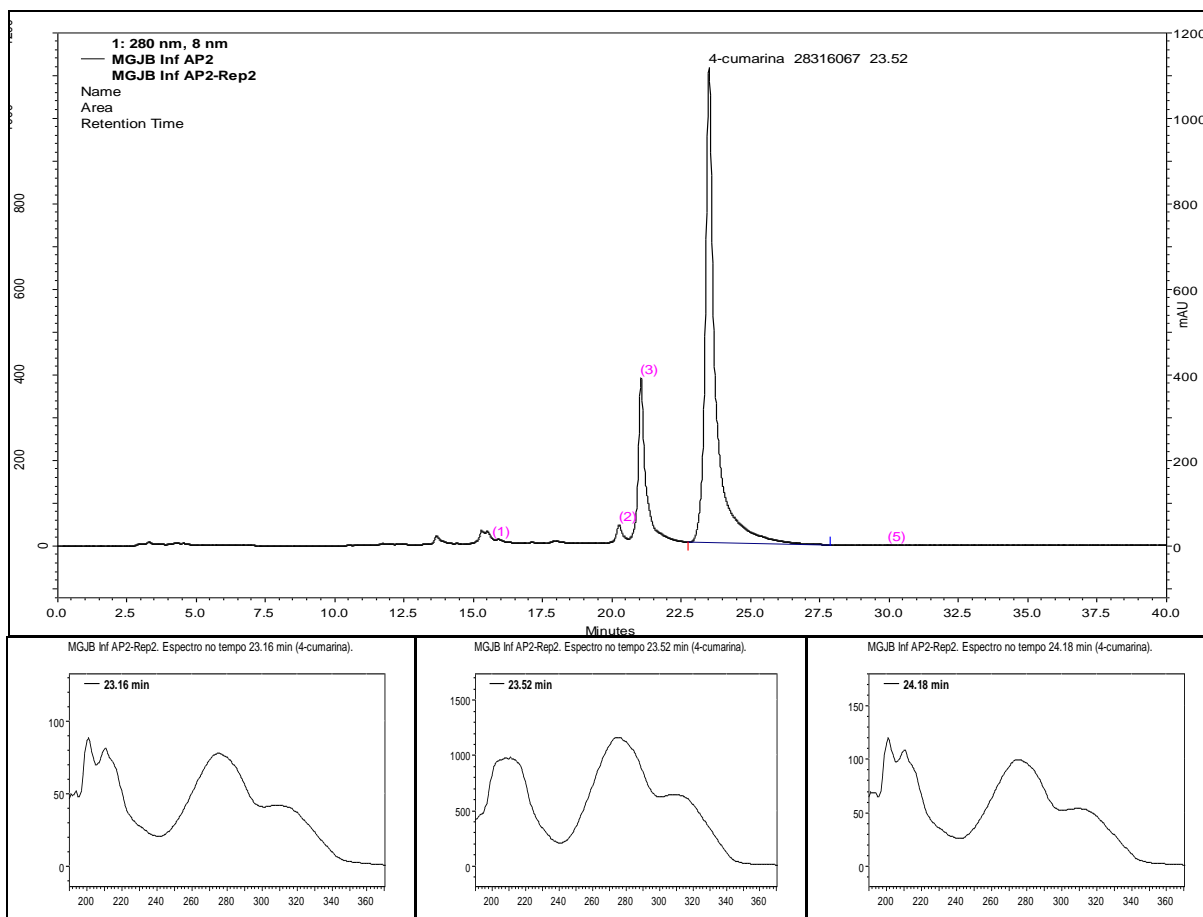
O perfil do cromatograma (MGJB Inf) da solução obtida por infusão da planta guaco e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS, nos tempos de retenção referentes a cinco sinais, foram registrados (Figura 30). Observou-se uma alta similaridade entre os espectros obtidos através do cromatograma da cumarina (Figura 29, em 23,40 min) e o espectro do sinal 4 (em 23,33 min) do perfil cromatografico por extração por infusão.

O perfil do cromatograma (MGJB Inf AP) da solução obtida por infusão da planta guaco adicionado de cumarina e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS, em três tempos de retenção (início, meio e final), referente ao sinal da cumarina foram registrados (Figura 31). Observou-se um aumento do sinal e similaridade entre os espectros obtidos através do cromatograma da cumarina (em 23,16 min, 23,52 min e 24,18 min), evidenciando a identificação e a pureza do sinal referente a cumarina.

**Figura 30:** Perfil cromatográfico do guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por infusão (Inf). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30 $^{\circ}$  C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40  $\mu$ L



**Figura 31:** Perfil cromatográfico após a adição de cumarina no guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por infusão (Inf). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30 $^{\circ}$  C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40  $\mu$ L

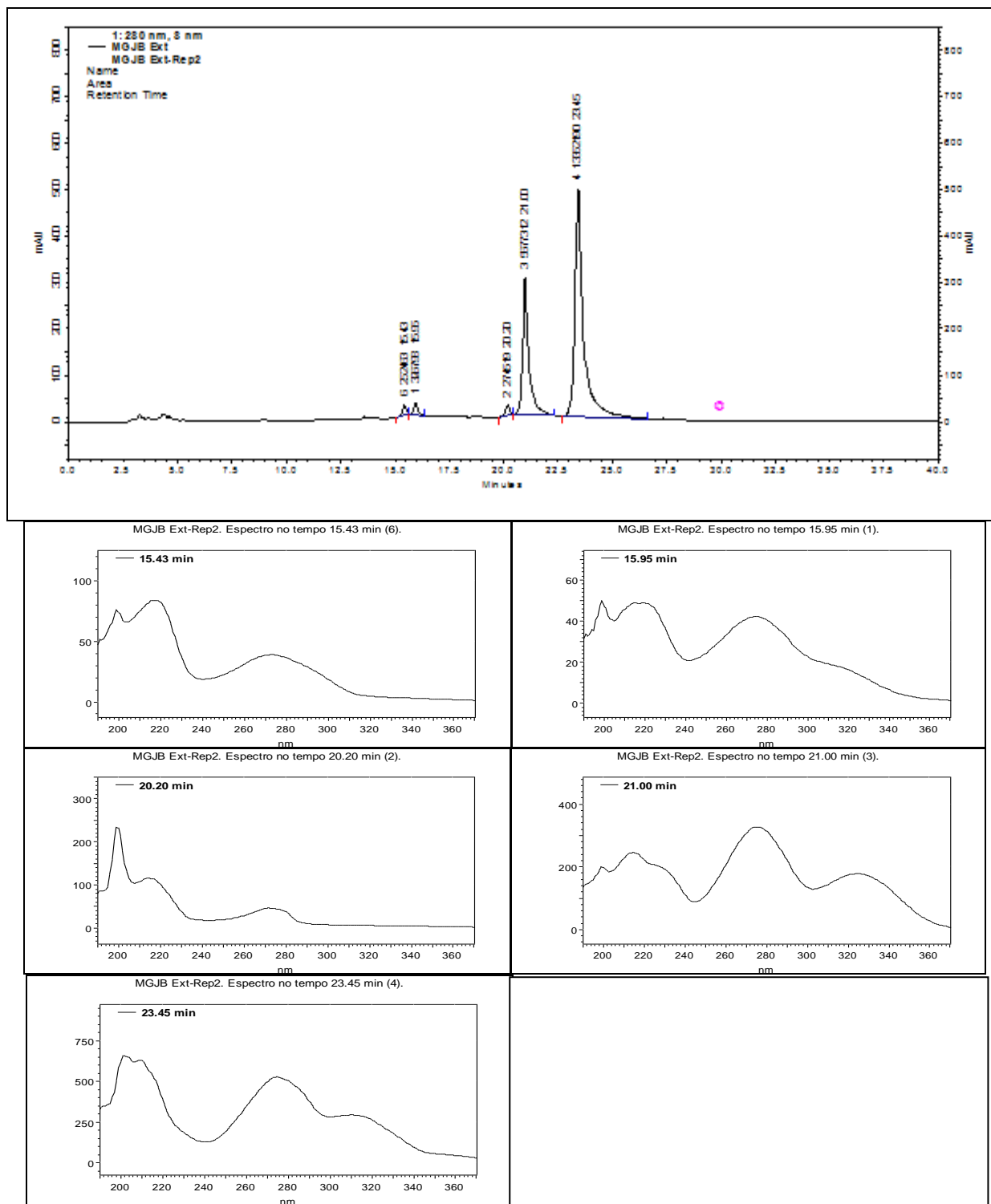


### III) Extrato por extração em soxhlet

O perfil do cromatograma (MGJB Ext), da solução obtida por extração em soxhlet, da planta guaco e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS, nos tempos de retenção referentes a cinco sinais foram registrados (Figura 32). Observou-se similaridade entre os espectros obtidos no cromatograma da cumarina (Figura 29, em 23,40 min) e o espectro do sinal 4 (em 23,45 min) do perfil cromatografico da solução obtida por extração em soxhlet (Figura 32). Observou-se também, o aparecimento do sinal 6 (em 15,43 min) e a ausência do sinal 5 que estava presente no cromatograma MGJB Inf (Figura 30).

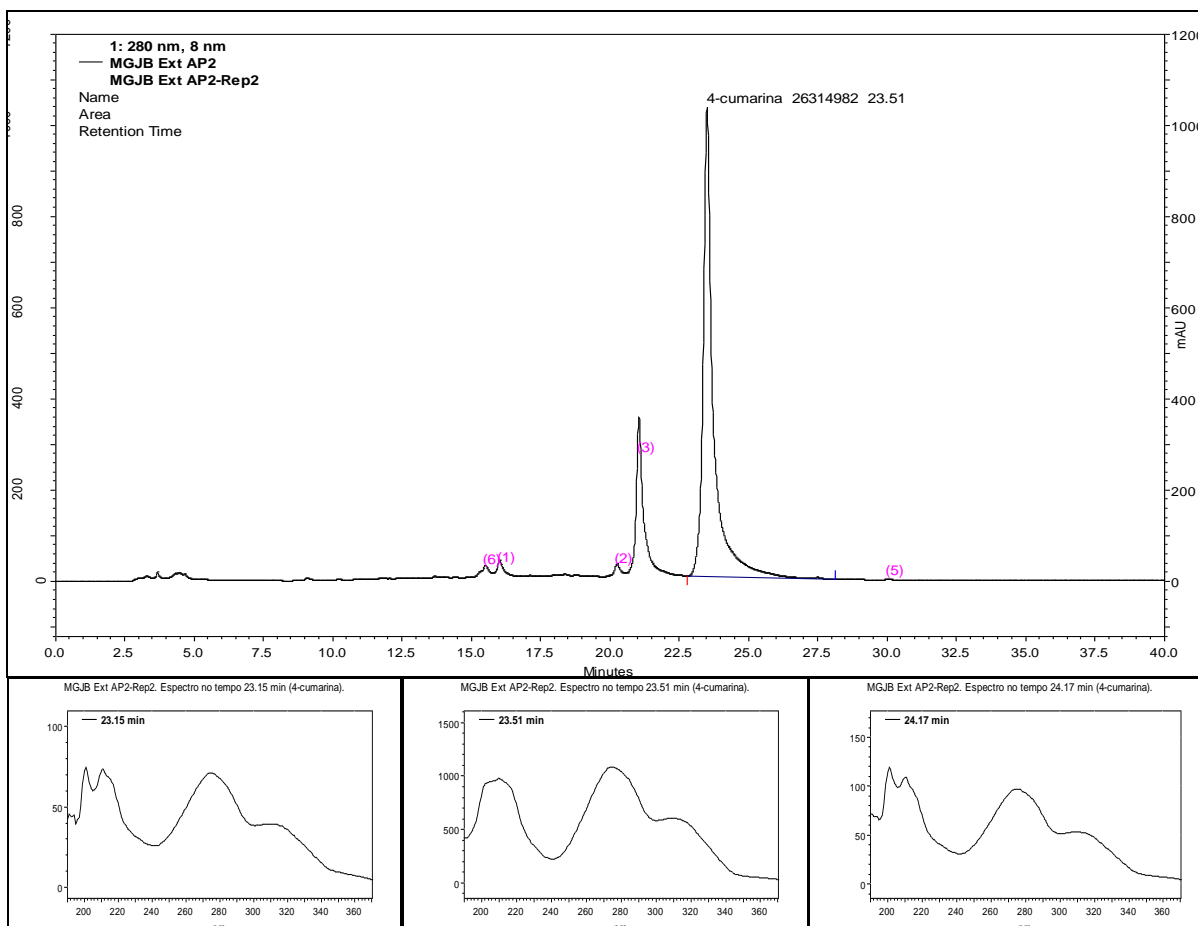
O perfil do cromatograma (MGJB Ext AP) da solução obtida por extração em soxhlet da planta guaco adicionado de cumarina, e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS em três tempos de retenção (início, meio e final), referentes ao sinal da cumarina, foram registrados (Figura 33). Observou-se um aumento do sinal e similaridade entre os espectros obtidos no cromatograma da cumarina (em 23,15 min, 23,51 min e 24,17 min), evidenciando a identificação e a pureza do sinal referente a cumarina.

**Figura 32:** Perfil cromatográfico do guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por extração em soxhlet (Ext). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40  $\mu$ L





**Figura 33:** Perfil cromatográfico após a adição de cumarina no guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por extração em soxhlet (Ext). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40  $\mu$ L

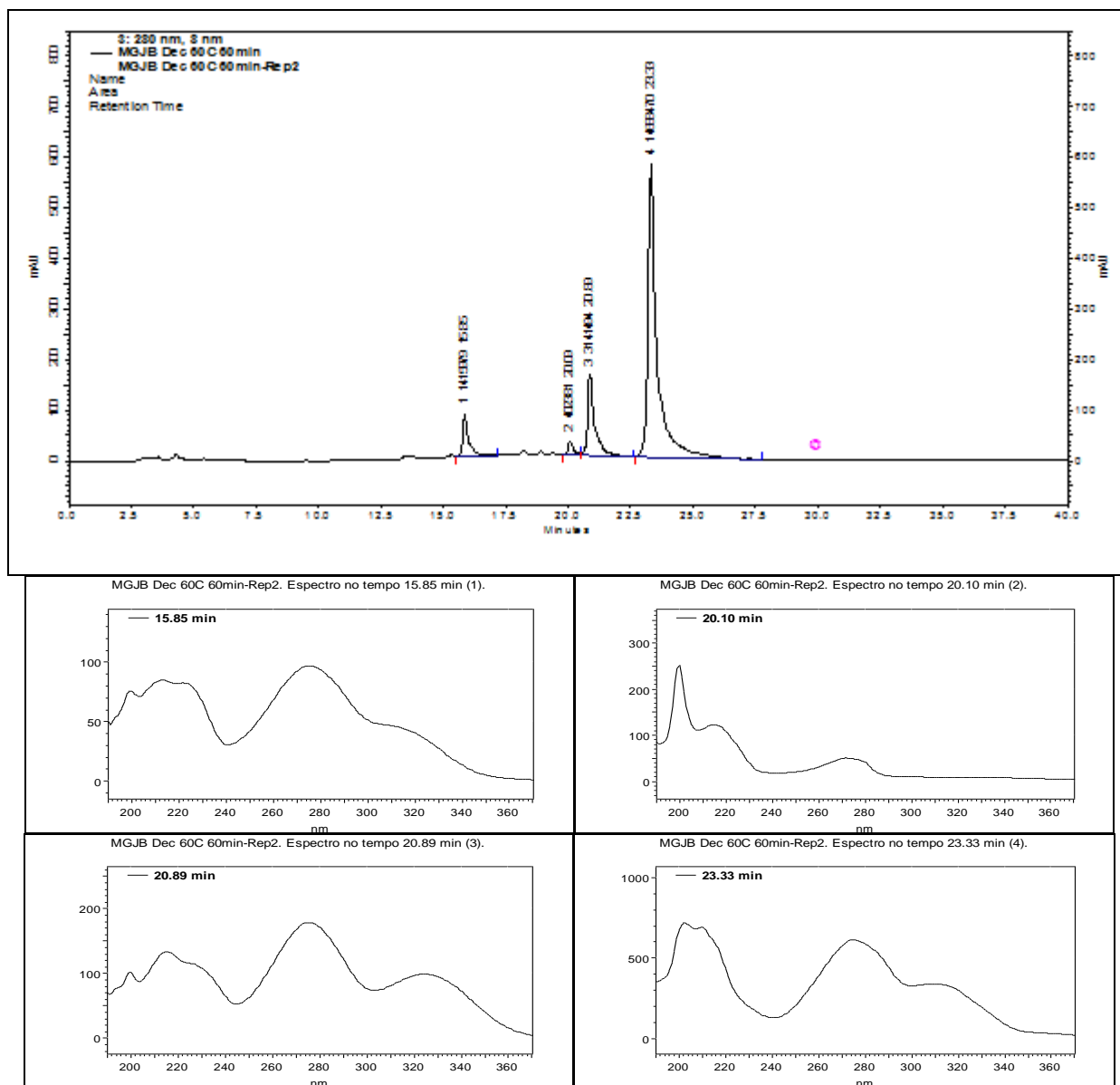


#### IV) Extrato por decocção diferenciada

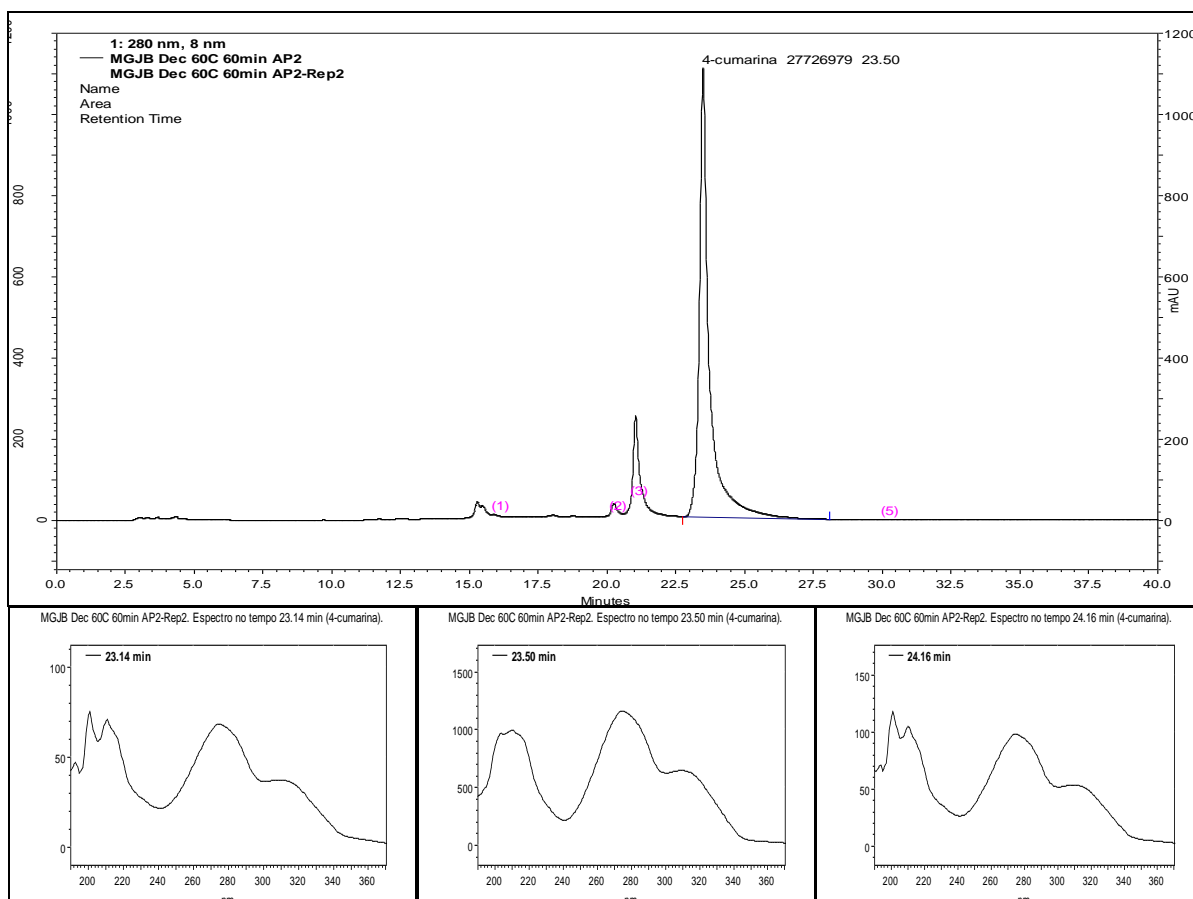
O perfil do cromatograma (MGJB Dec 60C 60 min) da solução obtida por decocção diferenciada, da planta guaco e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS, nos tempos de retenção referentes a quatro sinais foram registrados (Figura 34). Observou-se similaridade entre os espectros obtidos no cromatograma da cumarina (Figura 29, em 23,40 min) e o espectro do sinal 4 (em 23,33 min) do perfil cromatográfico da solução obtida por decocção diferenciada. Observou-se, também, a ausência do sinal 6 que estava presente no cromatograma MGJB Ext (Figura 32) e a ausência do sinal 5 que estava presente no cromatograma MGJB Inf (Figura 30).

O perfil do cromatograma (MGJB Dec 60C 60min AP) da solução obtida por decocção diferenciada da planta guaco adicionado de cumarina, e os espectros de varredura de absorção molecular na região do UV/VIS em três tempos de retenção (início, meio e final), referentes ao sinal da cumarina foram registrados (Figura 35). Observou-se um aumento do sinal e similaridade entre os espectros obtidos no cromatograma da cumarina (em 23,14 min; 23,50 min e 24,16 min), evidenciando a identificação e a pureza do sinal referente a cumarina.

**Figura 34:** Perfil cromatográfico do guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40  $\mu$ L



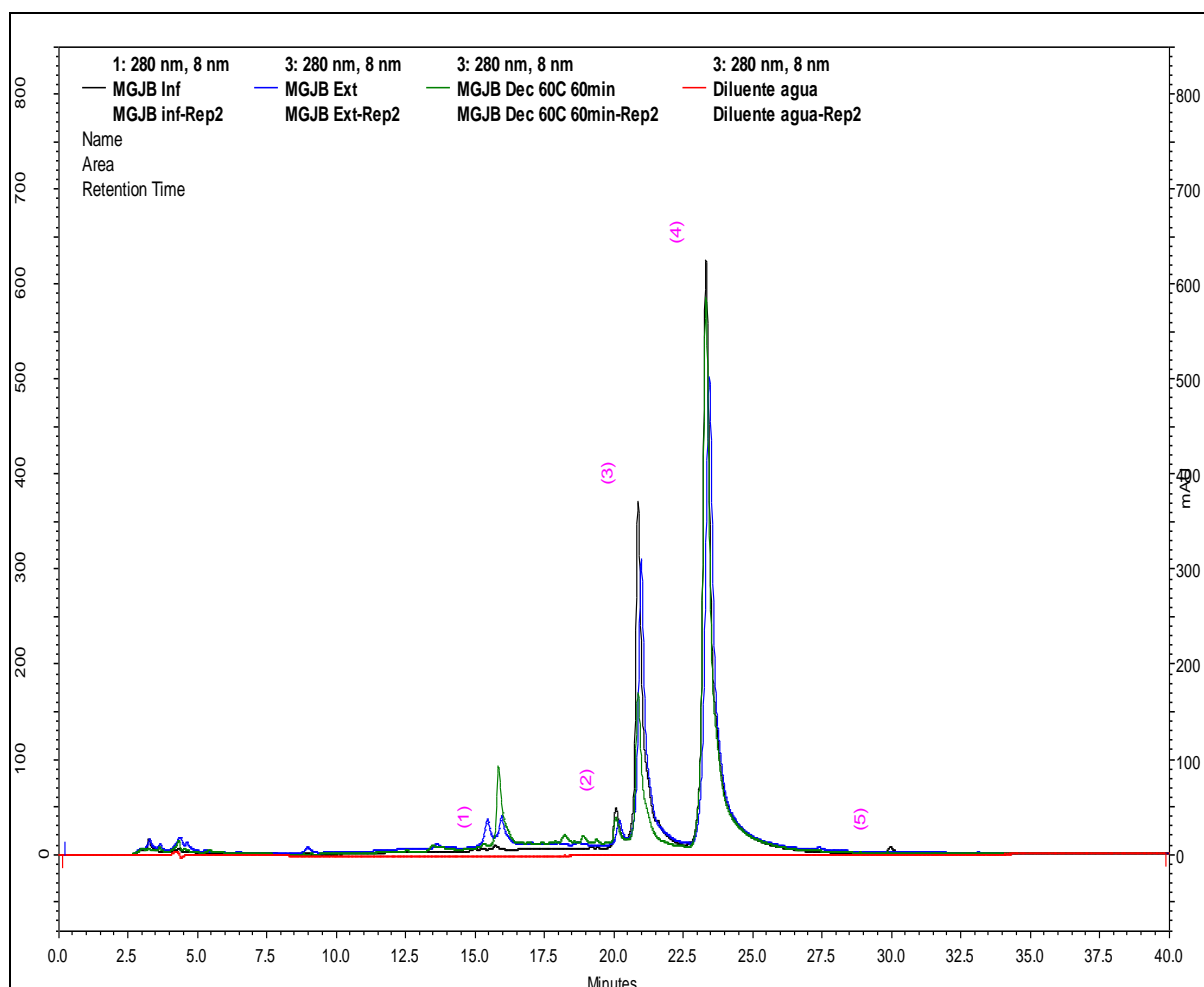
**Figura 35:** Perfil cromatográfico após adição de cumarina ao guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma). Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30 $^{\circ}$  C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40  $\mu$ L



V) Determinação da eficiência da extração dos três procedimentos utilizados na planta guaco (MGJB)

Os perfis obtidos através de três procedimentos de extração foram sobrepostos (Figura 36). A eficiência da extração por soxhlet foi de 76 % maior do que a extração por infusão e a eficiência da extração diferenciada foi de 116 % maior do que a extração por infusão e 22 % maior que a extração por soxhlet (Tabela 18).

**Figura 36:** Comparação dos perfis cromatográficos da planta guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (DAD). Solvente água. Preparações: infusão (Inf), extrato (Ext) e decocção diferenciada (Dec 60C 60min). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8mL/min; volume de injeção de 40 µL, detecção a 280 nm



**Tabela 18:** Comparação da eficiência (%) da extração da planta guaco (MGJB)

<b>Cromatograma</b>	<b>Concentração (mg/mL) (1)</b>	<b>Area (cumarina) (2)</b>	<b>Razão (Area/Conc) (3)</b>	<b>Eficiencia (Infusão) (4)</b>	<b>Eficiencia (Extração) (5)</b>
<b>MGJB Inf</b>	24,167	16134472	667624	-	-
<b>MGJB Ext</b>	11,353	13352190	1176094	76 %	-
<b>MGJB Dec 60C 60 min</b>	10,205	14688470	1439341	116 %	22 %

**Legenda:** (3) = (2)/(1);

76 % = (((3) do MGJB Ext-(3) do MGJB Inf)/(3) do MGJB Inf) x 100);

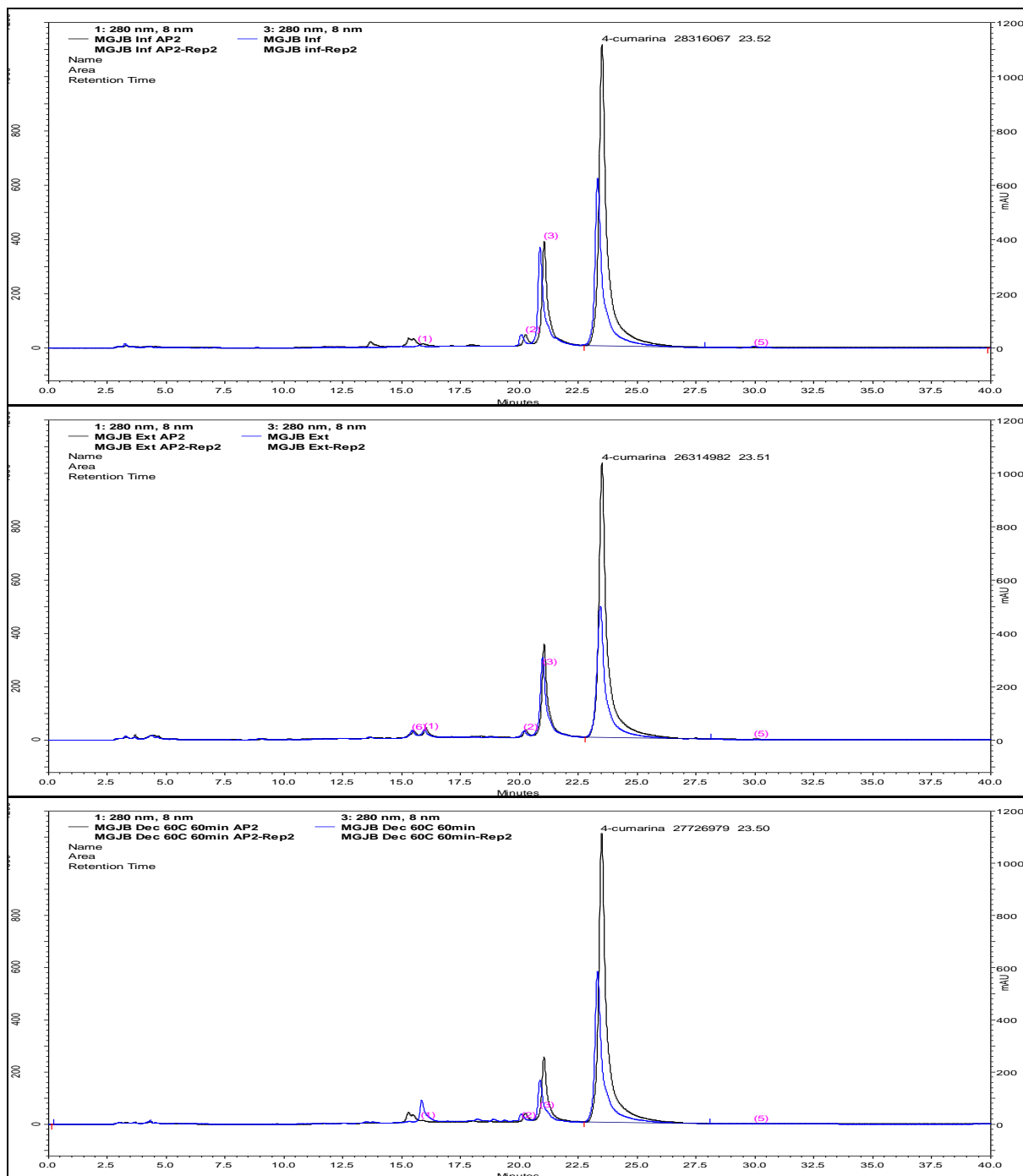
116 % = (((3) do MGJB Dec 60C 60 min-(3) do MGJB Inf)/(3) do MGJB Inf) x 100);

22 % = (((3) do MGJB Dec 60C 60 min-(3) do MGJB Ext)/(3) do MGJB Ext) x 100)

#### VI) Determinação da recuperação e a estimativa do teor de cumarina

Os perfis obtidos através de três procedimentos de extração foram sobrepostos aos respectivos perfis adicionados de marcador cumarina (Figura 37). Foi determinada a recuperação de cumarina nos procedimentos utilizados e estimado o teor de cumarina nos extratos. Observou-se que os três procedimentos de extração apresentaram uma boa recuperação (96,6; 102,8 e 103,4 %, respectivamente) para o nível de concentração de trabalho. Observou-se que o teor estimado (0,31; 0,55 e 0,67 % respectivamente) foi resultado da melhor eficiência da extração e foi maior no procedimento por decocção diferenciada (Tabela 19). Estes fatos, aliados à necessidade do uso de metade de material vegetal (1 g) e também, requererem um tempo relativamente curto para extrair os analitos (60 min) fez com que o procedimento seja o melhor para a extração de cumarina. O perfil gerado, também foi adequado, pois apresentou quatro sinais resolvidos de boa intensidade com espectros de absorção molecular na região UV/Vis bem definidos, por possuírem vários pontos de máximos e mínimos.

**Figura 37:** Comparação dos perfis cromatográficos antes e após a adição de cumarina no guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (DAD). Solvente água, preparação por infusão, extração em soxhlet e decocção diferenciada. Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40 µL, detecção a 280 nm



**Tabela 19:** Determinação da recuperação e do teor (estimado) de cumarina nas preparações do estudo do guaco (MGJB)

<b>Cromatograma</b>	<b>Conc. (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>) (1)</b>	<b>Área Antes (2)</b>	<b>Área após adição (3)</b>	<b>Aumento da área (4)</b>	<b>Recuperação (%) (5)</b>	<b>Teor (%) (6)</b>
<b>Cumarina MG 33</b>	0,07804	16684937	-	-	-	100
<b>Adição de 5,5 <math>\mu\text{L}</math></b>	58,96	-	-	12605378	-	-
<b>MGJB Inf</b>	24,167	16134472	28316067	12181595	96,6	0,31
<b>MGJB Ext</b>	11,353	13352190	26314982	12962792	102,8	0,55
<b>MGJB Dec 60C</b>	10,205	14688470	27726979	13038509	103,4	0,67

**Legenda:** (1) = concentração; (4) = (3)-(2); (5) = (((4) no extrato/(4) na adição) x 100);  
 (6) = (((2) no extrato/(2) na cumarina) x ((1) na cumarina/(1) no extrato) x 100);  
 $12605378 = (((5,5 \times 10,72) \times 16684937) / 0,0780416) / 1000$

#### 4.2.1.2 Resultados dos extratos da planta aroeira-da-praia (STJB) em água (infusão, extrato e decocção diferenciada)

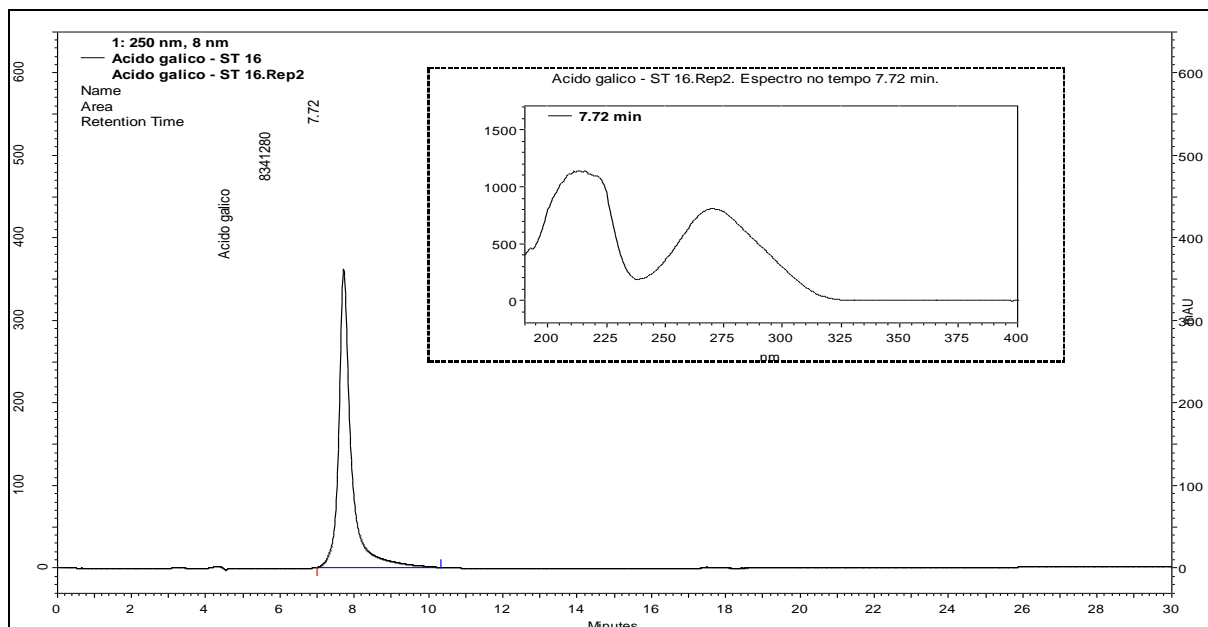
##### I) Marcadores da aroeira-da-praia (ácido gálico e isoquercitrina)

O cromatograma (Ácido gálico - ST 16) da solução contendo o marcador ácido gálico e o espectro de varredura de absorção molecular na região do UV/VIS no tempo de retenção, referente ao ácido gálico, foi registrado (Figura 38).

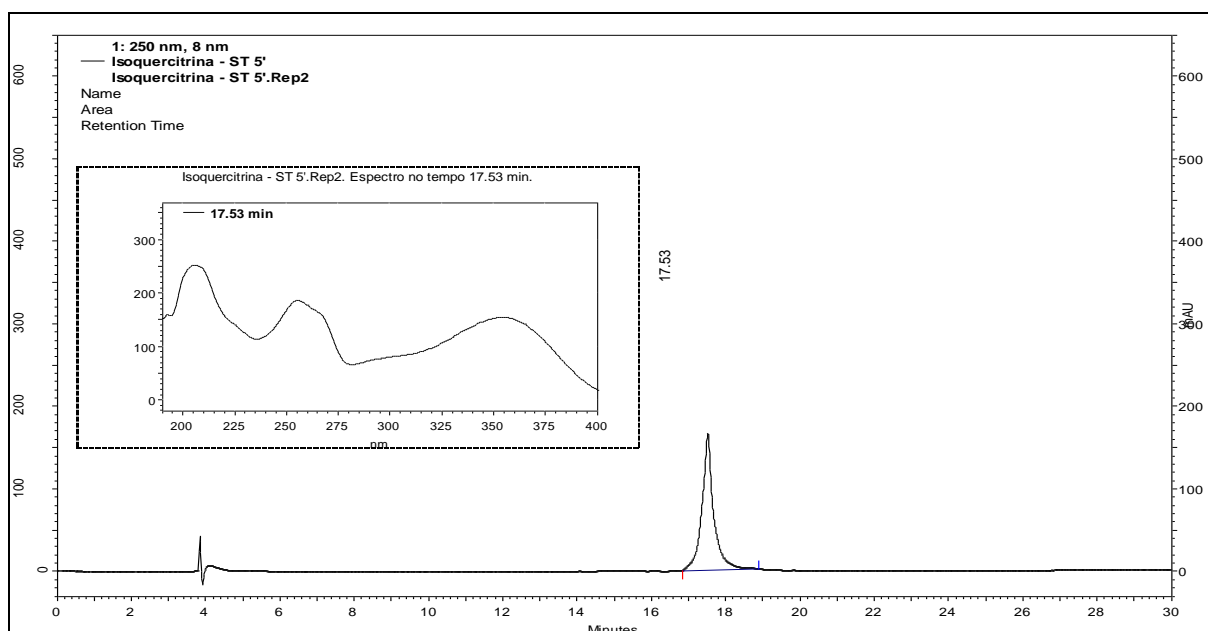
O cromatograma (Isoquercitrina - ST 5') da solução contendo o marcador isoquercitrina e o espectro de varredura de absorção molecular na região do UV/VIS no tempo de retenção, referente a isoquercitrina, foi registrado (Figura 39)



**Figura 38:** Cromatograma do ácido gálico (ST 16), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60  $\mu$ L



**Figura 39:** Cromatograma da isoquercitrina (ST 5'), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60  $\mu$ L

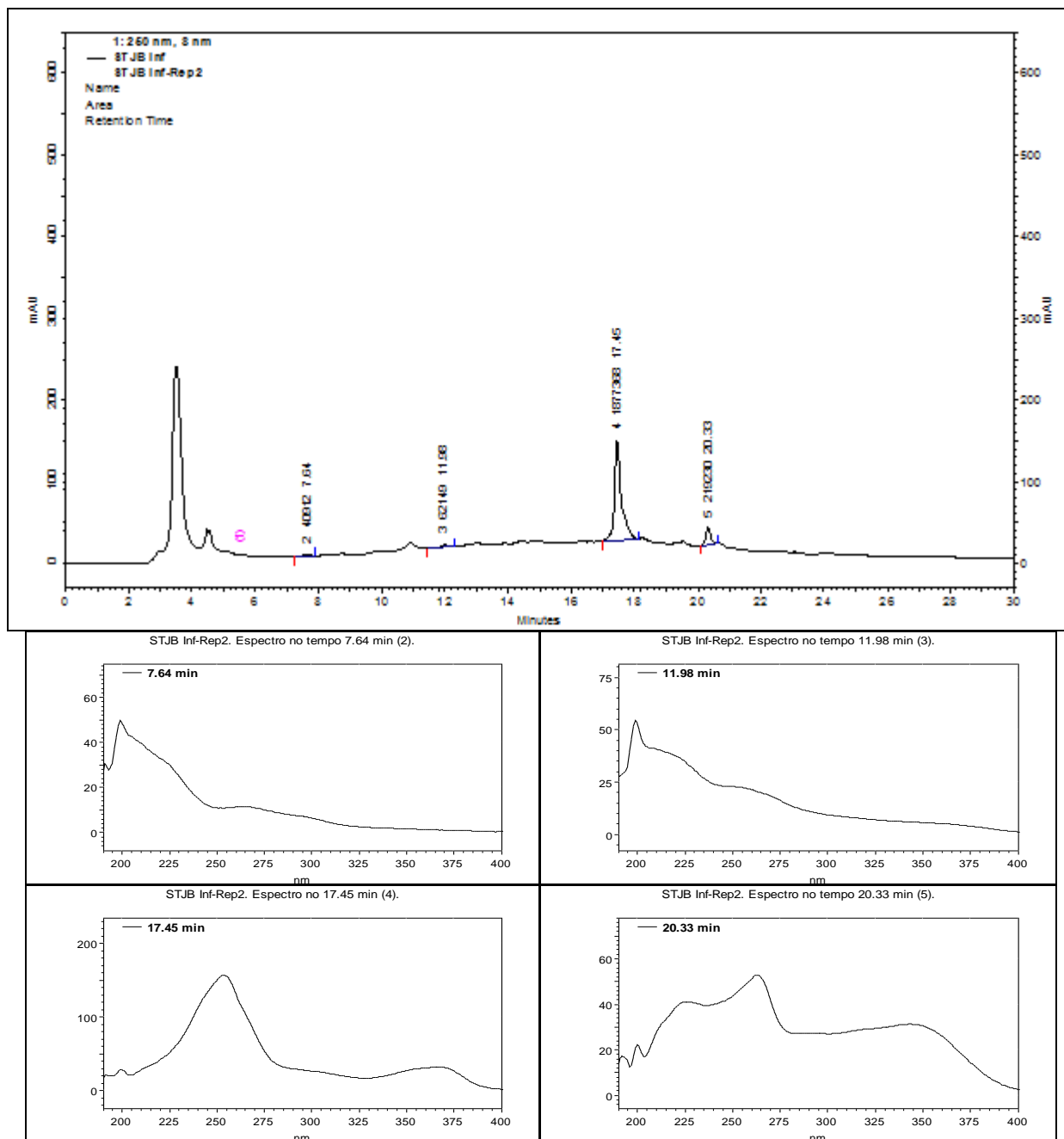


## II) Extrato por infusão

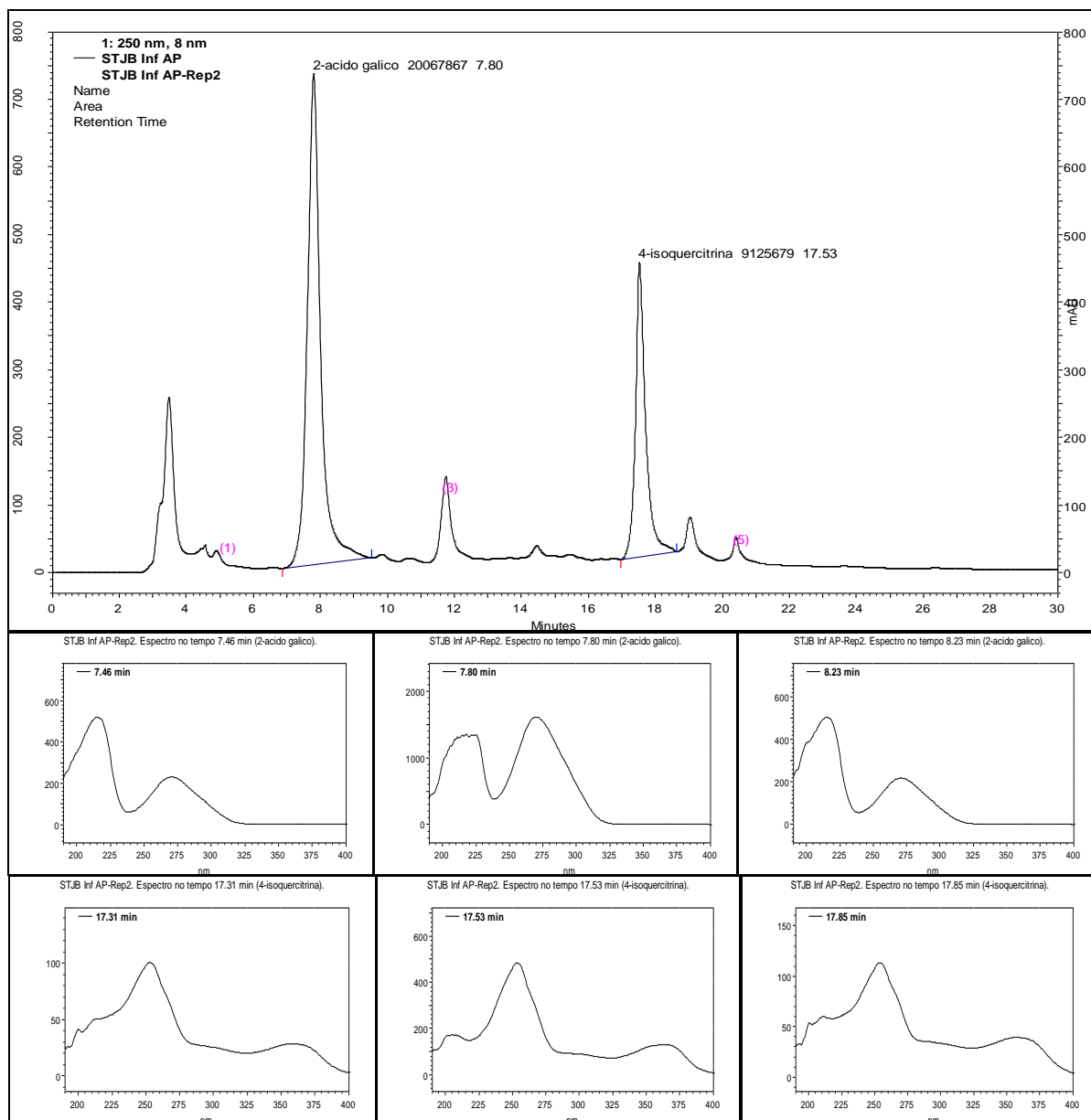
O perfil cromatograma (STJB Inf) da solução obtida por infusão da planta aroeira e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS nos tempos de retenção referentes a quatro sinais, foram registrados (Figura 40). Observou-se um sinal (2) muito baixo em relação ao tempo de retenção do ácido gálico, portanto, a similaridade entre os espectros obtidos no cromatograma do ácido gálico (Figura 38, em 7,72 min) e o espectro do sinal 2 (em 7,64 min) do perfil cromatográfico da solução obtida por infusão não pode ser confirmada. Observou-se também, similaridade entre os espectros obtidos no cromatograma da isoquercitrina (Figura 39, em 17,53 min) e o do sinal 4 (em 17,45 min) do perfil cromatográfico por infusão.

O perfil do cromatograma (STJB Inf AP) do extrato por infusão da planta aroeira adicionado de ácido gálico e isoquercitrina, e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS em três tempos de retenção (início, meio e final), referentes ao sinal de ácido gálico e isoquercitrina, foram registrados (Figura 41). Observou-se um aumento do sinal e similaridade entre os espectros obtidos nos cromatogramas de ácido gálico (em 7,46 min, 7,80 min e 8,23 min) e de isoquercitrina (em 17,31 min, 17,53 min e 17,86 min), evidenciando a identificação e a pureza do sinal referente a isoquercitrina. Nada se pôde afirmar em relação ao ácido gálico, uma vez que este procedimento (infusão) não foi adequado, pois extraiu muito pouco deste marcador.

**Figura 40:** Perfil cromatográfico da aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por infusão (Inf). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i.); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



**Figura 41:** Perfil cromatográfico após a adição de ácido gálico na aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por infusão (Inf). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30 $^{\circ}$  C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60  $\mu$ L

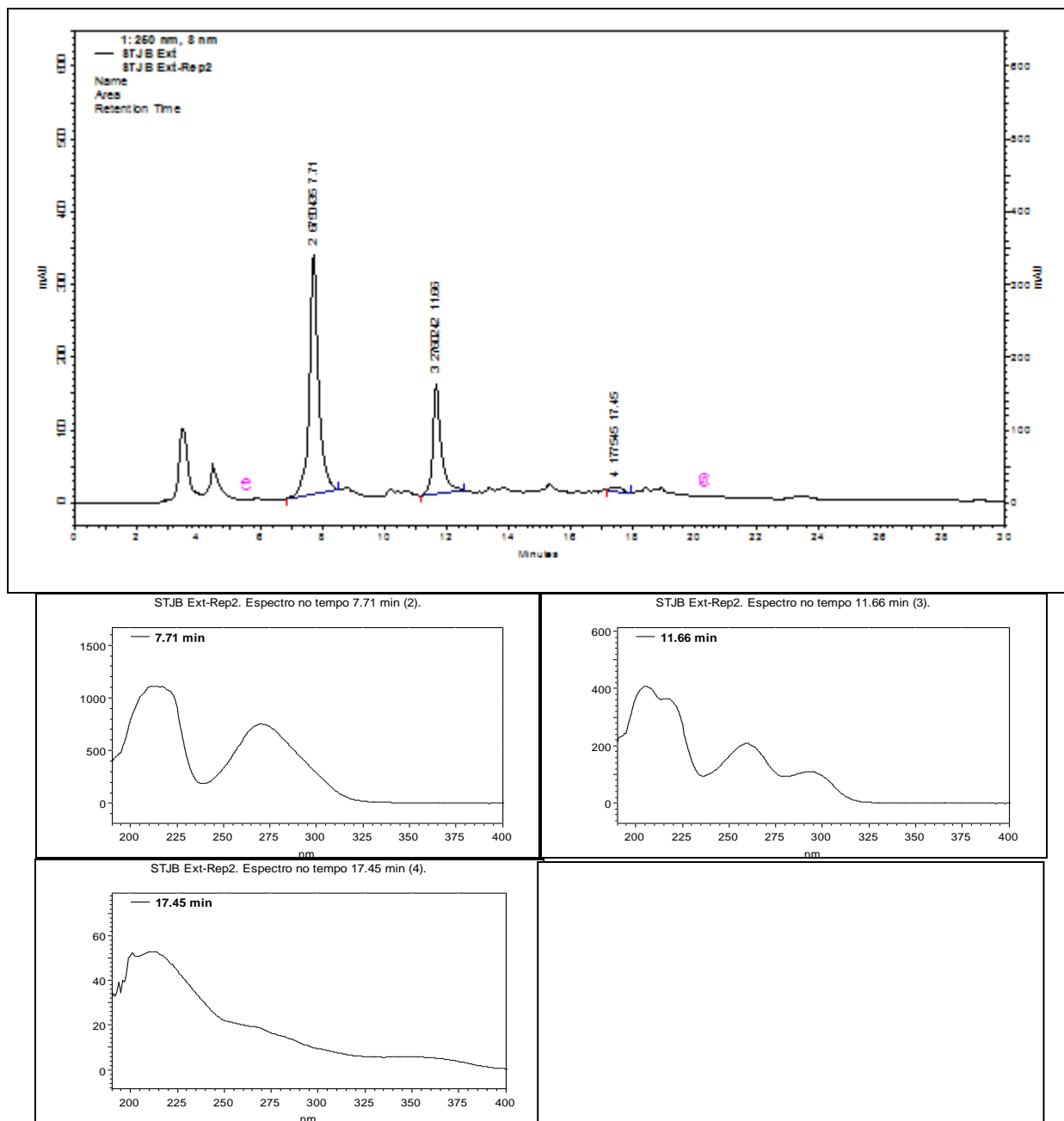


### III) Extrato por extração em soxhlet

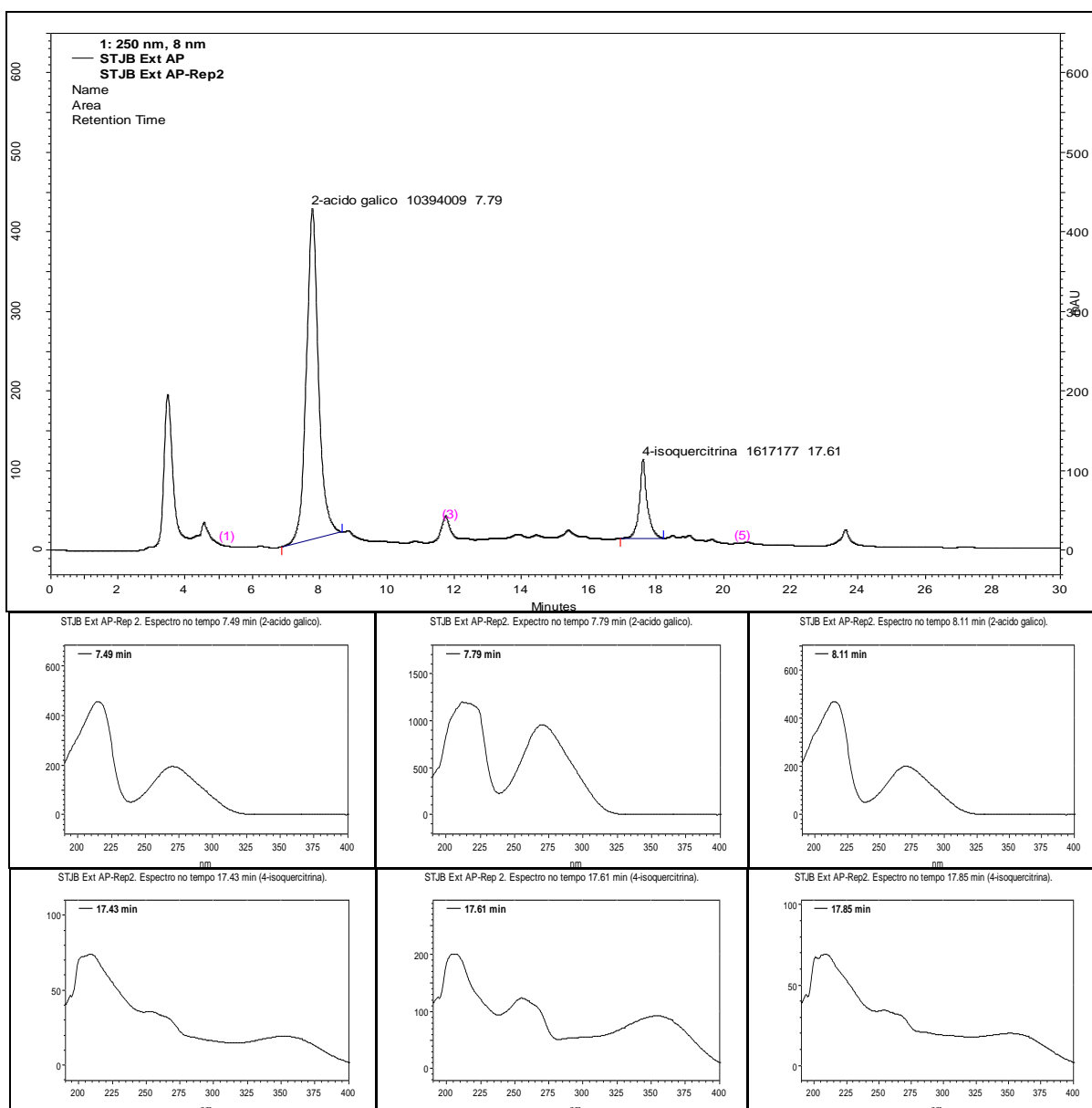
O perfil do cromatograma (STJB Ext) da solução obtida por extração em soxhlet da planta aroeira e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS, nos tempos de retenção referentes a três sinais, foram registrados (Figura 42). Observou-se similaridade entre os espectros obtidos no cromatograma de ácido gálico (Figura 38, em 7,72 min) e o espectro do sinal 2 (em 7,71 min) do perfil cromatografico da solução obtida por extração em soxhlet. Observou-se, também, um sinal (4) muito baixo referente ao tempo de retenção da isoquercitrina, portanto a similaridade entre os espectros obtidos no cromatograma da isoquercitrina (Figura 39, em 17,53 min) e o espectro do sinal 4 (em 17,45 min) do perfil cromatografico da solução obtida por extração em soxhlet não pode ser confirmada.

O perfil do cromatograma (STJB Ext AP) da solução obtida por extração em soxhlet da planta aroeira adicionado de ácido gálico e isoquercitrina, e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS em três tempos de retenção (início, meio e final), referentes ao sinal de ácido gálico e isoquercitrina, foram registrados (Figura 43). Observou-se um aumento do sinal e similaridade entre os espectros obtidos nos cromatogramas de ácido gálico (em 7,46 min, 7,79 min e 8,11 min) e de isoquercitrina (em 17,43 min, 17,61 min e 17,86 min), evidenciando a identificação e a pureza do sinal referente ao ácido gálico. Nada se pôde afirmar em relação a isoquercitrina, uma vez que este procedimento (por extração em soxhlet) não foi adequado, pois extraiu muito pouco deste marcador.

**Figura 42:** Perfil cromatográfico da aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por extração em soxhlet (Ext). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



**Figura 43:** Perfil cromatográfico após a adição de ácido gálico e isoquercitrina na aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por extração em soxhlet (Ext). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



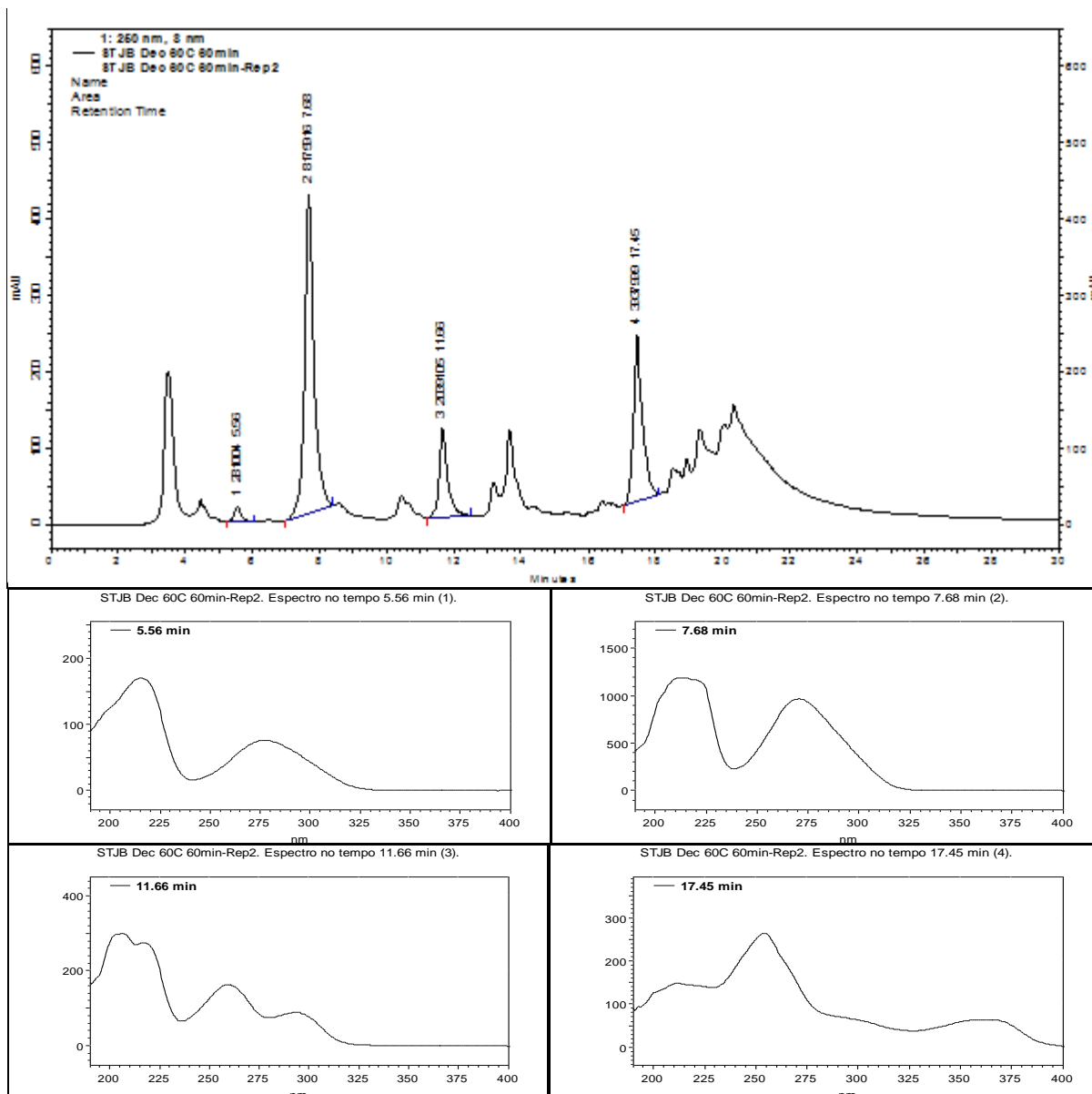
#### IV) Extrato por decocção diferenciada

O perfil do cromatograma (STJB Dec 60C 60 min) da solução obtida por decocção diferenciada da planta aroeira e os espectros de varredura de absorção molecular na região do UV/VIS, nos tempos de retenção referentes a três sinais, foram registrados (Figura 15). Observou-se similaridade entre os espectros obtidos no cromatograma de ácido gálico (Figura 38, em 7,72 min) e o espectro do sinal 2 (em 7,68 min) do perfil cromatografico da solução obtida por decocção diferenciada. Observou-se, também, similaridade entre os espectros obtidos no cromatograma da isoquercitrina (Figura 39, em 17,53 min) e o espectro do sinal 4 (em 17,45 min) do perfil cromatografico da solução obtida por decocção diferenciada.

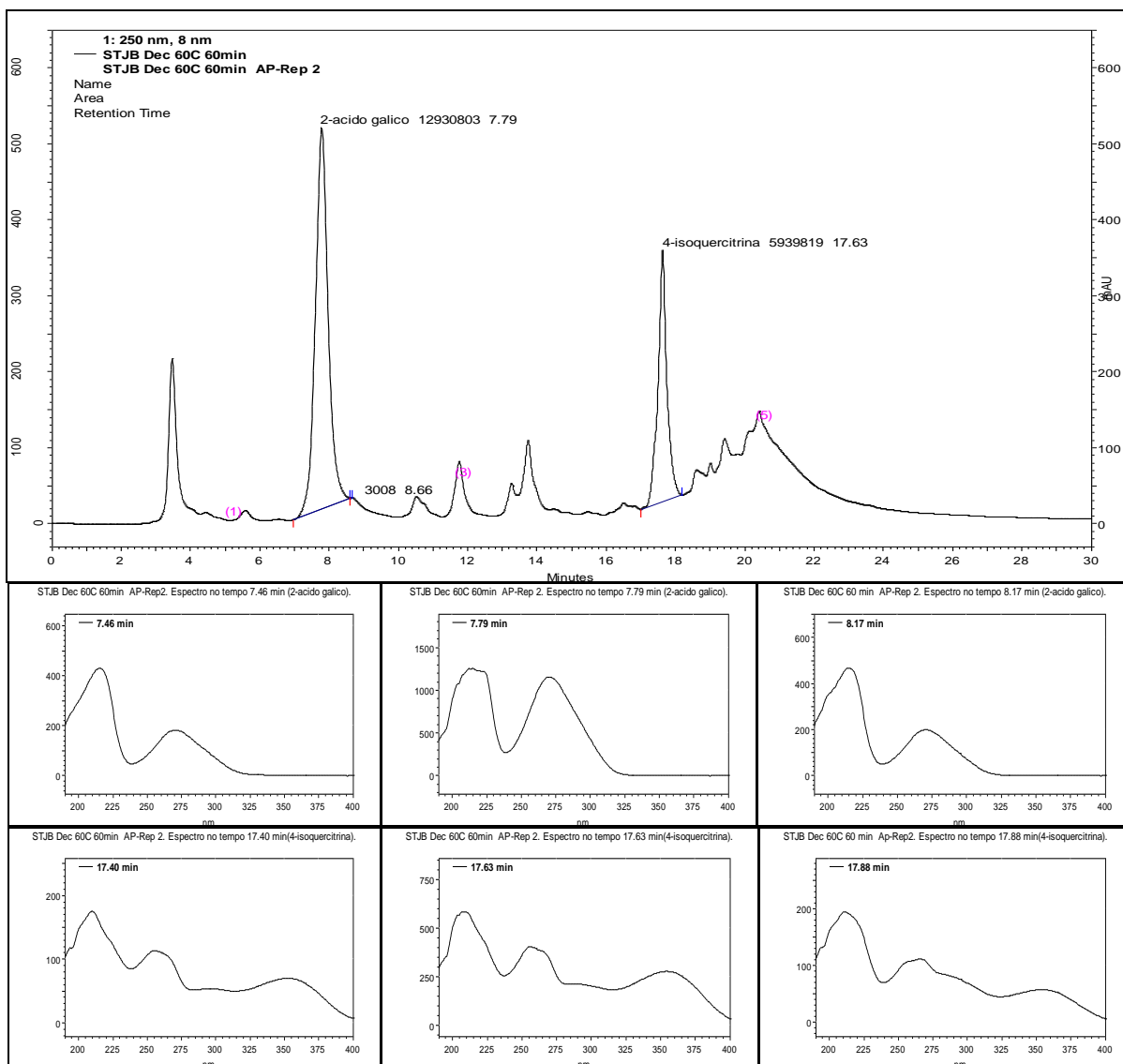
O perfil do cromatograma (STJB Dec 60C 60 min AP) da solução obtida por decocção diferenciada da planta aroeira adicionado de ácido gálico e isoquercitrina e os espectros de varredura de absorção molecular na região do UV/VIS em três tempos de retenção (início, meio e final), referentes ao sinal de ácido gálico e isoquercitrina, foram registrados (Figura 45). Observou-se um aumento do sinal e similaridade entre os espectros obtidos através dos cromatogramas de ácido gálico (em 7,46 min, 7,79 min e 8,17 min) e dos cromatogramas de isoquercitrina (em 17,40 min, 17,63 min e 17,88 min), evidenciando a identificação e a pureza do sinal referente ao ácido gálico e a isoquercitrina.



**Figura 44:** Perfil cromatográfico da aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



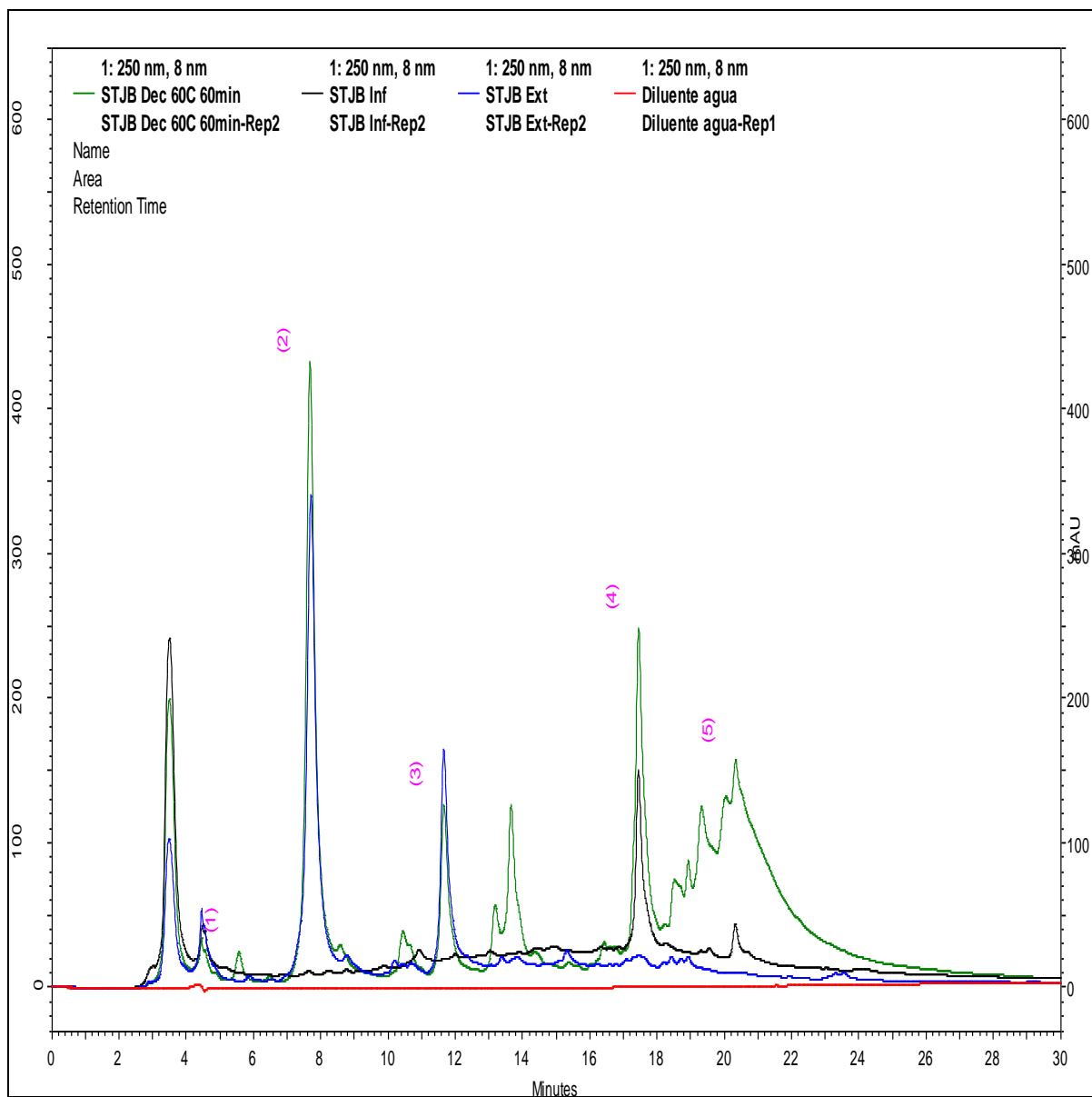
**Figura 45:** Perfil cromatográfico após adição de ácido gálico e isoquercitrina a aroeira da praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60  $\mu$ L



V) Determinação da eficiência da extração dos três procedimentos utilizados na planta aroeira (STJB)

Os perfis obtidos por meio dos três procedimentos de extração foram sobrepostos (Figura 46). A eficiência da extração de ácido gálico por soxhlet foi de 41155 % maior do que a extração por infusão. A eficiência da extração por decocção diferenciada foi de 44031 % maior do que a extração por infusão e 7 % maior que a extração por soxhlet (Tabela 20). A eficiência da extração da isoquercitrina por soxhlet foi de -76 % menor do que a extração por infusão e, a eficiência da extração diferenciada foi de 363 % maior do que a extração por infusão e 1859 % maior que a extração por soxhlet (Tabela 21).

**Figura 46:** Comparação dos perfis cromatográficos da aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (DAD). Solvente água. Preparações: infusão (Inf), extrato (Ext) e decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8mL/min; volume de injeção de 60 µL, detecção a 250 nm



**Tabela 20:** Eficiencia (%) da extração de ácido gálico

	<b>Concentração (mg/mL) (1)</b>	<b>Area (ácido gálico) (2)</b>	<b>Razão (Area/Conc) (3)</b>	<b>Eficiencia (Infusão) (4)</b>	<b>Eficiencia (Extração) (5)</b>
<b>Infusão</b>	22,569	40912	1813	-	-
<b>Extração</b>	9,0265	6750435	747846	41155 %	-
<b>Dec 60C 60min</b>	10,220	8175916	799992	44031 %	7 %

**Legenda:** (3) = (2)/(1);

41155 % = (((3) do STJB Ext-(3) do STJB Inf)/((3) do STJB Inf)) x 100);

44031 % = (((3) do STJB Dec 60C 60 min-(3) do STJB Inf)/(3) do STJB Inf)) x 100);

7 % = (((3) do STJB Dec 60C 60 min-(3) do STJB Ext)/(3) do STJB Ext)) x 100)

**Tabela 21:** Eficiencia (%) da extração de isoquercitrina

	<b>Concentração (mg/mL) (1)</b>	<b>Area (isoquercitrina) (2)</b>	<b>Razão (Area/Conc) (3)</b>	<b>Eficiencia (Infusão) (4)</b>	<b>Eficiencia (Extração) (5)</b>
<b>Infusão</b>	22,569	1877368	83183	-	-
<b>Extração</b>	9,0265	177545	19669	-76 %	-
<b>Dec 60C 60 min</b>	10,220	3937999	385323	363 %	1859 %

**Legenda:** (3) = (2)/(1);

-76 % = (((3) do STJB Ext-(3) do STJB Inf)/(3) do STJB Inf)) x 100);

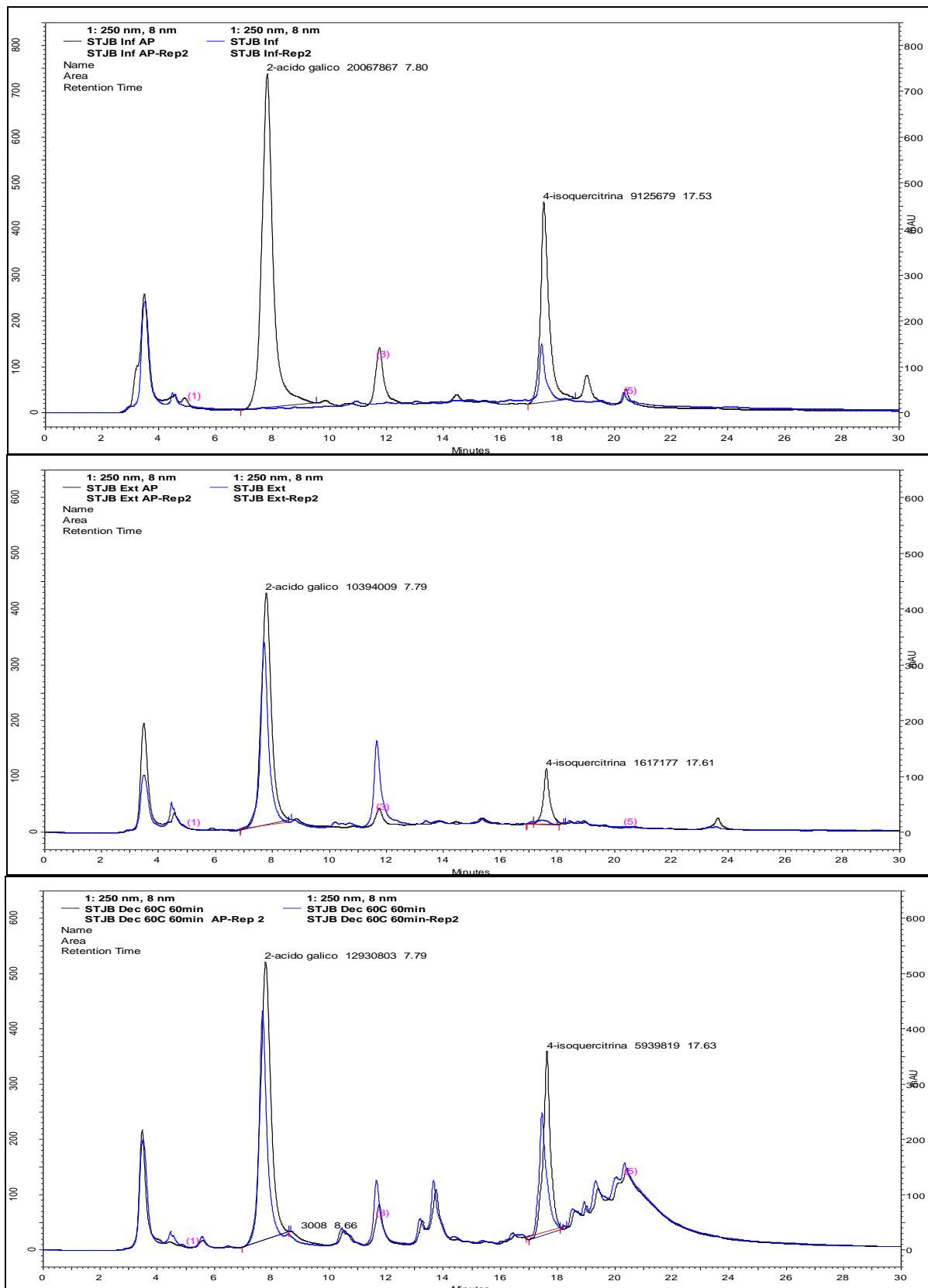
363 % = (((3) do STJB Dec 60C 60 min-(3) do STJB Inf)/(3) do STJB Inf)) x 100);

1859 % = (((3) do STJB Dec 60C 60 min-(3) do STJB Ext)/(3) do STJB Inf)) x 100)

## VI) Determinação da recuperação e a estimativa do teor de ácido gálico e isoquercitrina

Os perfis obtidos por meio dos três procedimentos de extração foram sobrepostos aos respectivos perfis adicionados de marcadores ácido gálico e isoquercitrina (Figura 47). Foi determinada a recuperação e estimado o teor de ácido gálico e da isoquercitrina nos extratos. Observou-se que os três procedimentos de extração apresentaram uma boa recuperação de ácido gálico (98,9; 101,9 e 99,8 %, respectivamente) e de isoquercitrina (96,4; 95,7; e 98,6 %, respectivamente) para o nível de concentração de trabalho (Tabelas 22 e 23). Observou-se que o teor estimado de ácido gálico (0,02; 0,66 e 0,70 %, respectivamente) e de isoquercitrina (0,03; 0,01 e 0,15 %, respectivamente) foi resultado da melhor eficiência da extração, que foi maior no procedimento por decocção diferenciada (Tabelas 22 e 23). Estes fatos aliados, a necessidade do uso de metade de material vegetal (1 g) e de ter requerido um tempo relativamente curto para extrair os analitos (60 min), fez com que o procedimento tivesse sido o melhor também para a extração de ácido gálico e isoquercitrina. O perfil gerado, também foi adequado, pois apresentam quatro sinais resolvidos de boa intensidade com espectros de absorção molecular na região UV-VIS bem definidos por possuírem vários pontos de máximos e mínimos.

**Figura 47:** Comparação dos perfis cromatográficos antes e após a adição de ácido gálico e isoquercitrina na aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (DAD). Solvente água, preparação por infusão, extração em soxhlet e decocção diferenciada. Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm)



**Tabela 22:** Determinação da recuperação e do teor (estimado) de ácido gálico nas preparações do estudo da aroeira (STJB)

<b>Cromatograma</b>	<b>Conc. (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>) (1)</b>	<b>Área Antes (2)</b>	<b>Área após adição (3)</b>	<b>Aumento da área (4)</b>	<b>Recuperação (%) (5)</b>	<b>Teor (%) (6)</b>
<b>Ácido gálico ST 16</b>	0,07329	8341280	-	-	-	100
<b>Adição de 17 <math>\mu\text{L}</math> no STJB Inf</b>	177,99	-	-	20257394	-	-
<b>Adição de 3 <math>\mu\text{L}</math> no STJB Ext</b>	31,41	-	-	3574834	-	-
<b>Adição de 4 <math>\mu\text{L}</math> no STJB Dec 60C</b>	41,88	-	-	4766446	-	-
<b>STJB Inf</b>	22,569	40912	20067867	20026955	98,9	0,002
<b>STJB Ext</b>	9,0265	6750435	10394009	3643574	101,9	0,66
<b>STJB Dec 60C</b>	10,220	8175916	12930803	4754887	99,8	0,70

**Legenda:** (1) = concentração; (4) = (3)-(2); (5) = (((4) no extrato/(4) na adição) x 100);  
 (6) = (((2) no extrato/(2) no ácido gálico) x ((1) no ácido gálico/(1) no extrato) x 100);  
 $20257394 = (((17 \times 10,47) \times 8341280 / 0,07329)) / 1000$ ;  
 $3574834 = (((3 \times 10,47) \times 8341280 / 0,07329)) / 1000$ ;  
 $4766446 = (((4 \times 10,47) \times 8341280 / 0,07329)) / 1000$

**Tabela 23:** Determinação da recuperação e do teor (estimado) de isoquercitrina nas preparações do estudo da aroeira (STJB)

<b>Cromatograma</b>	<b>Conc. (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>) (1)</b>	<b>Área Antes (2)</b>	<b>Área após adição (3)</b>	<b>Aumento da área (4)</b>	<b>Recuperação (%) (5)</b>	<b>Teor (%) (6)</b>
<b>Isoquercitrina ST 5'</b>	0,01392	3609528	-	-	-	100
<b>Adição de 100 <math>\mu\text{L}</math> no STJB Inf</b>	29,00	-	-	7519850	-	-
<b>Adição de 20 <math>\mu\text{L}</math> no STJB Ext</b>	5,80	-	-	1503970	-	-
<b>Adição de 27 <math>\mu\text{L}</math> no STJB Dec 60C</b>	7,83	-	-	2030360	-	-
<b>STJB Inf</b>	22,569	1877368	9125679	7248311	96,4	0,03
<b>STJB Ext</b>	9,0265	177545	1617177	1439632	95,7	0,01
<b>STJB Dec 60C</b>	10,220	3937999	5939819	2001820	98,6	0,15

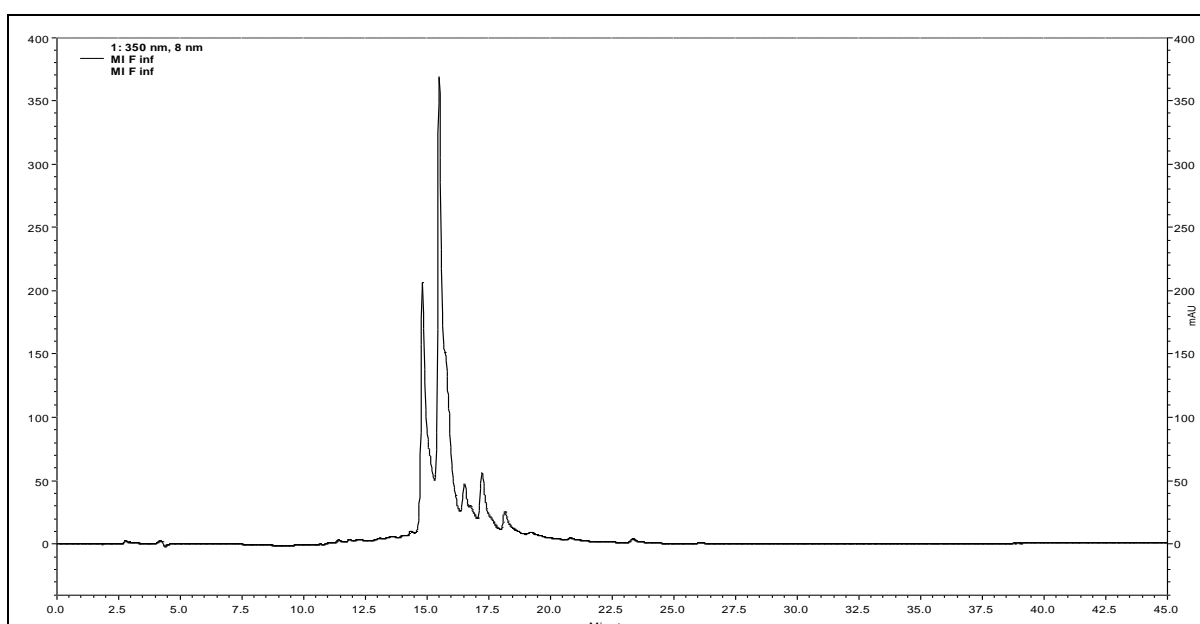
**Legenda:** (1) = concentração; (4) = (3)-(2); (5) = (((4) no extrato/(4) na adição) x 100);  
 (6) = (((2) no extrato/(2) na isoquercitrina) x ((1) na isoquercitrina/(1) no extrato) x 100));  
 $7519850 = (((100 \times 0,29) \times 3609528 / 0,01392)) / 1000$ ;  
 $1503970 = (((20 \times 0,29) \times 3609528 / 0,01392)) / 1000$ ;  
 $2030360 = (((27 \times 0,29) \times 3609528 / 0,01392)) / 1000$



#### 4.2.1.3 Resultados dos extratos da planta espinheira-santa (MIJB) em água

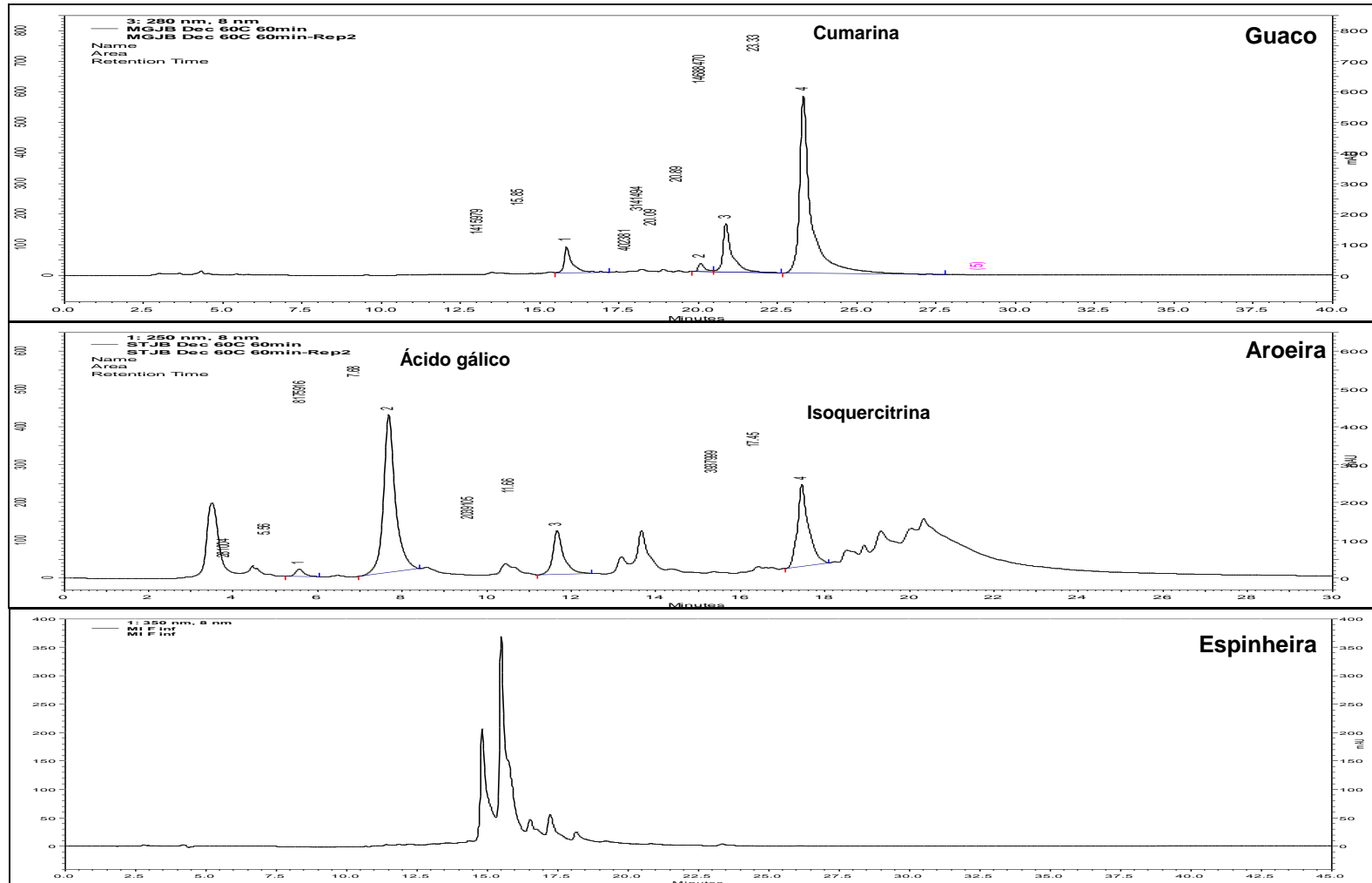
O perfil do cromatograma (MGJB Inf) da solução obtida por infusão da planta espinheira neste sistema (método 1) não apresentou sinais resolvidos (Figura 49). Portanto, não foi possível continuar os estudos da avaliação da eficiência da extração e nem a avaliação da identificação, pureza, recuperação e teor dos marcadores (catequina, epicatequina e rutina) com este método. Foi necessário desenvolver um outro método cromatográfico (método 2) para a espinheira-santa.

**Figura 48:** Perfil cromatográfico da espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (DAD). Solvente água, preparação por infusão (Inf). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm d.i.); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30<sup>o</sup> C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40  $\mu$ L, detecção a 350 nm



A Figura 49 mostra o cromatograma do perfil das três plantas extraídas por decocção diferenciada utilizando o método 1.

**Figura 49:** Perfil cromatográfico do guaco, da aroeira-da-praia e da epineira-santa, cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280, 250 e 350 nm respectivamente). Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 1: coluna C18 Symmetry (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i); fase móvel (ACN grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 30° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 40,60 e 60 µL respectivamente.



4.2.2 Perfis cromatográficos obtidos por Cromatografia Líquida com detector UV/Vis (DAD) das plantas espinheira-santa (MIJB), guaco (MGJB) e aroeira-da-praia (STJB) utilizando o método 2

4.2.2.1 *Resultados dos extratos da planta espinheira-santa (MIJB) em água (infusão, extrato e decocção diferenciada)*

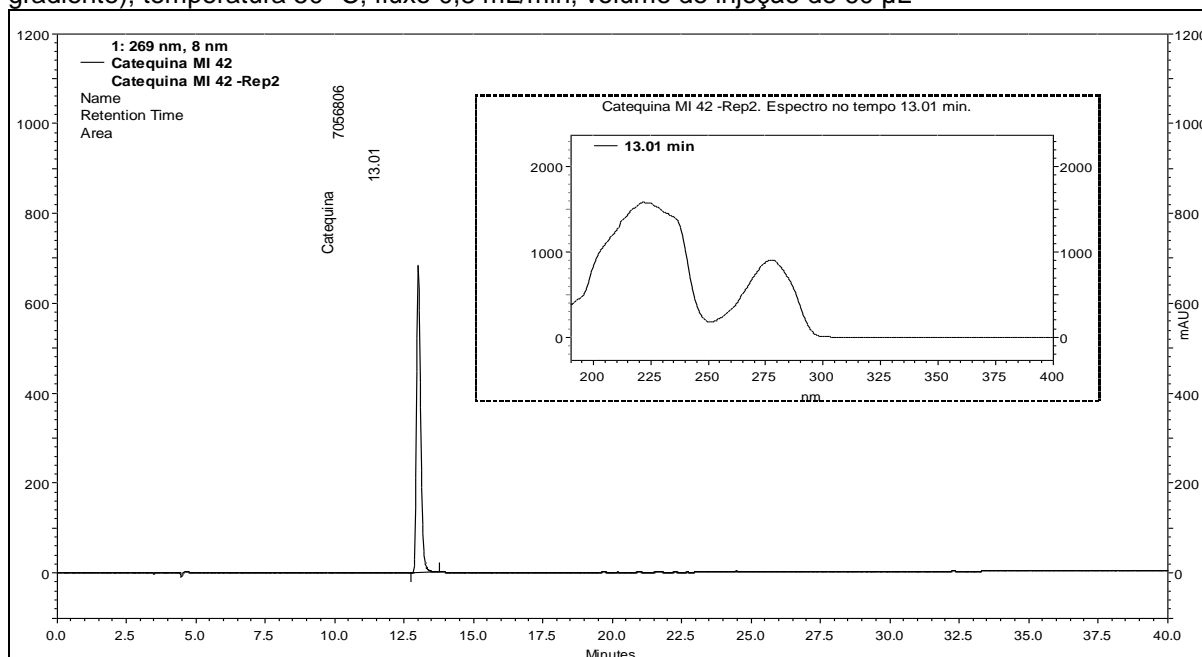
I) Marcadores da espinheira-santa (catequina, epicatequina e rutina)

O cromatograma (catequina - MI 42) da solução contendo o marcador catequina e o espectro de varredura de absorção molecular na região do UV/VIS no tempo de retenção referente a catequina foi registrado (Figura 50).

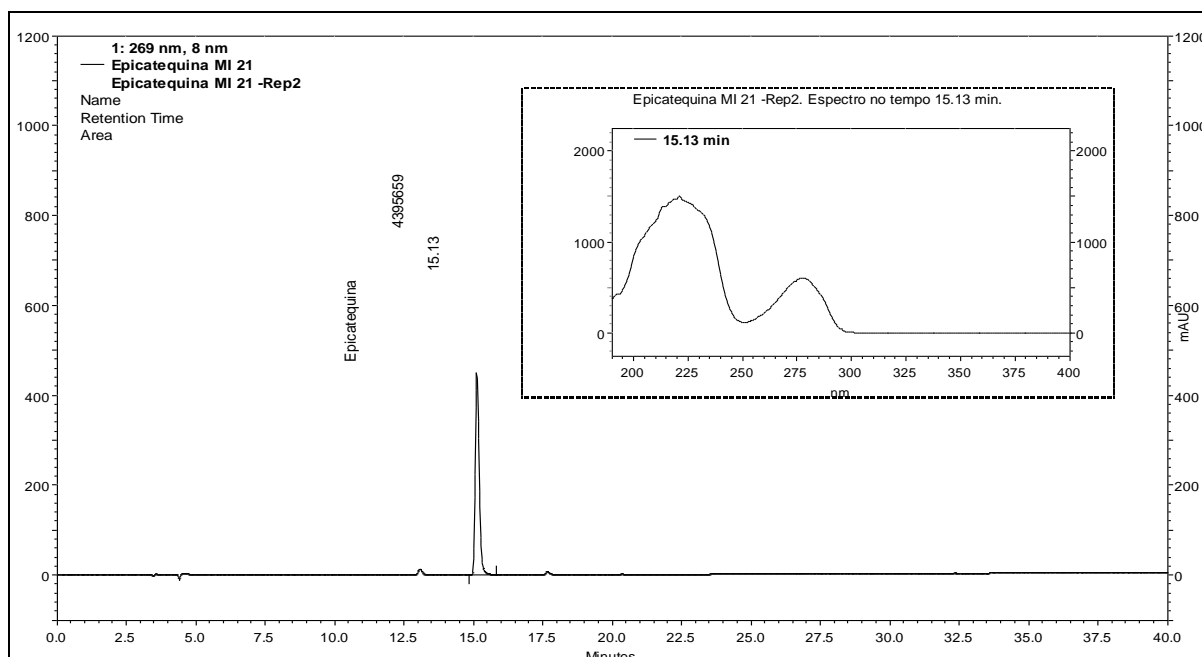
O cromatograma (epicatequina - MI 21) da solução contendo o marcador epicatequina e o espectro de varredura de absorção molecular na região do UV/VIS no tempo de retenção referente a epicatequina foi registrado (Figura 51).

O cromatograma (rutina - USP) da solução contendo o marcador rutina e o espectro de varredura de absorção molecular na região do UV/VIS no tempo de retenção referente a rutina foi registrado (Figura 52)

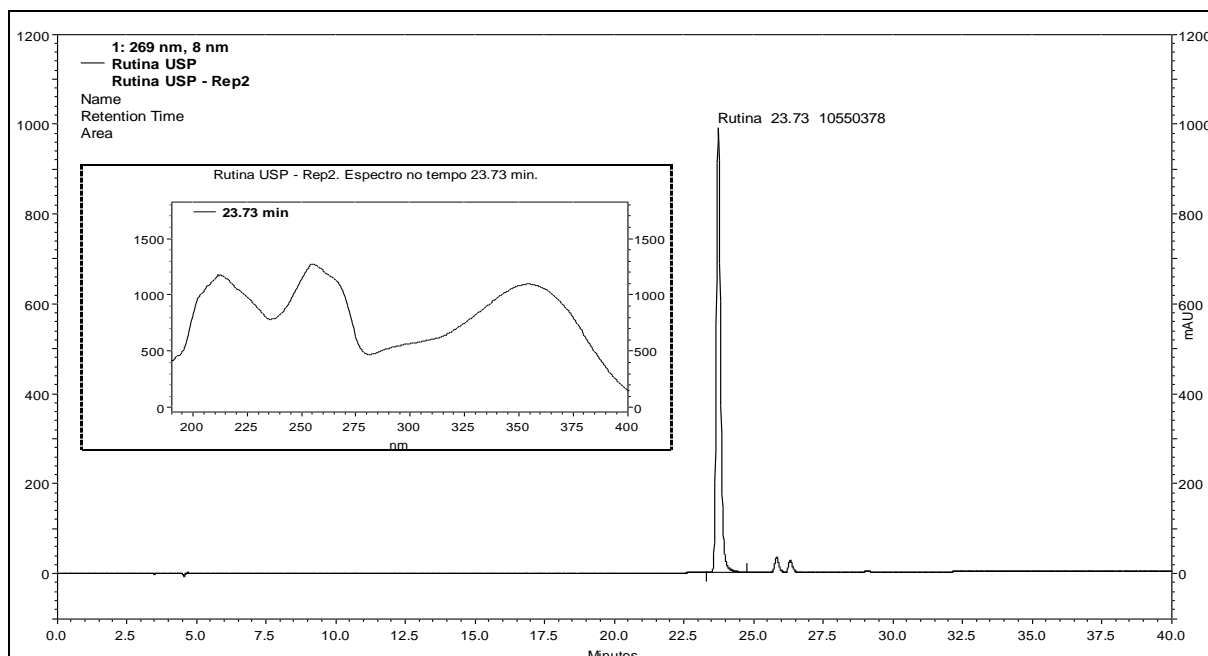
**Figura 50:** Cromatograma da catequina (MI 42), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i.); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50 $^{\circ}$  C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60  $\mu$ L



**Figura 51:** Cromatograma da epicatequina (MI 21), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i.); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50 $^{\circ}$  C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60  $\mu$ L



**Figura 52:** Cromatograma da rutina (USP), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL

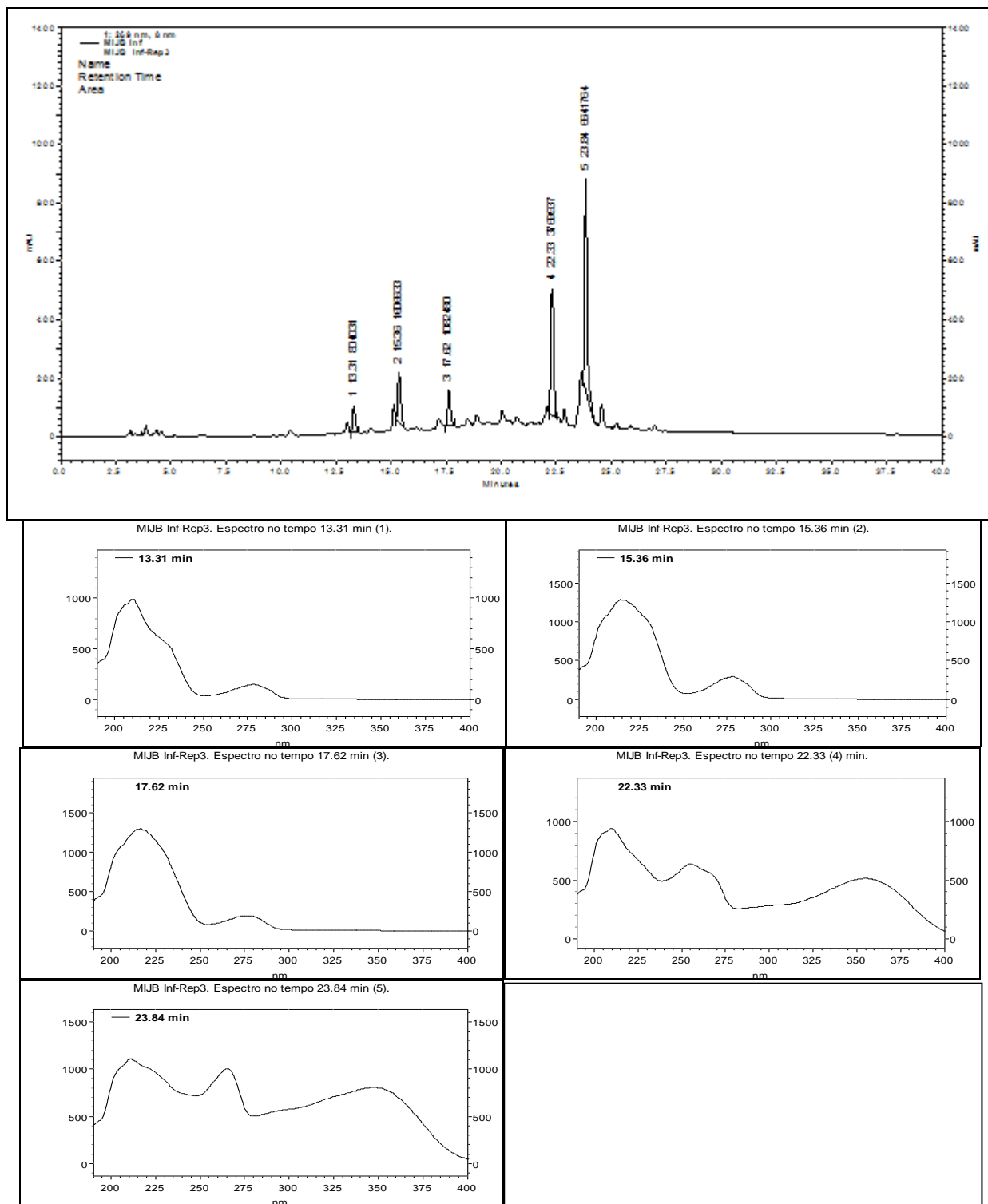


## II) Extrato por infusão

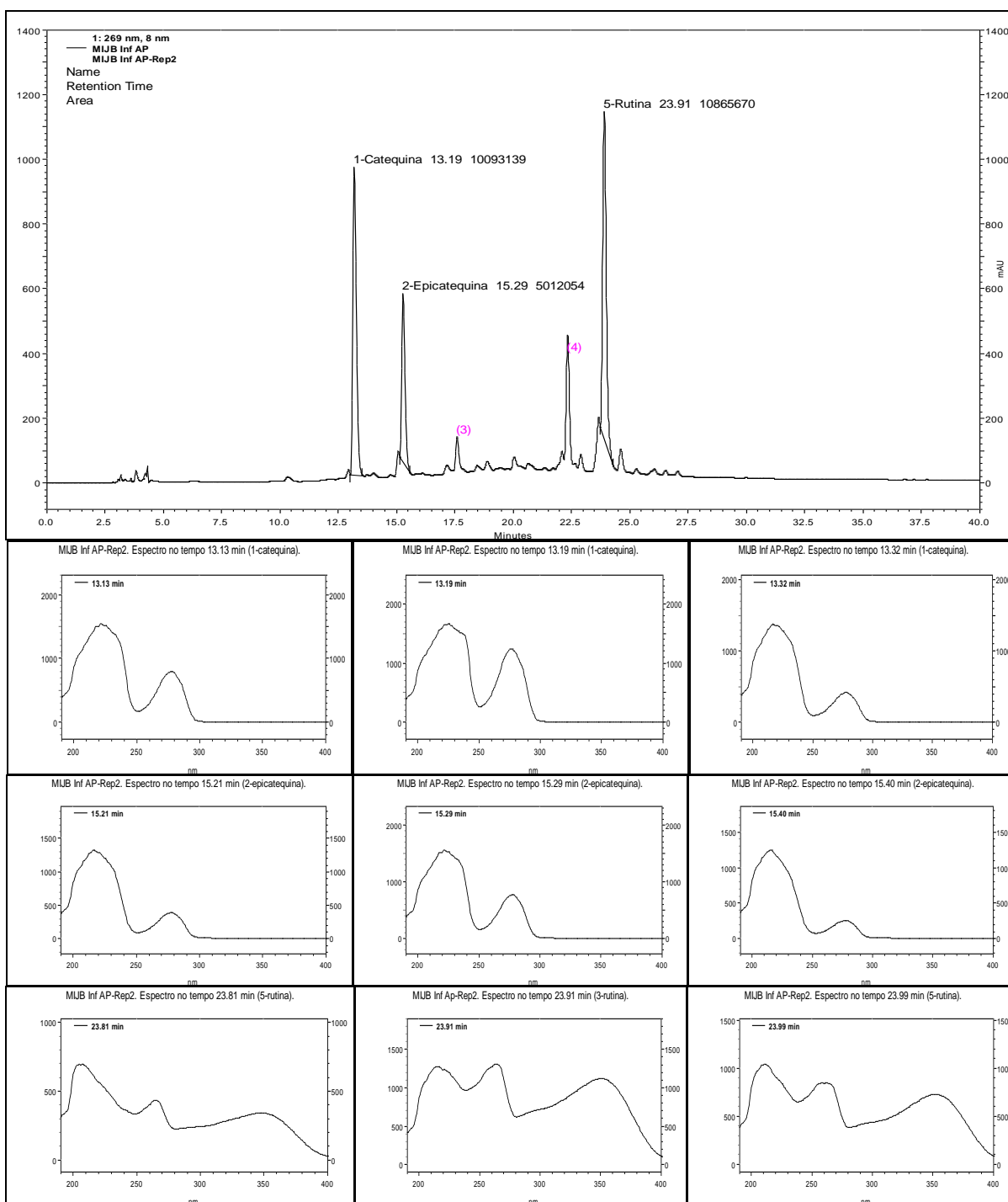
O perfil do cromatograma (MIJB Inf) da solução obtida por infusão da planta espinheira e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS, nos tempos de retenção referentes a cinco sinais, foram registrados (Figura 53). Observou-se similaridade entre o espectro obtido no cromatograma de catequina (Figura 50, em 13,01 min) e o espectro do sinal 1 (em 13,31 min); entre o espectro obtido no cromatograma da epicatequina (Figura 51, em 15,13 min) e o espectro do sinal 2 (em 15,35 min) e entre o espectro obtido no cromatograma da rutina (Figura 52, em 23,73 min) e o espectro do sinal 5 (em 23,84 min) do perfil cromatográfico da solução obtida por extração por infusão.

O perfil do cromatograma (MIJB Inf AP) da solução obtida por infusão da planta espinheira adicionados de catequina, epicatequina e rutina e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS em três tempos de retenção (início, meio e final), referentes aos sinais de catequina, epicatequina e rutina foram registrados (Figura 54). Observou-se um aumento do sinal e similaridade entre os espectros obtidos no cromatograma de catequina (em 13,13 min; 13,19 min e 13,32 min), epicatequina (em 15,21 min; 15,29 min e 16,40 min) e rutina (em 23,81 min; 23,91 min e 23,99 min), evidenciando a identificação e a pureza do sinal referente a catequina, epicatequina e rutina.

**Figura 53:** Perfil cromatográfico da espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por infusão (Inf). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60  $\mu$ L



**Figura 54:** Perfil cromatográfico após a adição de catequina, epicatequina e rutina na espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por infusão (Inf). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



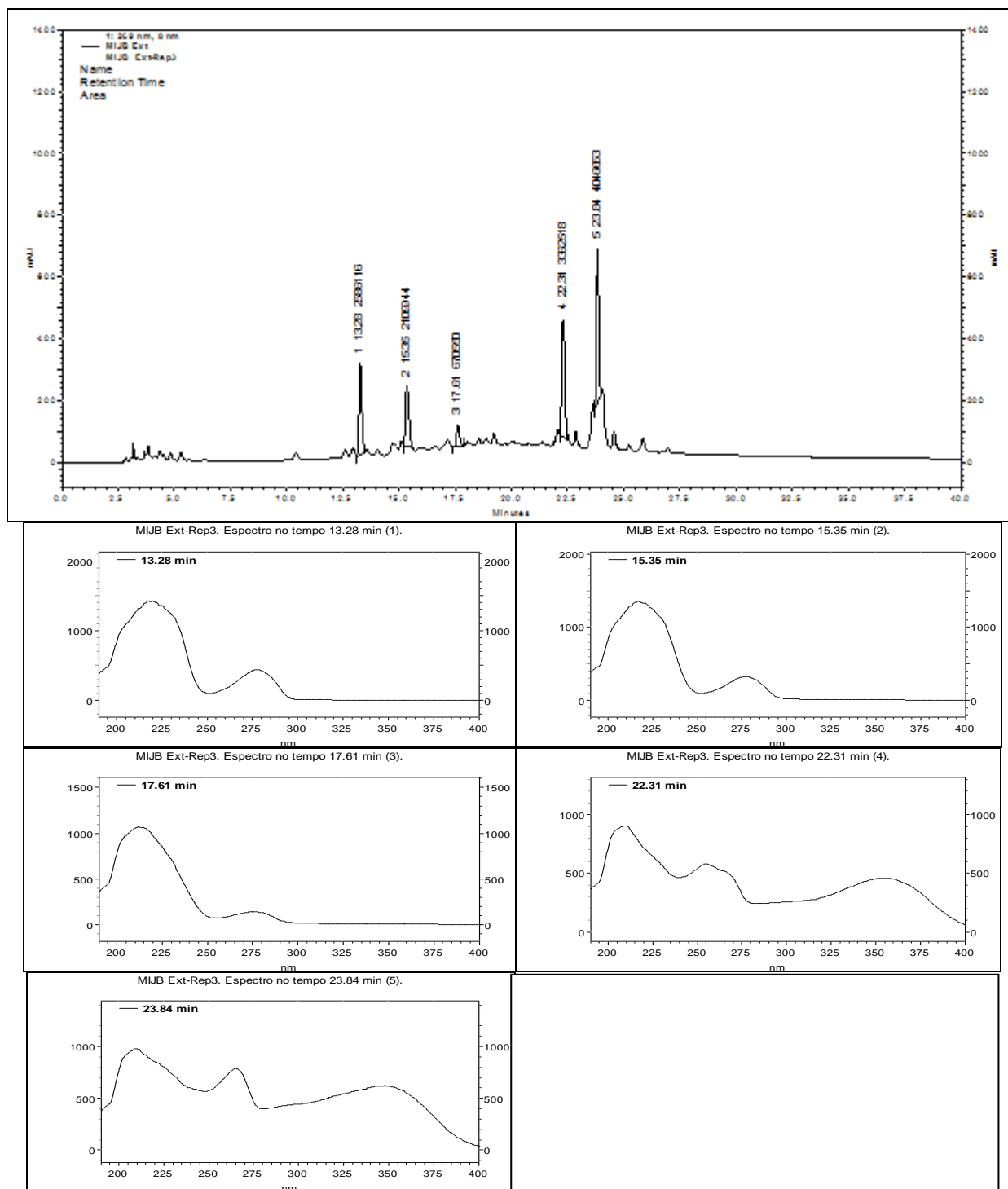


### III) Extrato por extração em soxhlet

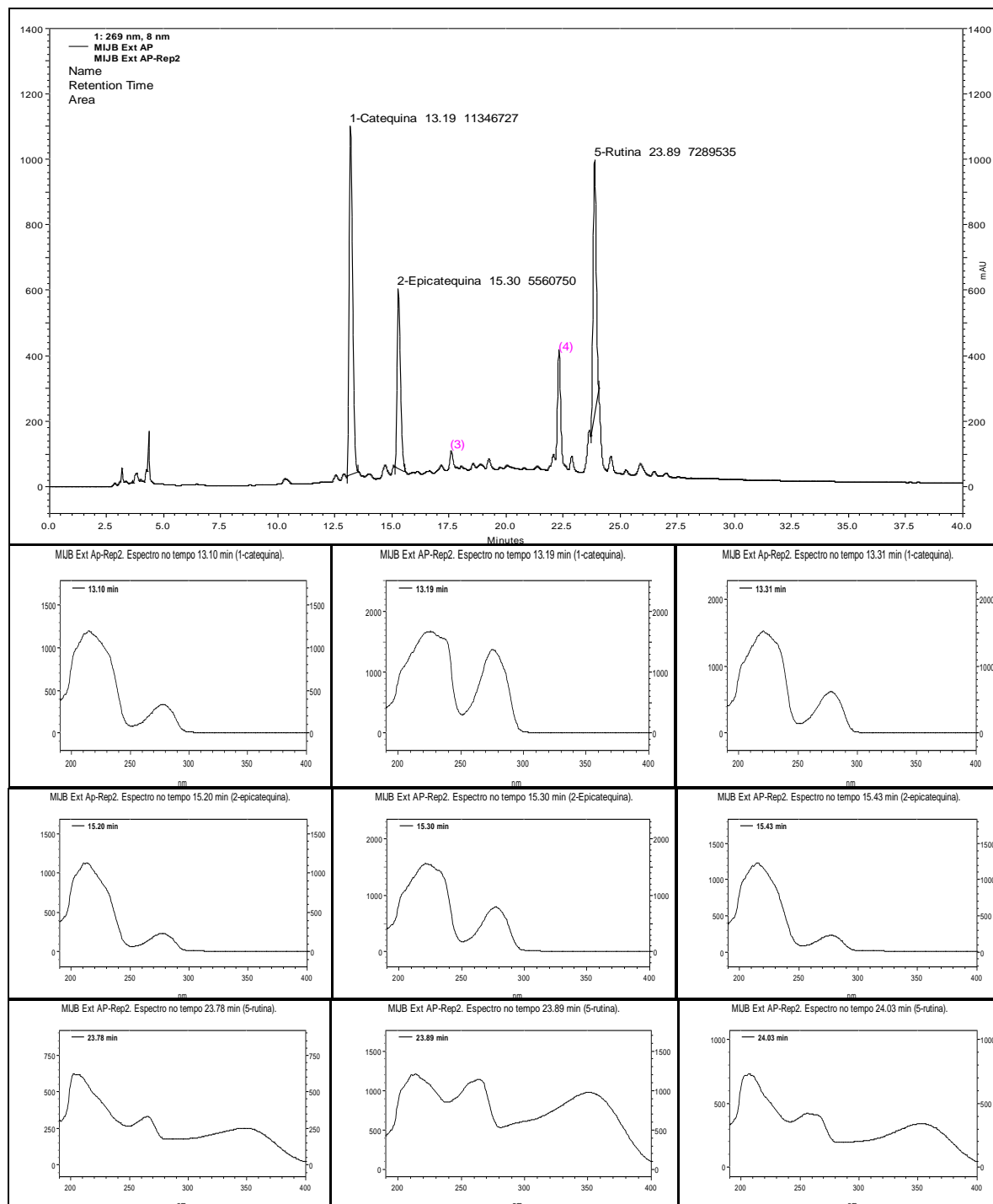
O perfil do cromatograma (MIJB Ext) da solução obtida por extração em soxhlet da planta espinheira e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS, nos tempos de retenção referentes a cinco sinais, foram registrados (Figura 55). Observou-se similaridade entre o espectro obtido no cromatograma de catequina (Figura 50, em 13,01 min) e o espectro do sinal 1 (em 13,28 min), entre o espectro obtido no cromatograma da epicatequina (Figura 51, em 15,13 min) e o espectro do sinal 2 (em 15,35 min) e entre o espectro obtido no cromatograma da rutina (Figura 52, em 23,73 min) e o espectro do sinal 5 (em 23,84 min) do cromatograma da solução obtida por extração em soxhlet.

O perfil do cromatograma (MIJB Ext AP) da solução obtida por extração em soxhlet da planta espinheira adicionado de catequina, epicatequina e rutina e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS em três tempos de retenção (início, meio e final), referentes aos sinais de catequina, epicatequina e rutina foram registrados (Figura 56). Observou-se um aumento do sinal e similaridade entre os espectros obtidos no cromatograma da catequina (em 13,10 min; 13,19 min e 13,31 min), epicatequina (em 15,20 min; 15,30 min e 15,43 min) e rutina (em 23,78 min; 23,89 min e 24,03 min), evidenciando a identificação e a pureza do sinal referente a catequina, epicatequina e rutina.

**Figura 55:** Perfil cromatográfico da espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por extração em soxhlet (Ext). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



**Figura 56:** Perfil cromatográfico após a adição de catequina, epicatequina e rutina na espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por extração em soxhlet (Ext). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL

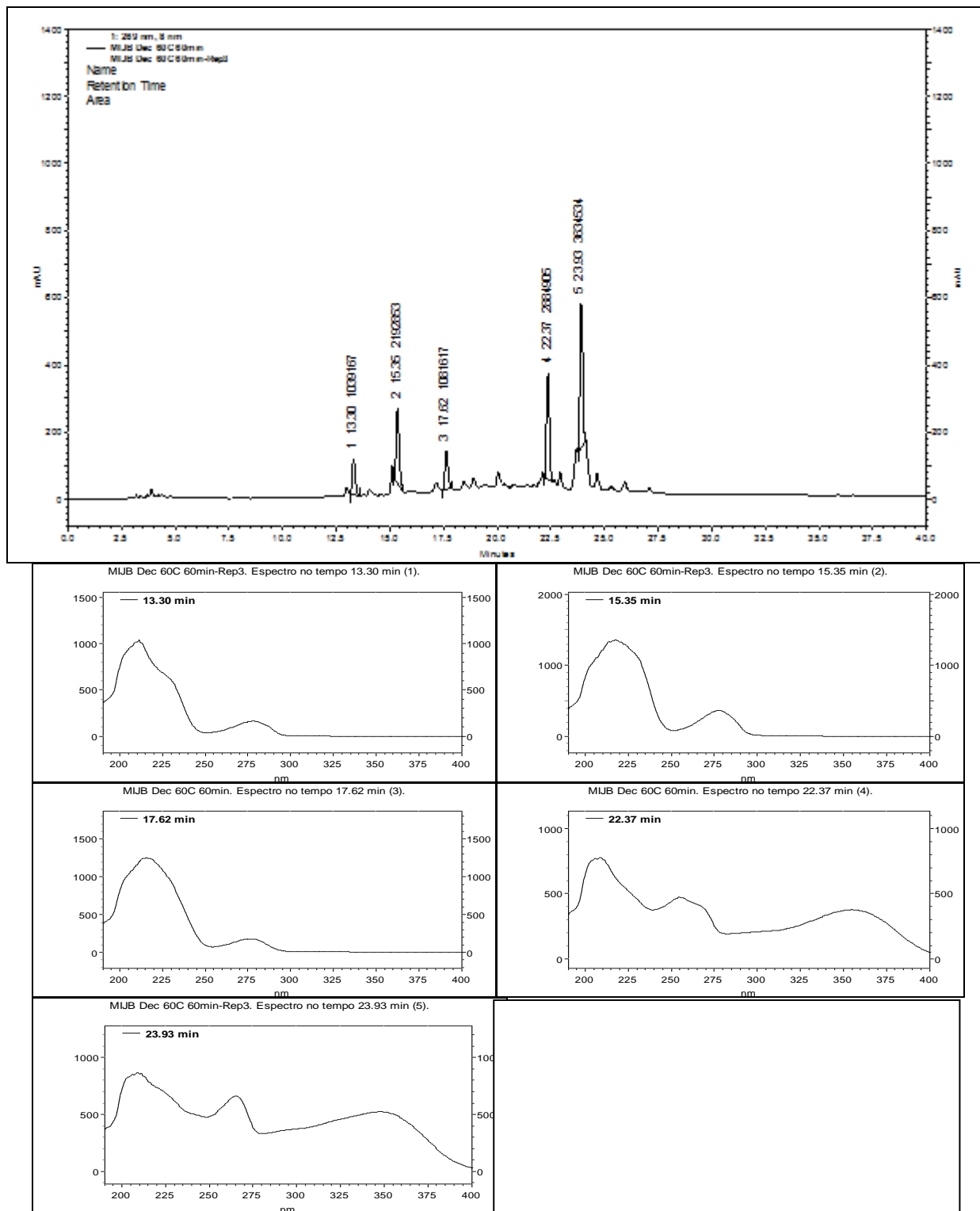


#### IV) Extrato por decocção diferenciada

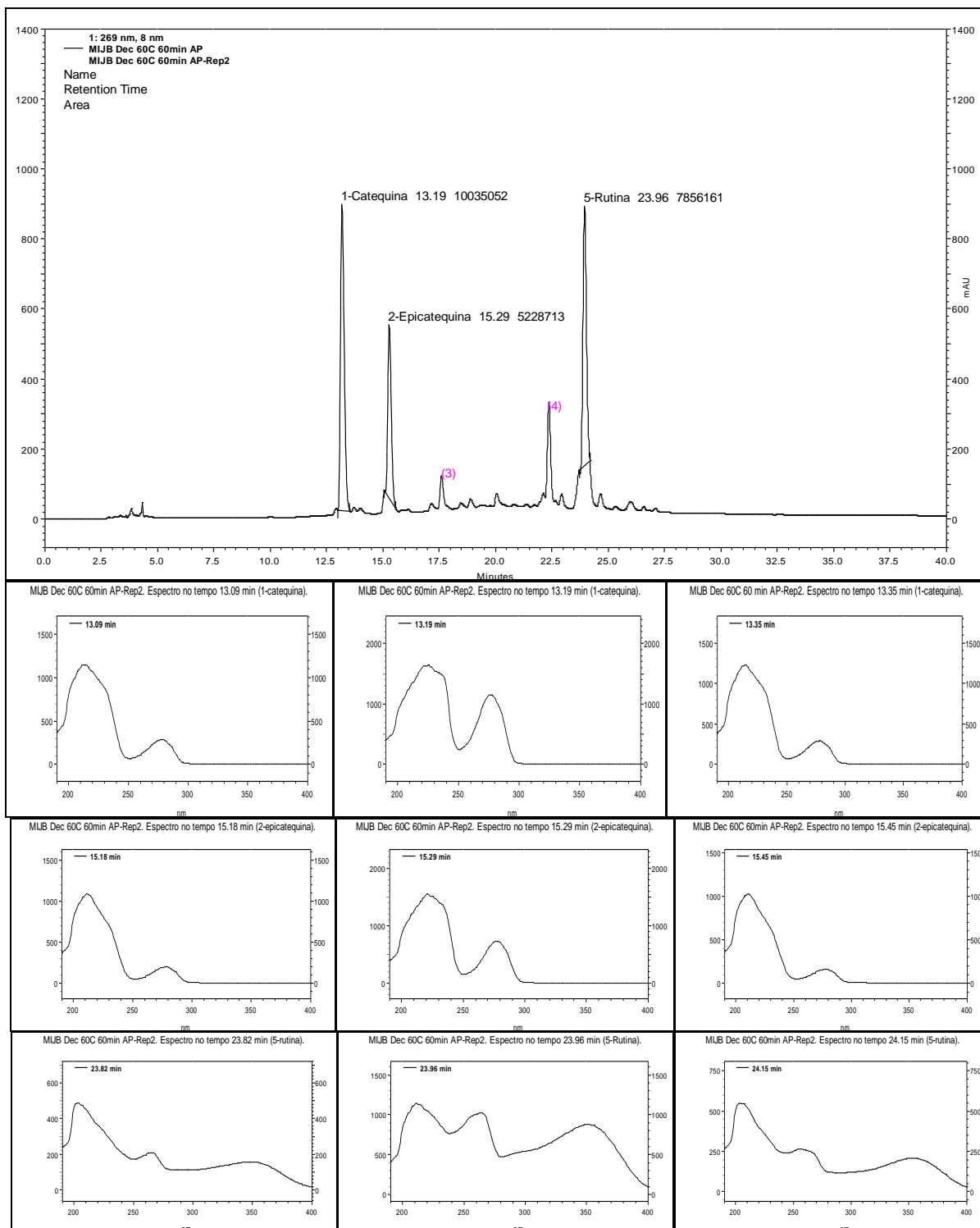
O perfil do cromatograma (MIJB Dec 60C 60 min) da solução por decocção diferenciada da planta espinheira e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS, nos tempos de retenção referentes a cinco sinais, foram registrados (Figura 57). Observou-se similaridade entre o espectro obtido no cromatograma de catequina (Figura 50, em 13,01 min) e o espectro do sinal 1 (em 13,30 min); entre os espectros obtidos no cromatograma da epicatequina (Figura 51, em 15,13 min) e o espectro do sinal 2 (em 15,35 min) e entre os espectros obtidos no cromatograma da rutina (Figura 52, em 23,73 min) e o espectro do sinal 5 (em 23,93 min) do cromatograma da solução obtida por decocção diferenciada.

O perfil do cromatograma (MIJB Dec 60C 60 min AP) da solução obtida por decocção diferenciada da planta espinheira adicionado de catequina, epicatequina e rutina e os espectros de varredura de absorção molecular na região do UV/VIS em três tempos de retenção (início, meio e final), referentes aos sinais de catequina, epicatequina e rutina foram registrados (Figura 58). Observou-se um aumento do sinal e similaridade entre os espectros obtidos no cromatograma de catequina (em 13,09 min; 13,19 min e 13,35 min), epicatequina (em 15,18 min; 15,29 min e 15,45 min) e rutina (em 23,82 min; 23,96 min e 24,15 min), evidenciando a identificação e a pureza do sinal referente a catequina, epicatequina e rutina.

**Figura 57:** Perfil cromatográfico da espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i.); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



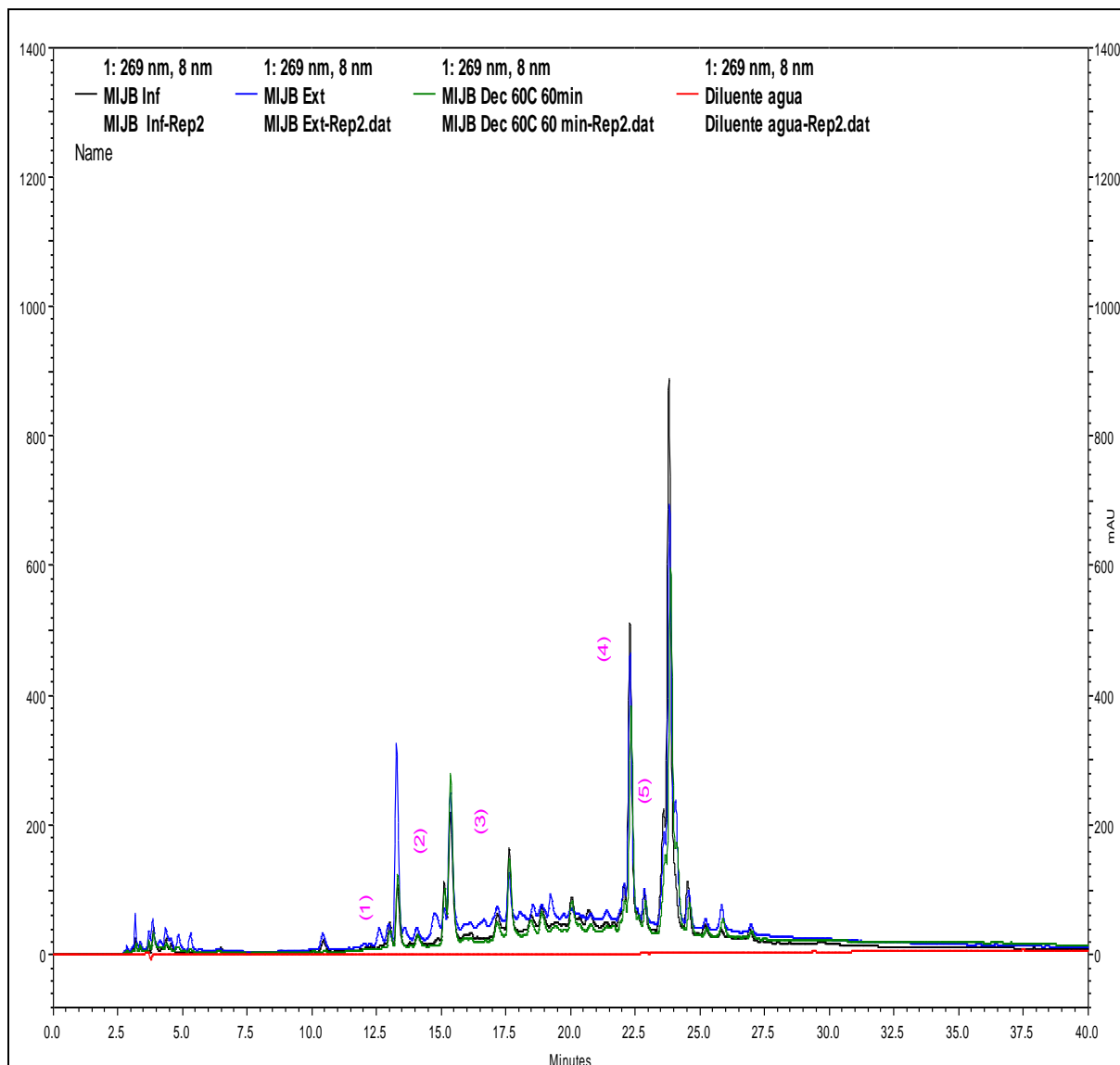
**Figura 58:** Perfil cromatográfico após a adição de catequina, epicatequina e rutina na espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50 $^{\circ}$ C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60  $\mu$ L



V) Determinação da eficiência da extração dos três procedimentos utilizados na planta espinheira (MIJB)

Os perfis obtidos por meio dos três procedimentos de extração foram sobrepostos (Figura 59). A eficiência da extração de catequina por soxhlet foi de 549 % maior do que a extração por infusão, a eficiência da extração de catequina por decocção diferenciada foi de 183 % maior do que a extração por infusão e 56 % menor que a extração por soxhlet (Tabela 24). A eficiência da extração da epicatequina por soxhlet foi de 165 % maior do que a extração por infusão e a eficiência da extração de epicatequina por decocção diferenciada foi de 199 % maior do que a extração por infusão e 13 % maior que a extração por soxhlet (Tabela 25). A eficiência da extração da rutina por soxhlet foi de 23 % maior do que a extração por infusão e a eficiência da extração da rutina por decocção diferenciada foi de 20 % maior do que a extração por infusão e 3 % menor que a extração por soxhlet (Tabela 26).

**Figura 59:** Comparação dos perfis cromatográficos da espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (DAD). Solvente água. Preparações: infusão (Inf), extração em soxhlet (Ext) e decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL, detecção a 269 nm





**Tabela 24:** Eficiencia (%) da extração de catequina

	<b>Concentração (mg/mL) (1)</b>	<b>Area (catequina) (2)</b>	<b>Razão (Area/Conc) (3)</b>	<b>Eficiencia (Infusão) (4)</b>	<b>Eficiencia (Extração) (5)</b>
<b>Infusão</b>	22,471	804031	35781	na	na
<b>Extração</b>	11,145	2586116	232043	549	na
<b>Dec 60C 60 min</b>	10,272	1039167	101165	183	-56

**Legenda:** (3) = (2)/(1);

549 % = (((3) do MIJB Ext-(3) do MIJB Inf)/(3) do MIJB Inf) x 100);

183 % = (((3) do MIJB Dec 60C 60 min-(3) do MIJB Inf)/(3) do MIJB Inf) x 100);

- 56 % = (((3) do MIJB Dec 60C 60 min-(3) do MIJB Ext)/(3) do MIJB Ext) x 100)

**Tabela 25:** Eficiencia (%) da extração de epicatequina

	<b>Concentração (mg/mL) (1)</b>	<b>Area (epicatequina) (2)</b>	<b>Razão (Area/Conc) (3)</b>	<b>Eficiencia (Infusão) (4)</b>	<b>Eficiencia (Extração) (5)</b>
<b>Infusão</b>	22,471	1606633	71498	na	na
<b>Extração</b>	11,145	2109944	189318	165	na
<b>Dec 60C 60 min</b>	10,272	2192853	213479	199	13

**Legenda:** (3) = (2)/(1);

165 % = (((3) do MIJB Ext-(3) do MIJB Inf)/(3) do MIJB Inf) x 100);

199 % = (((3) do MIJB Dec 60C 60 min-(3) do MIJB Inf)/(3) do MIJB Inf) x 100);

13 % = (((3) do MIJB Dec 60C 60 min-(3) do MIJB Ext)/(3) do MIJB Ext) x 100)

**Tabela 26:** Eficiencia (%) da extração de rutina

	<b>Concentração (mg/mL) (1)</b>	<b>Area (rutina) (2)</b>	<b>Razão (Area/Conc) (3)</b>	<b>Eficiencia (Infusão) (4)</b>	<b>Eficiencia (Extração) (5)</b>
<b>Infusão</b>	22,471	6641764	295570	na	na
<b>Extração</b>	11,145	4046653	363091	23	na
<b>Dec 60C 60 min</b>	10,272	3634534	353829	20	-3

**Legenda:** (3) = (2)/(1);

23 % = (((3) do MIJB Ext-(3) do MIJB Inf)/(3) do MIJB Inf) x 100);

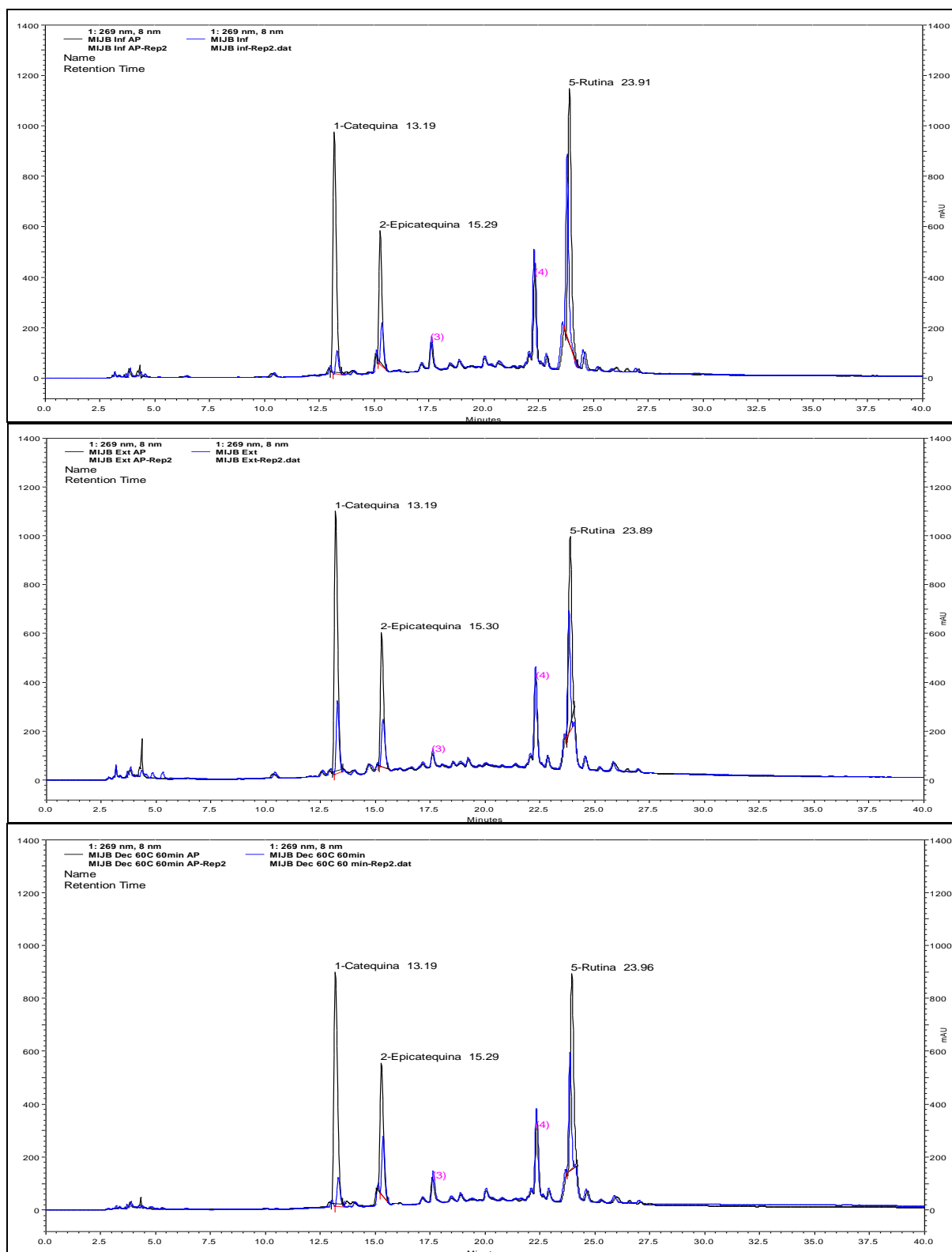
20 % = (((3) do MIJB Dec 60C 60 min-(3) do MIJB Inf)/(3) do MIJB Inf) x 100);

- 3 % = (((3) do MIJB Dec 60C 60 min-(3) do MIJB Ext)/(3) do MIJB Ext) x 100)

## VI) Determinação da recuperação e a estimativa do teor de catequina, epicatequina e rutina

Os perfis obtidos por meio dos três procedimentos de extração foram sobrepostos aos respectivos perfis adicionados de marcadores catequina, epicatequina e rutina (Figura 60). Foi determinada a recuperação de catequina, epicatequina e rutina nos procedimentos utilizados e estimado o teor de catequina, epicatequina e rutina nos extratos. Observou-se que os três procedimentos de extração apresentaram uma apreciável recuperação de catequina (97,4; 91,9 e 94,3 %, respectivamente), de epicatequina (96,8; 98,1; e 86,3 %, respectivamente) e de rutina (100,1; 76,8; e 100,0 %, respectivamente) para o nível de concentração de trabalho (Tabelas 27, 28 e 29). Observou-se que o teor estimado de catequina (0,10; 0,62 e 0,27 %, respectivamente), de epicatequina (0,18; 0,47 e 0,53 %, respectivamente) e de rutina (0,28; 0,35 e 0,34, respectivamente) foram resultados da eficiência da extração. Apesar do procedimento por decocção diferenciada não ter apresentado maior eficiência para catequina, em comparação a extração em soxhlet, os fatos de ser necessário o uso de metade de material vegetal (1 g) e de ser requerido um tempo relativamente curto para a extração dos analitos (60 min), fez com que o procedimento tivesse sido o melhor, também para a extração de catequina, epicatequina e rutina. O perfil gerado também foi adequado, pois apresentou cinco sinais resolvidos de boa intensidade com espectros de absorção molecular na região UV-VIS bem definidos por possuírem vários pontos de máximos e mínimos.

**Figura 60:** Comparação dos perfis cromatográficos antes e após a adição de catequina, epicatequina e rutina na espinheira-santa (MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (DAD). Solvente água, preparação por infusão (Inf), extração em soxhlet (Ext) e decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50<sup>o</sup> C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60  $\mu$ L, detecção a 269 nm



**Tabela 27:** Determinação da recuperação e do teor (estimado) de catequina nas preparações do estudo da espinheira (MIJB)

<b>Cromatograma</b>	<b>Conc. (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>) (1)</b>	<b>Área Antes (2)</b>	<b>Área após adição (3)</b>	<b>Aumento da área (4)</b>	<b>Recuperação (%) (5)</b>	<b>Teor (%) (6)</b>
<b>catequina MI 42</b>	0,18914	7056806	-	-	-	100
<b>Adição de 45 <math>\mu\text{L}</math> no MIJB Inf</b>	255,60	-	-	9536224	-	-
<b>Adição de 45 <math>\mu\text{L}</math> no MIJB Ext</b>	255,60	-	-	9536224	-	-
<b>Adição de 45 <math>\mu\text{L}</math> no MIJB Dec 60C</b>	255,60	-	-	9536224	-	-
<b>MIJB Inf</b>	22,471	804031	10093139	9289108	97,4	0,10
<b>MIJB Ext</b>	11,145	2586116	11346727	8760611	91,9	0,62
<b>MIJB Dec 60C</b>	10,272	1039167	10035052	8995885	94,3	0,27

**Legenda:** (1) = concentração; (4) = (3)-(2); (5) = (((4) no extrato/(4) na adição) x 100);  
 (6) = (((2) no extrato/(2) na catequina) x ((1) na catequina/(1) no extrato) x 100));  
 $9536224 = (((45 \times 5,68) \times 7056806 / 0,18914) / 1000)$

**Tabela 28:** Determinação da recuperação e do teor (estimado) de epicatequina nas preparações do estudo da espinheira (MIJB)

<b>Cromatograma</b>	<b>Conc. (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>) (1)</b>	<b>Área Antes (2)</b>	<b>Área após adição (3)</b>	<b>Aumento da área (4)</b>	<b>Recuperação (%) (5)</b>	<b>Teor (%) (6)</b>
<b>epicatequina MI 42</b>	0,10950	4395659	-	-	-	100
<b>Adição de 45 <math>\mu\text{L}</math> no MIJB Inf</b>	87,60	-	-	3516527	-	-
<b>Adição de 45 <math>\mu\text{L}</math> no MIJB Ext</b>	87,60	-	-	3516527	-	-
<b>Adição de 45 <math>\mu\text{L}</math> no MIJB Dec 60C</b>	87,60	-	-	3516527	-	-
<b>MIJB Inf</b>	22,471	1606633	5012054	3405421	96,8	0,18
<b>MIJB Ext</b>	11,145	2109944	5560750	3450806	98,1	0,47
<b>MIJB Dec 60C</b>	10,272	2192853	5228713	3035860	86,3	0,53

**Legenda:** (1) = concentração; (4) = (3)-(2); (5) = (((4) no extrato/(4) na adição) x 100);  
 (6) = (((2) no extrato/(2) na epicatequina) x ((1) na epicatequina/(1) no extrato) x 100));  
 $3516527 = (((40 \times 2,19) \times 4395659 / 0,10950) / 1000)$

**Tabela 29:** Determinação da recuperação e do teor de rutina nas preparações do estudo da espinheira (MIJB)

<b>Cromatograma</b>	<b>Conc. (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>) (1)</b>	<b>Área Antes (2)</b>	<b>Área após adição (3)</b>	<b>Aumento da área (4)</b>	<b>Recuperação (%) (5)</b>	<b>Teor (%) (6)</b>
<b><i>rutina USP</i></b>	0,10100	10550378	-	-	-	100
<b><i>Adição de 20 <math>\mu\text{L}</math> no MIJB Inf</i></b>	40,40	-	-	4220151	-	-
<b><i>Adição de 20 <math>\mu\text{L}</math> no MIJB Ext</i></b>	40,40	-	-	4220151	-	-
<b><i>Adição de 20 <math>\mu\text{L}</math> no MIJB Dec 60C</i></b>	40,40	-	-	4220151	-	-
<b><i>MIJB Inf</i></b>	22,471	6641764	10865670	4223906	100,1	0,28
<b><i>MIJB Ext</i></b>	11,145	4046653	7289535	3242882	76,8	0,35
<b><i>MIJB Dec 60C</i></b>	10,272	3634534	7856161	4221627	100,0	0,34

**Legenda:** (1) = concentração; (4) = (3)-(2); (5) = (((4) no extrato/(4) na adição) x 100);  
 (6) = (((2) no extrato/(2) na rutina) x ((1) na rutina/(1) no extrato) x 100);  
 $4220151 = (((00 \times 2,02) \times 10550378 / 0,10100)) / 1000$

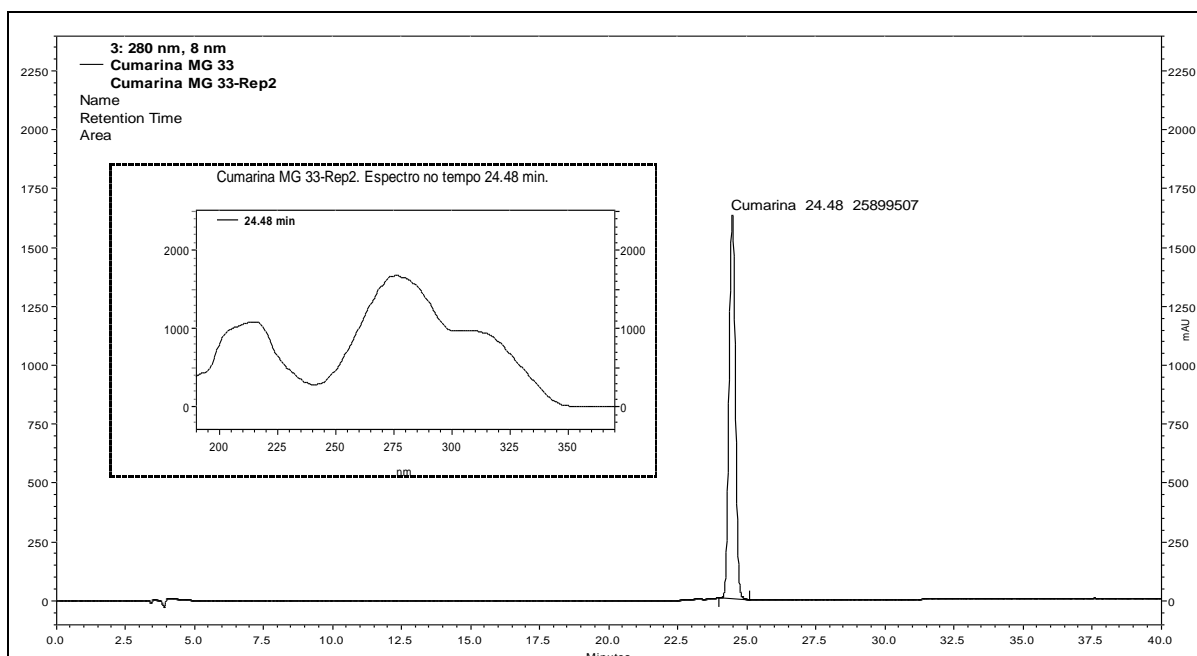
As mesmas soluções das plantas guaco (MGJB) e aroeira (STJB) utilizadas no sistema cromatográfico do método 1 (marcadores, extratos por decocção diferenciada e extratos por decocção diferenciada adicionados de marcadores), foram injetados no sistema cromatográfico utilizando o método 2.

#### 4.2.2.2 Resultados dos extratos da planta guaco (MGJB) em água (decocção diferenciada)

##### I) Marcador do guaco (cumarina)

O cromatograma (Cumarina - MG 33) da solução contendo o marcador cumarina e o espectro de absorção molecular na região do UV/VIS, no tempo de retenção referente a cumarina, foi registrado (Figura 61).

**Figura 61:** Cromatograma da cumarina (MG 33), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i.); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



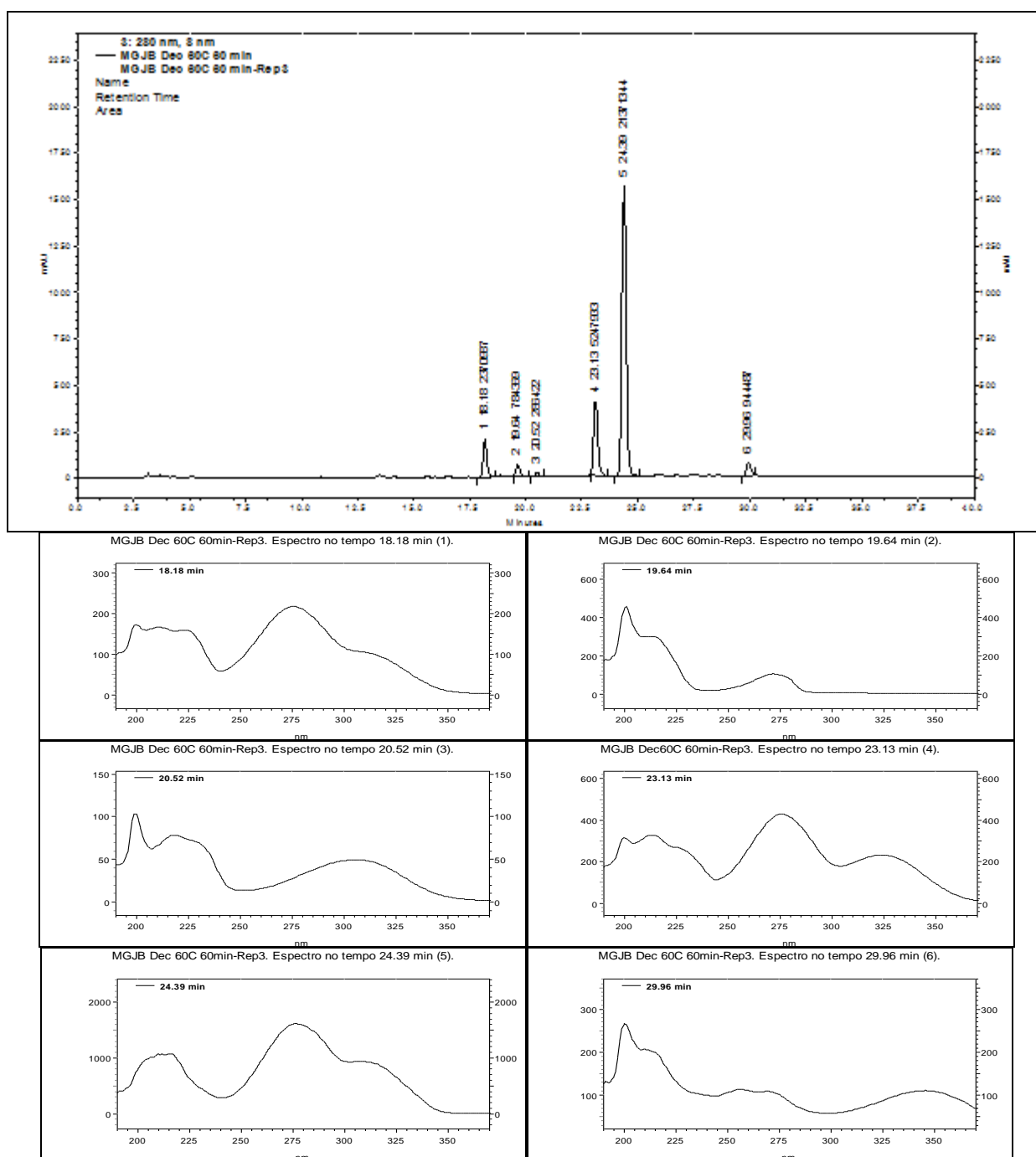
## II) Extrato por decocção diferenciada

O perfil do cromatograma (MGJB Dec 60C 60 min) da solução obtida por decocção diferenciada da planta guaco e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS, nos tempos de retenção referentes a seis sinais foram registrados (Figura 62). Observou-se similaridade entre os espectros obtidos no cromatograma da cumarina (em 24,48 min) e o espectro do sinal 4 (em 24,39 min) do perfil cromatográfico da solução obtida por decocção diferenciada.

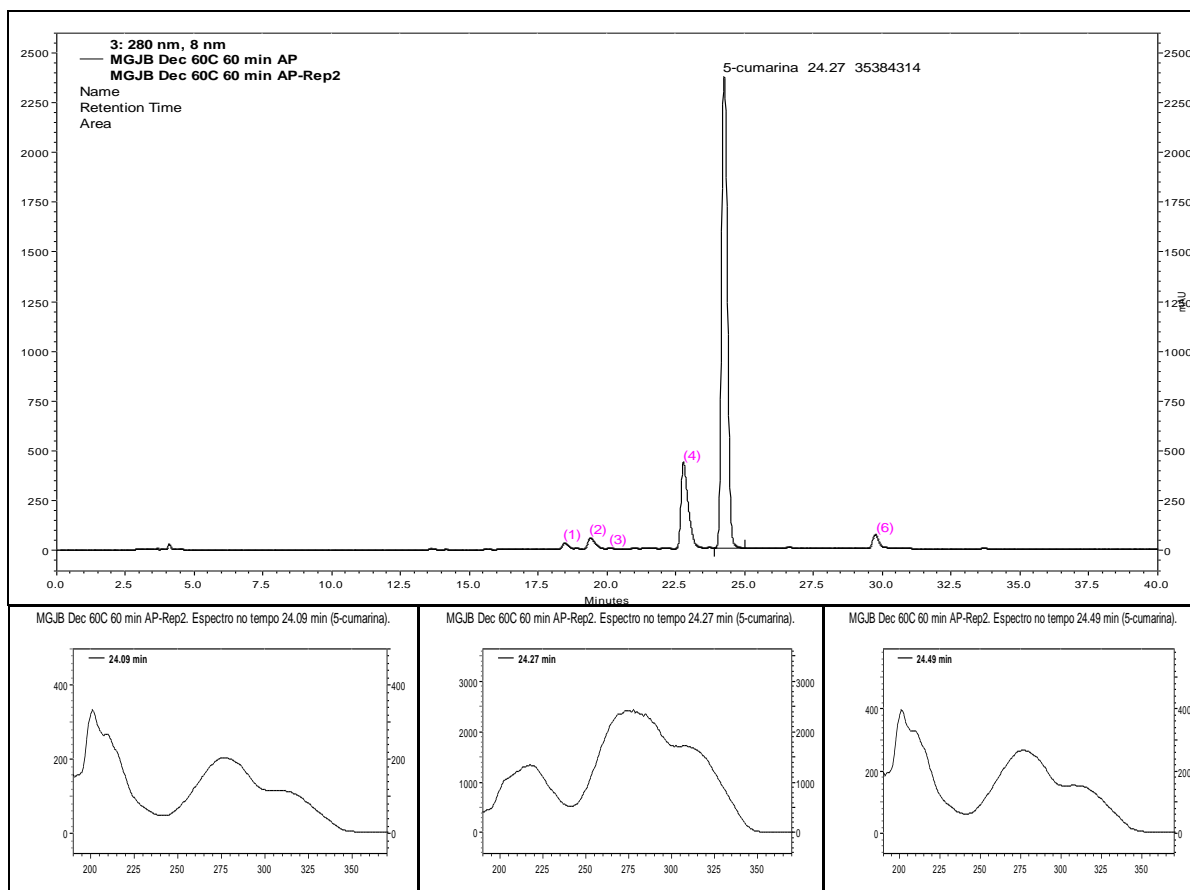
O perfil do cromatograma (MGJB Dec 60C 60min AP) da solução obtida por decocção diferenciada da planta guaco, adicionado de cumarina e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS, em três tempos de retenção (início, meio e final), referentes ao sinal da cumarina foram registrados (Figura 63). Observou-se um aumento do sinal e similaridade entre os espectros obtidos no cromatograma da

cumarina (em 24,09 min; 24,27 min e 24,49 min), evidenciando a identificação e a pureza do sinal referente a cumarina.

**Figura 62:** Perfil cromatográfico do guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



**Figura 63:** Perfil cromatográfico após a adição de cumarina no guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



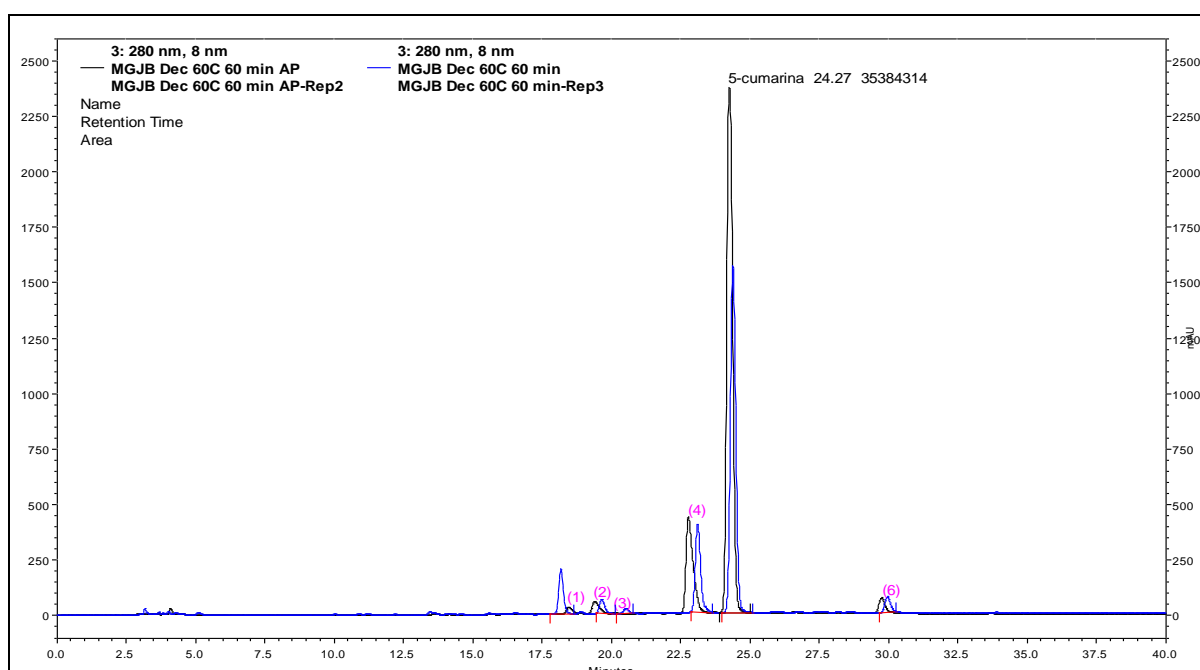
### III) Determinação da recuperação e a estimativa do teor de cumarina

Os perfil obtido pelo procedimento de extração por decocção diferenciada foi sobreposto ao perfil adicionado de marcador cumarina (Figura 64). Foi determinada a recuperação de cumarina no procedimento utilizado e estimado o teor de cumarina no extrato. Observou-se que o procedimento de extração neste método (2), não apresentou boa recuperação (71 %) em relação ao método 1 (103,4 %) para o nível de concentração de trabalho. Porém, notou-se que o sinal (área) da cumarina após a adição deveria ser maior (o sinal saturou o detector). Portanto, este método (2),



apresentou como vantagem uma maior sensibilidade (Tabela 30). Observou-se que o teor estimado foi de 0,63 % (Tabela 30) e que não diferiu, significativamente, do teor estimado encontrado quando foi utilizado o método 1 (0,67 %). O perfil gerado foi mais adequado que no método 1 pois apresentou seis sinais (dois a mais do que o método 1) resolvidos de boa intensidade, com espectros de varredura de absorção molecular na região UV/VIS bem definidos por possuírem vários pontos de máximos e mínimos.

**Figura 64:** Comparação dos perfis cromatográficos antes e após a adição de cumarina, no guaco (MGJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm). Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



**Tabela 30:** Determinação da recuperação e do teor (estimado) de cumarina na preparação por Decocção diferenciada do guaco (MGJB) utilizando o método 2

<b>Cromatograma</b>	<b>Conc. (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>) (1)</b>	<b>Área antes (2)</b>	<b>Área após adição (3)</b>	<b>Aumento da área (4)</b>	<b>Recuperação (%) (5)</b>	<b>Teor (%) (6)</b>
<b>Cumarina MG 33</b>	0,07804	25899507	-	-	-	-
<b>Adição de 5,5 <math>\mu\text{L}</math></b>	58,96	-	-	19567336	-	-
<b>MGJB Dec 60C</b>	10,205	21371344	35384314	14012970	71,6	0,63

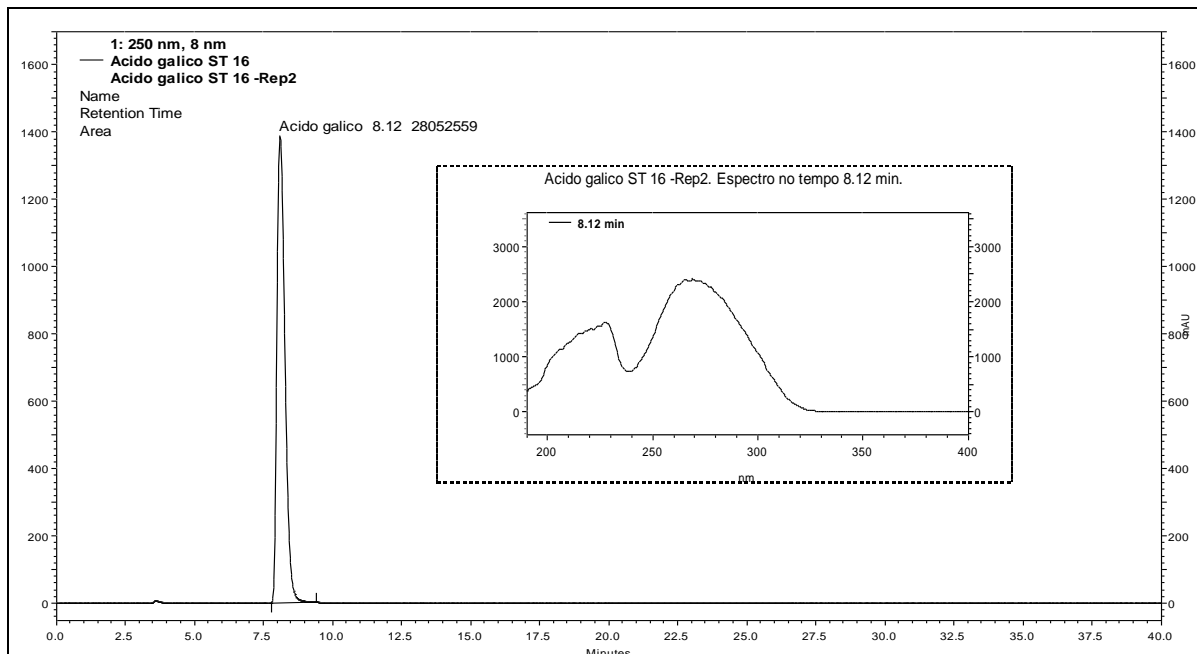
**Legenda:** (1) = concentração; (4) = (3)-(2); (5) = (((4) no extrato/(4) na adição) x 100);  
 (6) = (((2) no extrato/(2) na cumarina) x ((1) na cumarina/(1) no extrato) x 100);  
 19567336 (esperada) = (((5,5x10,72)x25899507)/0,0780416))/1000;

#### 4.2.2.3 Resultados dos extratos da planta aroeira-da-praia (STJB) em água (decocção diferenciada)

##### I) Marcadores da aroeira-da-praia (ácido gálico e isoquercitrina)

O cromatograma (Ácido gálico - ST 16) da solução contendo o marcador ácido gálico e o espectro de absorção molecular na região do UV/VIS, no tempo de retenção referente ao ácido gálico, foi registrado (Figura 65). A solução contendo o marcador isoquercitrina foi injetada, mas não eluiu neste sistema cromatográfico (método 2).

**Figura 65:** Cromatograma do ácido gálico (ST 16), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL

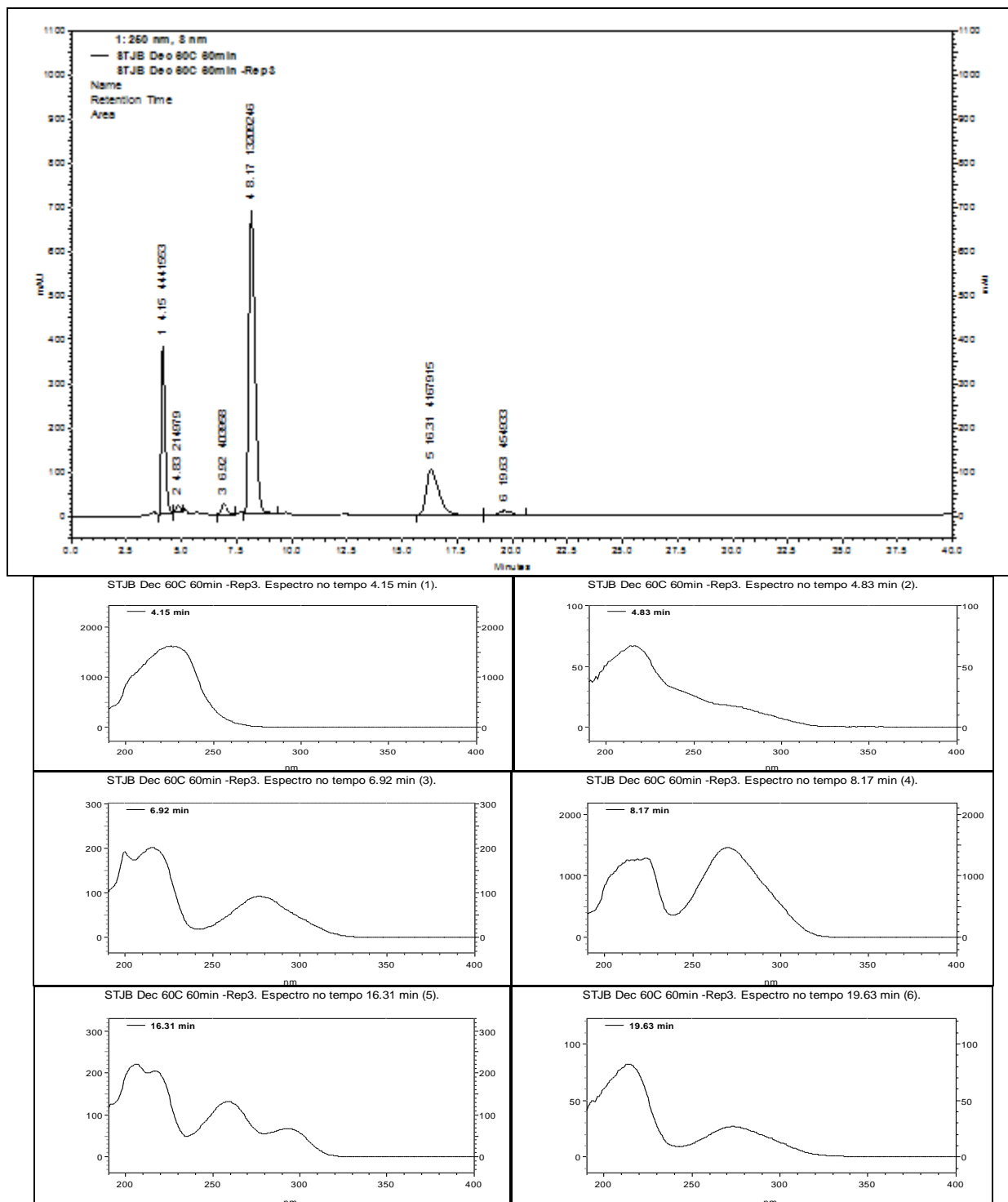


## II) Extrato por decocção diferenciada

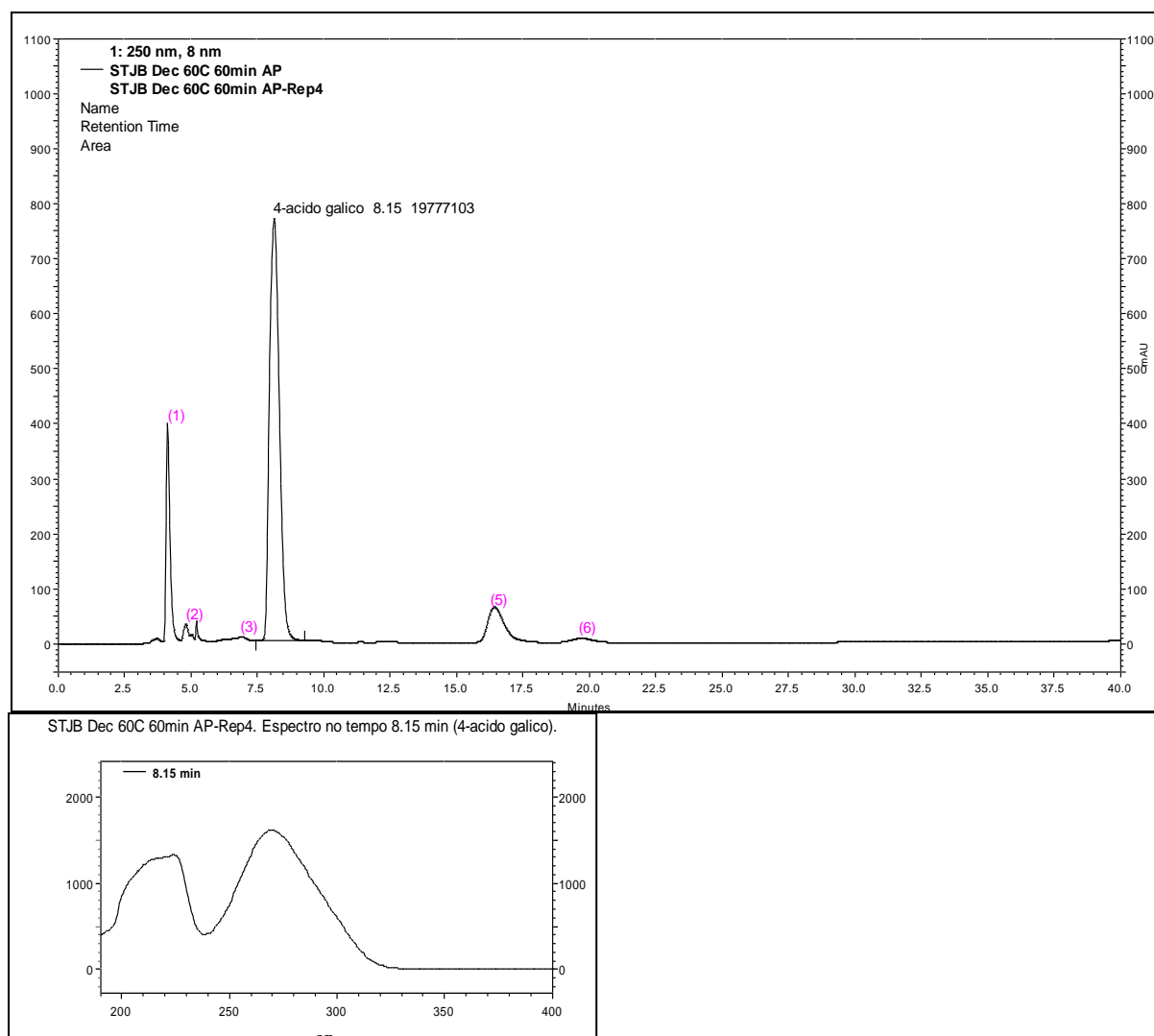
O perfil do cromatograma (STJB Dec 60C 60 min) da solução obtida por decocção diferenciada da planta aroeira e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS, nos tempos de retenção referentes a seis sinais, foram registrados (Figura 66). Observou-se similaridade entre os espectros obtidos através do cromatograma de ácido gálico (Figura 65, em 8,12 min) e o espectro do sinal 4 (em 8,17 min) do perfil cromatografico da solução obtida por decocção diferenciada.

O perfil do cromatograma (STJB Dec 60C 60 min AP) da solução obtida por decocção diferenciada da planta aroeira, adicionado de ácido gálico e os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS, em três tempos de retenção (início, meio e final), referente ao sinal de ácido gálico, foi registrado (Figura 67). Observou-se um aumento do sinal em 8,15 min, evidenciando a identificação e a pureza do sinal referente ao ácido gálico.

**Figura 66:** Perfil cromatográfico da aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i.); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



**Figura 67:** Perfil cromatográfico após a adição de ácido gálico na aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm) e análise da pureza do sinal através dos espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50<sup>o</sup> C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60  $\mu$ L

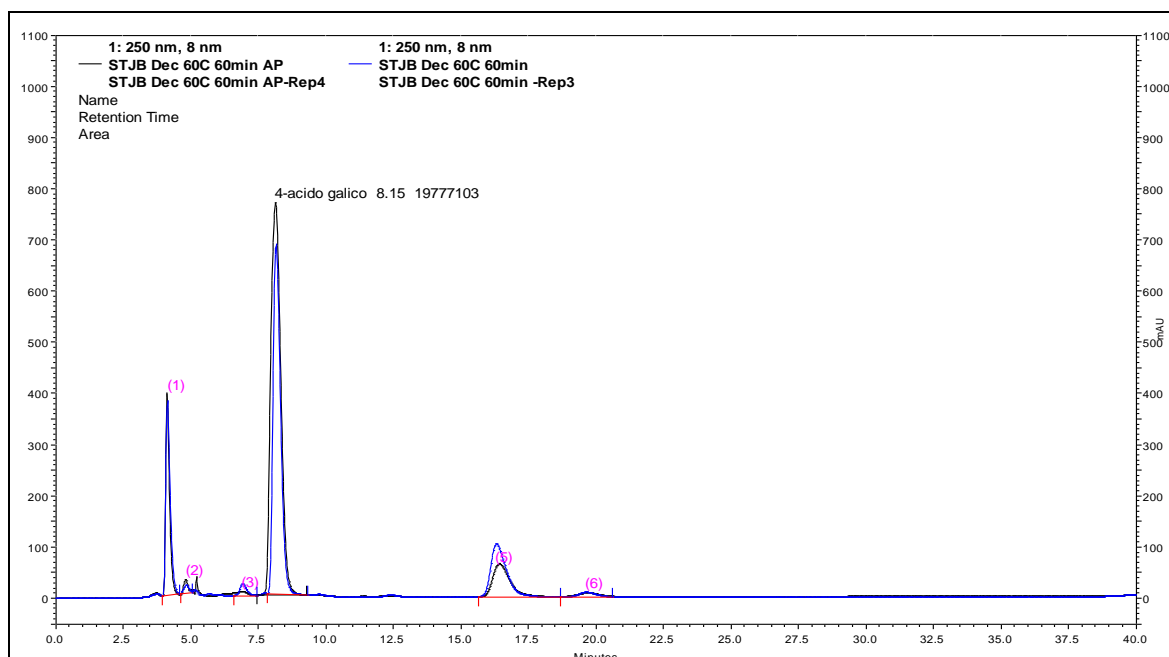


### III) Determinação da recuperação e a estimativa do teor de ácido gálico

Os perfil obtido por meio do procedimento de extração foi sobreposto ao perfil adicionado de marcador ácido gálico (Figura 68). Foi determinada a recuperação de ácido gálico e estimado o teor de ácido gálico no extrato. Observou-se uma recuperação significativa (87,8 %), apesar de diferir em relação ao método 1 (99,8

%) para o nível de concentração de trabalho (Tabela 31). Observou-se que o teor estimado foi de 0,72 (Tabela 31) e que não diferiu significativamente do teor estimado encontrado quando foi utilizado o método 1 (0,70 %). O perfil gerado foi mais adequado que no método 1, pois apresentou seis sinais (três a mais do que o método 1) resolvidos de boa intensidade e com espectros de absorção molecular na região UV/VIS bem definidos, por possuírem vários pontos de máximos e mínimos.

**Figura 68:** Comparação dos perfis cromatográficos antes e após a adição de ácido gálico na aroeira-da-praia (STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm). Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



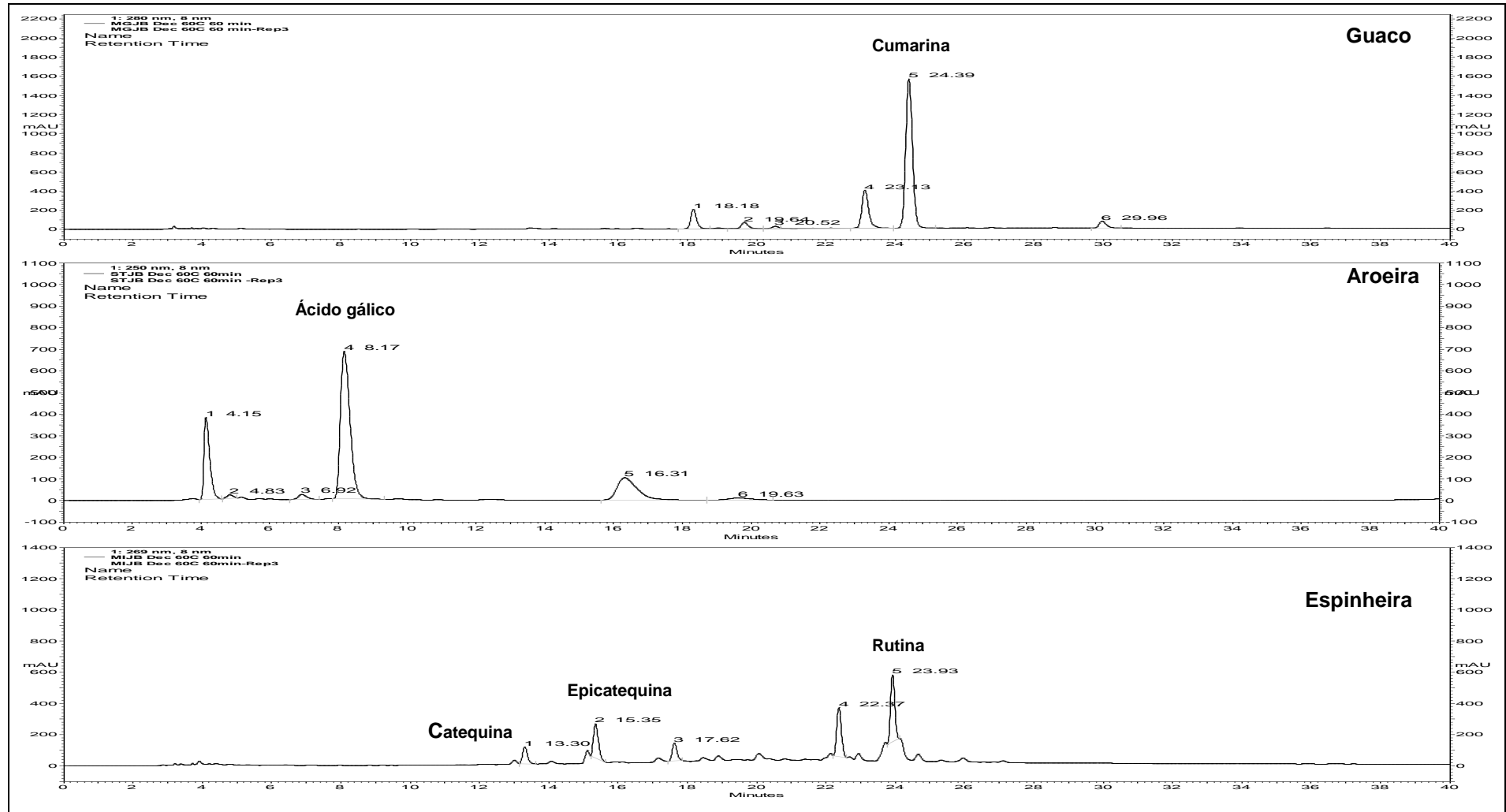
**Tabela 31:** Determinação da recuperação e do teor (estimado) de ácido gálico na preparação por decocção diferenciada da aroeira (STJB) utilizando o método 2

<b>Cromatograma</b>	<b>Conc. (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>) (1)</b>	<b>Área antes (2)</b>	<b>Área após adição (3)</b>	<b>Aumento da área (4)</b>	<b>Recuperação (%) (5)</b>	<b>Teor (%) (6)</b>
<b>Ácido gálico ST16</b>	0,15705	28052559	-	-	-	-
<b>Adição de 4 <math>\mu\text{L}</math></b>	41,88	-	-	7480682	-	-
<b>STJB Dec 60C</b>	10,22	13209246	19777103	6567857	87,8	0,72

**Legenda:** (1) = concentração; (4) = (3)-(2); (5) = (((4) no extrato/(4) na adição) x 100);  
 (6) = (((2) no extrato/(2) no ácido gálico) x ((1) no ácido gálico/(1) no extrato) x 100);  
 7480682 = (((4x10,47)x28052559/0,15705))/1000

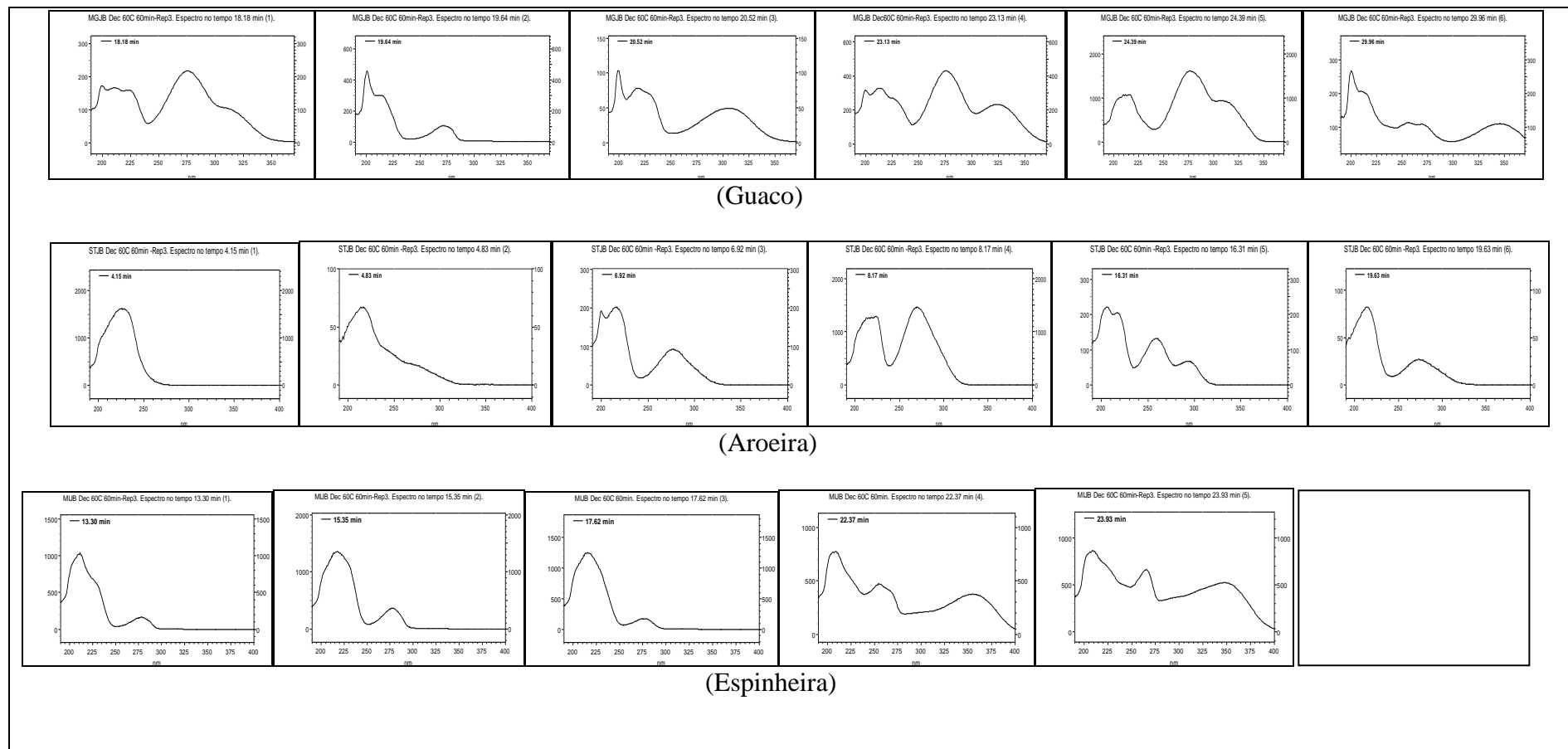
A figura 69 mostra os perfis cromatográficos e a figura 70 os perfis dos espectros de absorção molecular na região do UV/VIS no tempo de retenção referentes aos sinais do perfil cromatográfico, das três plantas extraídas por decocção diferenciada. O método 2 gerou perfis com maior poder de identificação do que os perfis gerados pelo método 1 (Figura 49). Este fato é explicado pelo maior número de sinais que foram monitorados e por apresentar maior sensibilidade. O aumento da sensibilidade foi verificada quando foram utilizadas as mesmas soluções de marcadores nos dois sistemas (método 1 e 2).

**Figura 69:** Perfil cromatográfico do guaco, da aroeira-da-praia e da epinheira-santa, cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280, 250 e 269 nm respectivamente). Solvente água, preparação por decoção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL





**Figura 70:** Perfil do espectro de varredura de absorção molecular no UV-Vis no tempo de retenção dos sinais do perfil cromatografico do guaco, da aroeira-da-praia e da epinheira-santa, cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280, 250 e 269 nm respectivamente). Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



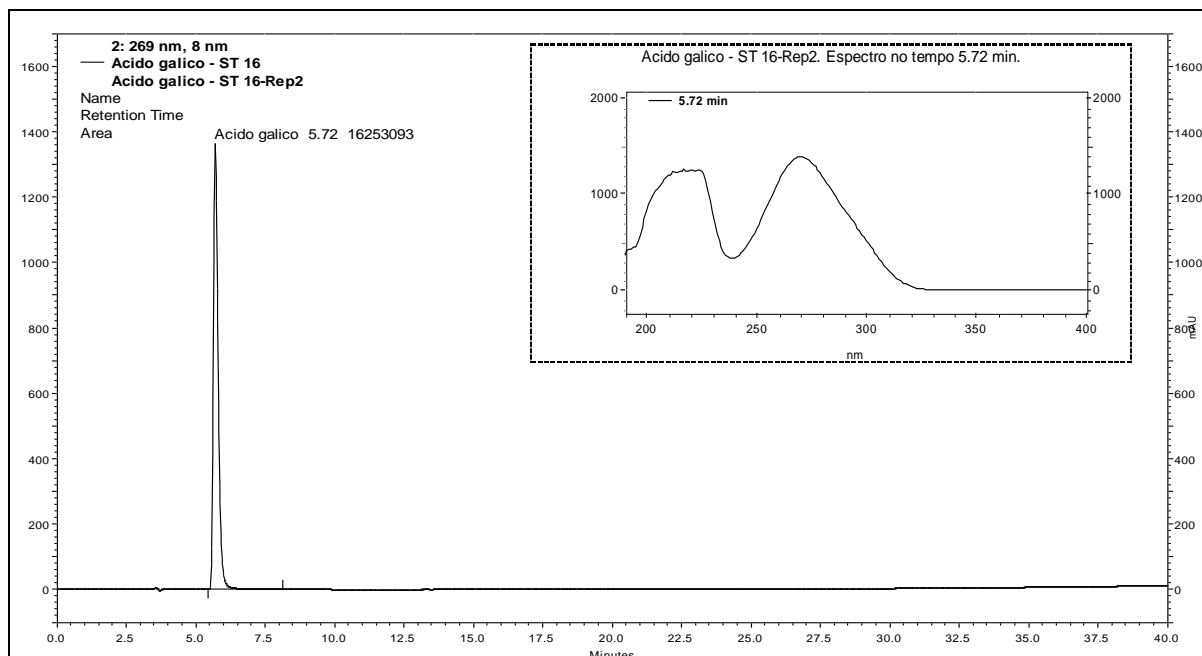
4.2.3 Perfis cromatográficos obtidos por Cromatografia Líquida com detector UV/Vis (DAD) de uma mistura de padrões (“MIX Pad”) contendo ácido gálico, catequina, epicatequina e cumarina utilizando o método 2

4.2.3.1 *Cromatogramas individuais dos padrões de ácido gálico, catequina, epicatequina, cumarina e rutina*

I) Marcador ácido gálico

O cromatograma (Ácido gálico - ST 16) da solução contendo o marcador ácido gálico e o espectro de absorção molecular na região do UV/VIS, no tempo de retenção referente ao ácido gálico, foi registrado (Figura 71).

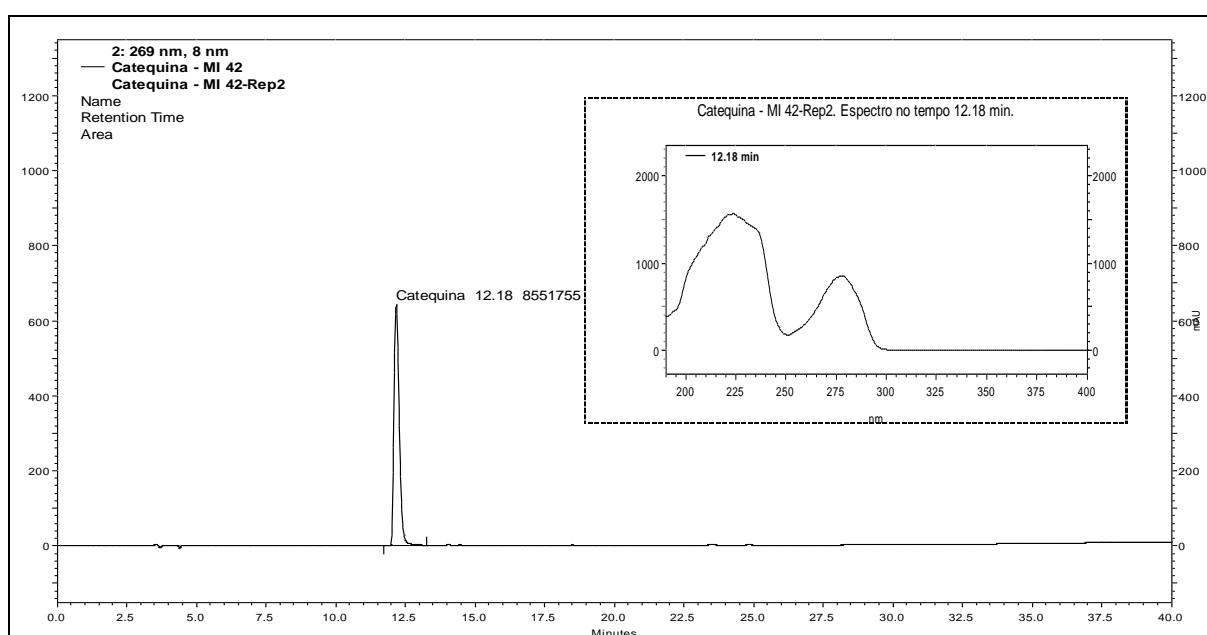
**Figura 71:** Cromatograma do ácido gálico (ST 16), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i.); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL; concentração de 0,05235 mg/mL



## II) Marcador catequina

O cromatograma (Catequina - MI 42) da solução contendo o marcador catequina e o espectro de absorção molecular na região do UV/VIS, no tempo de retenção referente a catequina, foi registrado (Figura 72).

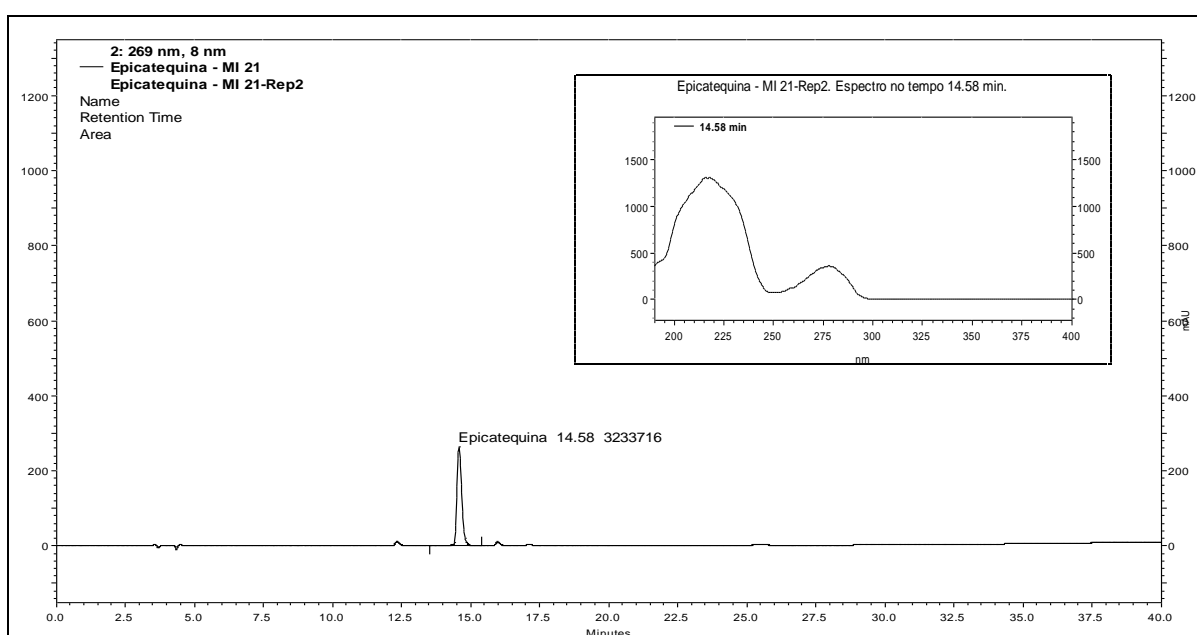
**Figura 72:** Cromatograma da catequina (MI 42), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i.); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60  $\mu$ L; concentração de 0,15940 mg/mL



### III) Marcador epicatequina

O cromatograma (Epicatequina - MI 21) da solução contendo o marcador epicatequina e o espectro de absorção molecular na região do UV/VIS, no tempo de retenção referente a epicatequina, foi registrado (Figura 73).

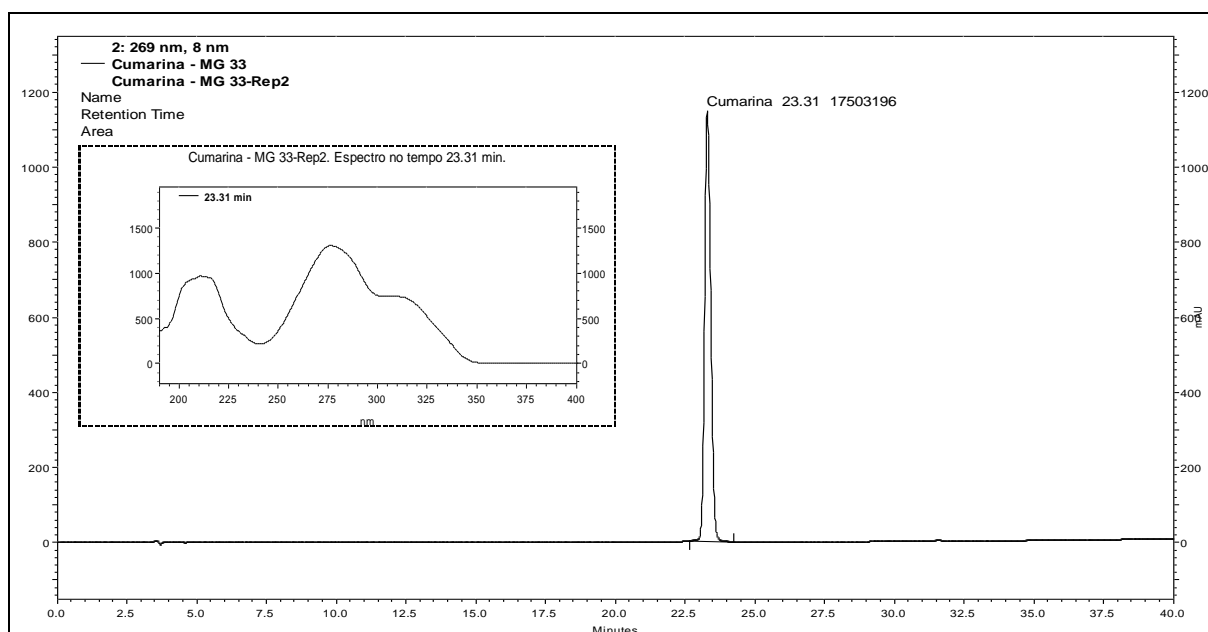
**Figura 73:** Cromatograma da epicatequina (MI 21), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChrosorb RP-select B (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i.); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60  $\mu$ L; concentração de 0,09855 mg/mL



## IV) Marcador cumarina

O cromatograma (Cumarina - MG 33) da solução contendo o marcador cumarina e o espectro de absorção molecular na região do UV/VIS, no tempo de retenção referente a cumarina, foi registrado (Figura 74).

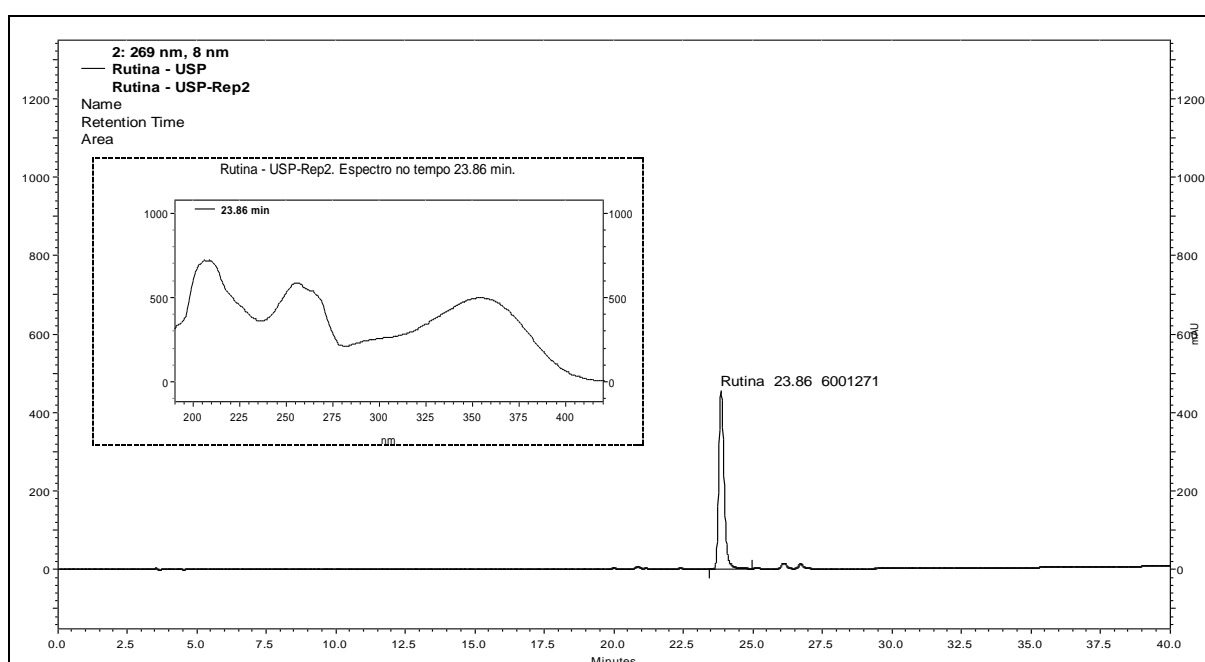
**Figura 74:** Cromatograma da cumarina (MG 33), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i.); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL; concentração de 0,04288 mg/mL



## V) Marcador rutina

O cromatograma (rutina - USP) da solução contendo o marcador rutina e o espectro de absorção molecular na região do UV/VIS, no tempo de retenção referente a rutina, foi registrado (Figura 75).

**Figura 75:** Cromatograma da rutina (USP), cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e o espectro de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) no tempo de retenção destacado no cromatograma. Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50<sup>o</sup> C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60  $\mu$ L; concentração de 0,10100 mg/mL

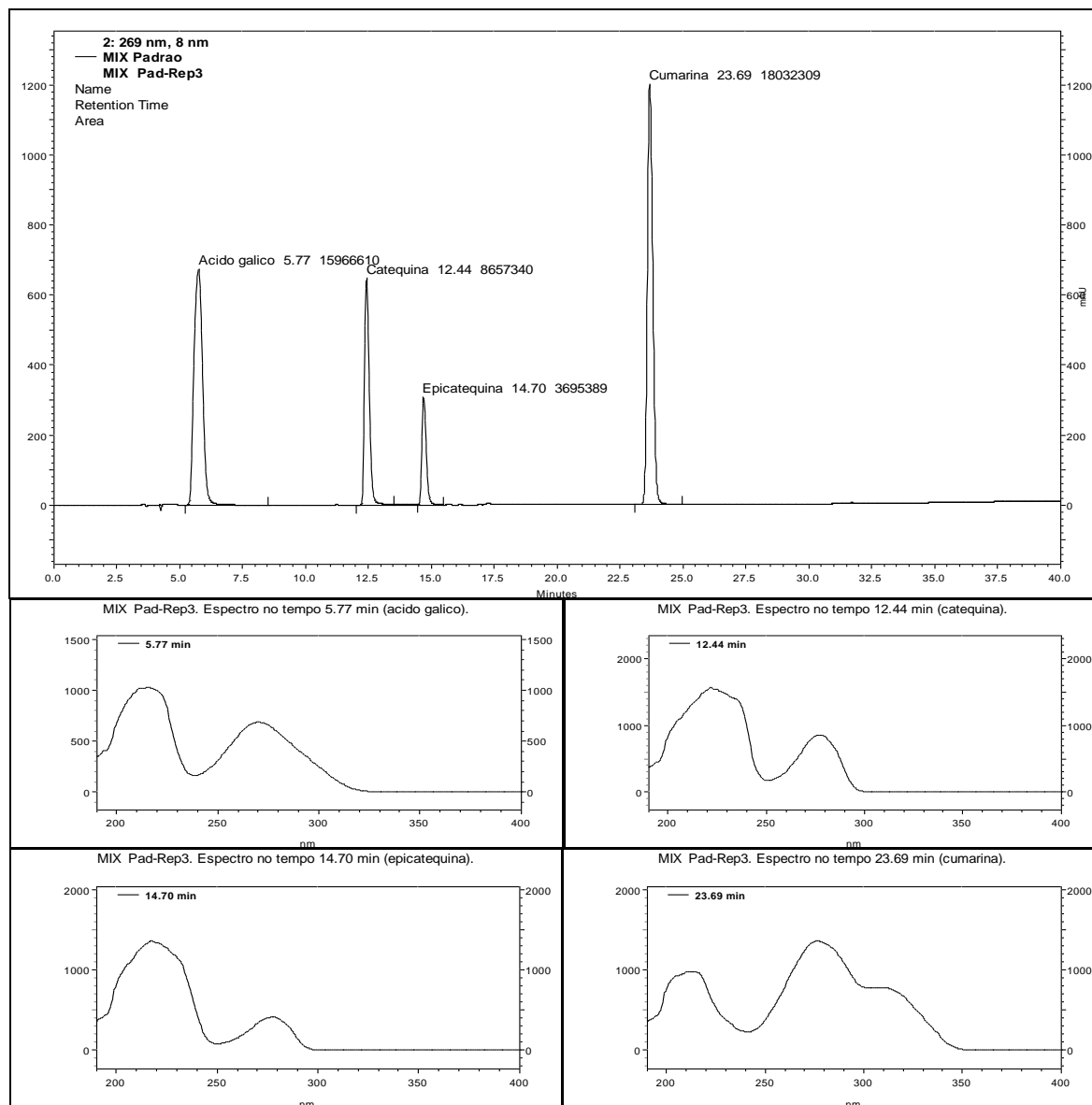


#### 4.2.3.2 Cromatograma da mistura de marcadores (MIX pad) de ácido gálico, catequina, epicatequina e cumarina

O perfil do cromatograma (MIX pad) da solução de mistura de marcadores e o espectro de absorção molecular na região do UV/VIS, no tempo de retenção referente a cada marcador, foi registrado (Figura 76). Esta mistura de marcadores foi formada por pelo menos um marcador de cada planta.

A rutina não foi inserida na mistura de marcadores devido ao fato de possuir o tempo de retenção muito próximo ao da cumarina com coeluição, por este sistema (23,86 min e 23,31 min, respectivamente). A escolha preferencial pela cumarina na mistura de marcadores foi devido ao fato de ser um único marcador do guaco neste estudo.

**Figura 76:** Perfil cromatográfico da mistura de padrões (MIX Pad), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água e acetonitrila (10 % v/v). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL; concentração: 0,05235 mg/mL de ácido gálico; 0,15940 mg/mL de catequina; 0,09855 mg/mL de epicatequina e 0,04288 mg/mL de cumarina





#### 4.2.3.3 *Cromatogramas da curva analítica da mistura de padrões (MIX pad) de ácido gálico, catequina, epicatequina e cumarina utilizando o método 2*

Os perfis dos cromatogramas (MIX pad) dos dez volumes diferentes (LD 1 ao nível 8) da mistura de marcadores foram registrados e sobrepostos (Figura 77). A curva analítica de cada marcador foi estimada considerando o nível 2 ao nível 8 (sete níveis).

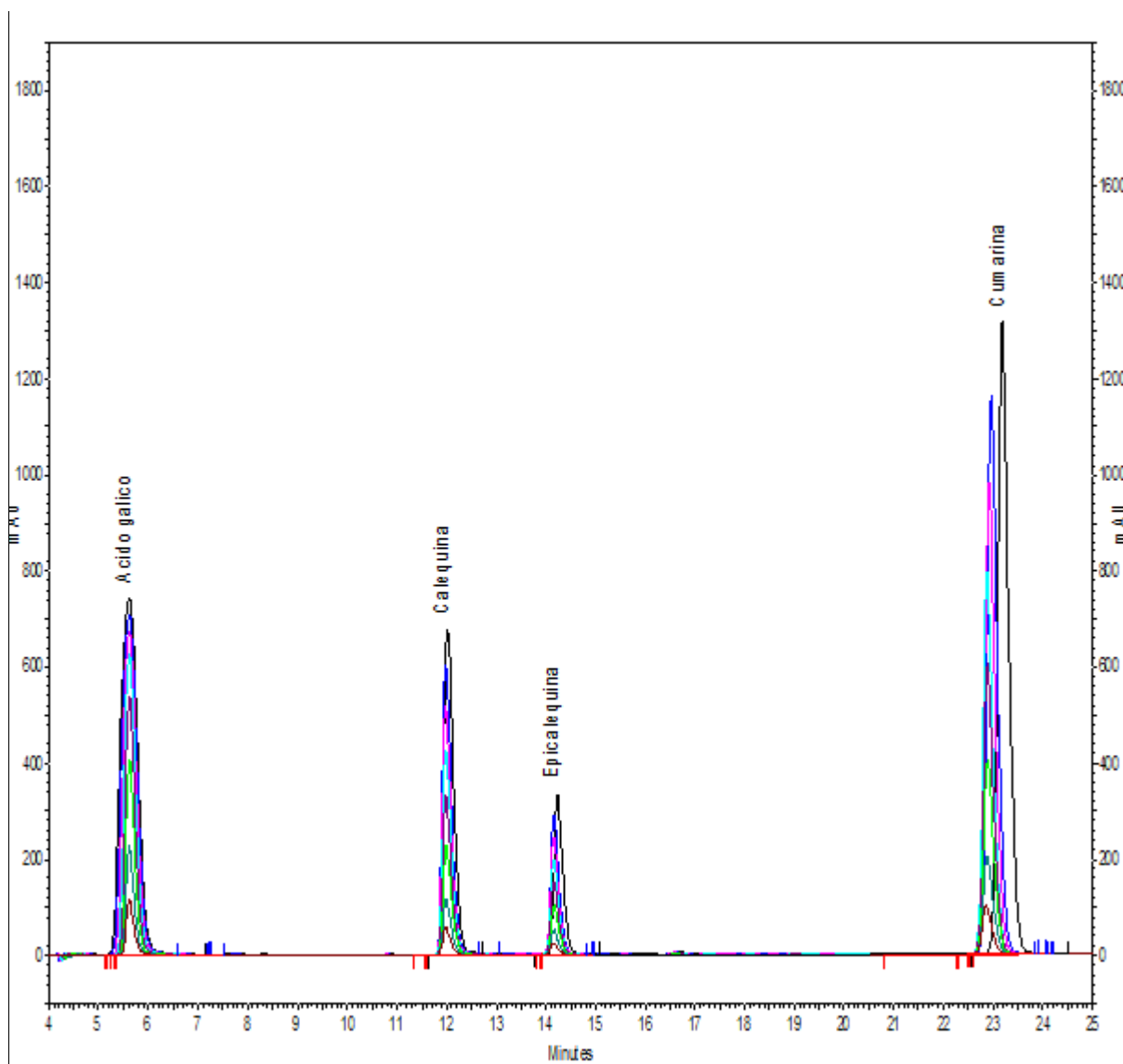
Este estudo foi realizado com finalidade de avaliar inicialmente a faixa linear de trabalho, que deverá nortear a validação completa deste procedimento em relação a linearidade.

Observou-se pelos resultados obtidos que as curva analíticas (estimadas) não foram satisfatórias para os marcadores ácido gálico (Tabela 32) e catequina (Tabela 33). Os testes de desvio da linearidade e de autocorrelação dos resíduos não foram satisfatórios, portanto, antes da validação completa deverá ser procurada outra faixa, mais acima ou mais abaixo da anterior.

Observou-se também pelos resultados obtidos que as curvas analíticas (estimadas) foram satisfatórias para os marcadores epicatequina (Tabela 34) e cumarina (Tabela 35), portanto, esta faixa será utilizada na validação completa para o quesito linearidade do método.

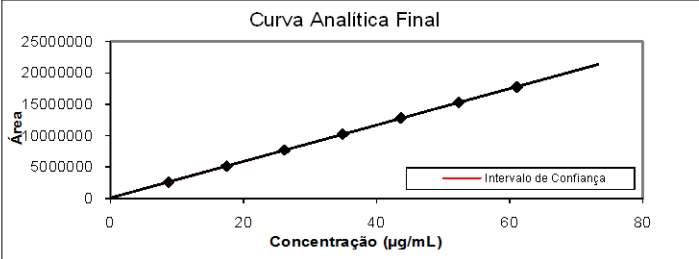
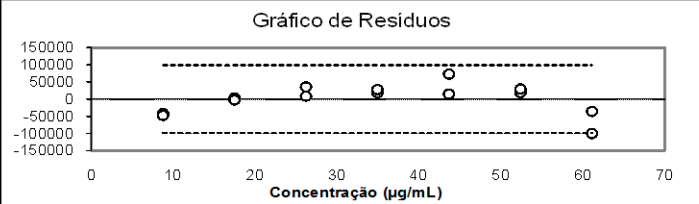
Todas as curvas deverão ser repetidas, com replicatas independentes (concentrações independentes) e todas as premissas (testes) deverão ser satisfatórios (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; INMETRO, 2010).

**Figura 77:** Perfil cromatográfico da curva analítica da mistura de padrões (MIX pad) de ácido gálico, catequina, epicatequina e cumarina, cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm). Solvente água e acetonitrila (10 % v/v). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i.); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



## I) Curva analítica do marcador ácido gálico

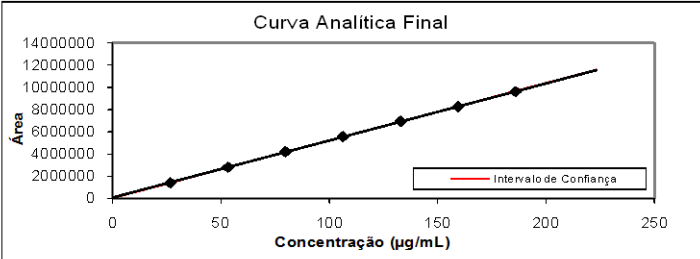
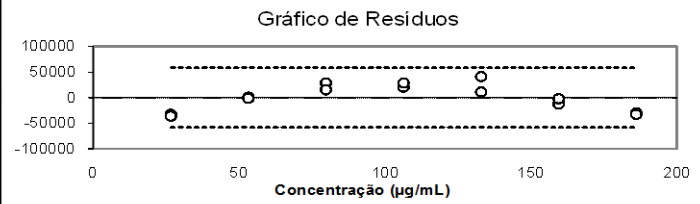
Tabela 32: Curva analítica (estimada) do ácido gálico (nível 2 ao nível 8)

Ministério da Saúde		FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		INCQS	
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde					
<b>AValiação de Linearidade de Curva Analítica</b>					
<b>Dados da Curva Analítica</b>					
Análise:	Curva analítica do ácido gálico no MIX-PAD				
Data de Confeção da Curva:	20/03/2014	Curva N°:	1		
Replicatas por Nível (k):	2	N° de Níveis (n):	7		
Equipamento:	Shimadzu 3	Responsável:	José Luiz		
<b>Tabela de dados originais</b>					
Nível (k)	i	Conc. µg/mL	Resposta Área	<b>Avaliação de Valores Extremos</b> <b>(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)</b> Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.	
1	01	8,725	2600747		
	02	8,725	2595303		
2	03	17,450	5175913		
	04	17,450	5169976		
3	05	26,175	7737822		
	06	26,175	7711260		
4	07	34,900	10251339		
	08	34,900	10260236		
5	09	43,625	12835448		
	10	43,625	12777449		
6	11	52,350	15311635		
	12	52,350	15322169		
7	13	61,075	17787078		
	14	61,075	17722937		
					
					
<b>Normalidade dos Resíduos</b> (Teste de Ryan-Joiner)					
Req	0,96				
Rcrit ( $\alpha = 0,05$ )	0,94				
<b>Autocorrelação dos Resíduos</b> (Teste de Durbin-Watson)					
d (calculado)	0,77				
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,05				
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,35				
<b>Homogeneidade da Variância dos Resíduos</b> (Teste de Brown-Forsythe)					
Variância Combinada	2,20E+09				
$t_i$ calculado	-7,11E-01				
$t_{tabela}$ ( $\alpha = 0,05$ )	2,18E+00				
p	4,91E-01				
<b>Resumo da Avaliação</b>					
Homogeneidade de variância					
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$				
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade					
A regressão é significativa	$p < 0,001$				
Há desvio de linearidade	$p < 0,05$				
Autocorrelação dos Resíduos ( $\alpha = 0,05$ )					
Há autocorrelação	$d < dL$				
Teste de Normalidade ( $\alpha = 0,05$ )					
Segue a Normal	$Req > Rcrit$				
<b>Estadísticas da Regressão Linear (Modelo: <math>Y = a + bX</math>)</b>					
Coefficiente Angular (b):	2,90E+05	Coefficiente Linear (a):	1,13E+05		
r	1,0000	R <sup>2</sup>	0,9999		
N	14	Graus de Liberdade	12		
<b>Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)</b>					
Limite de Detecção	3,95E-01	Limite de Quantificação	1,18E+00		
<b>ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)</b>					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,58E+14	3,58E+14	1,76E+05	2,24E-26
resíduos	12	2,44E+10	2,03E+09		
Ajuste	5	2,02E+10	4,04E+09	6,69E+00	1,35E-02
erro puro	7	4,22E+09	6,03E+08		
total	13	3,58E+14			
<b>Observações</b>					
Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___					
AValiação de Linearidade de Curva Analítica				Pág.: 1/1	

Fonte da planilha: (BAZILIO *et al*, 2012)

## II) Curva analítica do marcador catequina

Tabela 33: Curva analítica (estimada) da catequina (nível 2 ao nível 8)

Ministério da Saúde <b>FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ</b> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde		INCQS			
AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA					
<b>Dados da Curva Analítica</b>					
Análise:	Curva analítica da catequina no MIX-PAD				
Data de Confeção da Curva:	20/03/2014	Curva N°:	1		
Replicatas por Nível (k):	2	N° de Níveis (n):	7		
Equipamento:	Shimadzu 3	Responsável:	José Luiz		
<b>Tabela de dados originais</b>					
Nível (k)	i	Conc. µg/mL	Resposta Área		
1	01	26,567	1424272		
	02	26,567	1420734		
2	03	53,133	2823752		
	04	53,133	2821434		
3	05	79,700	4217577		
	06	79,700	4204178		
4	07	106,267	5575470		
	08	106,267	5583453		
5	09	132,833	6962076		
	10	132,833	6931958		
6	11	159,400	8274116		
	12	159,400	8284807		
7	13	185,967	9623476		
	14	185,967	9620256		
<b>Avaliação de Valores Extremos</b> (Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)					
Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.					
Curva Analítica Final					
					
Gráfico de Resíduos					
					
<b>Normalidade dos Resíduos</b> (Teste de Ryan-Joiner)					
Req	0,98				
Rcrit (α = 0,05)	0,94				
<b>Autocorrelação dos Resíduos</b> (Teste de Durbin-Watson)					
d (calculado)	0,59				
dL (Limite Inferior) α = 0,05	1,05				
dU (Limite Superior) α = 0,05	1,35				
<b>Homogeneidade da Variância dos Resíduos</b> (Teste de Brown-Forsythe)					
Variância Combinada	7,24E+08				
t <sub>c</sub> calculado	-3,57E-02				
t <sub>tabelado</sub> (α = 0,05)	2,18E+00				
p	9,72E-01				
<b>Resumo da Avaliação</b>					
Homogeneidade de variância					
Há Homocedasticidade p > 0,05					
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade					
A regressão é significativa p < 0,001					
<b>Há desvio de linearidade</b> p < 0,05					
Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05)					
<b>Há autocorrelação</b> d < dL					
Teste de Normalidade (α = 0,05)					
Segue a Normal Req > Rcrit					
<b>Estadísticas da Regressão Linear (Modelo: Y = a + bX)</b>					
Coefficiente Angular (b):	5,14E+04	Coefficiente Linear (a):	9,08E+04		
r	1,0000	R <sup>2</sup>	0,9999		
N	14	Graus de Liberdade	12		
<b>Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)</b>					
Limite de Detecção	1,32E+00	Limite de Quantificação	3,95E+00		
<b>ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)</b>					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	1,04E+14	1,04E+14	1,46E+05	6,94E-26
resíduos	12	8,59E+09	7,16E+08		
Ajuste	5	7,94E+09	1,59E+09	1,72E+01	8,30E-04
erro puro	7	6,46E+08	9,24E+07		
total	13	1,05E+14			
<b>Observações</b>					
Responsável: _____ Data: __/__/__ Verificado por: _____ Data: __/__/__					
AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA			Pág.:1/1		

Fonte da planilha: (BAZILIO et al, 2012)

## III) Curva analítica do marcador epicatequina

Tabela 34: Curva analítica (estimada) da epicatequina (nível 2 ao nível 8)

Ministério da Saúde		FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		INCQS	
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde					
<b>AValiação de LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA</b>					
<b>Dados da Curva Analítica</b>					
Análise:	Curva analítica da epicatequina no MIX-PAD				
Data de Confeção da Curva:	20/03/2014	Curva N°:	1		
Replicatas por Nível (k):	2	N° de Níveis (n):	7		
Equipamento:	Shimadzu 3	Responsável:	José Luiz		
<b>Tabela de dados originais</b>					
Nível (k)	i	Conc. µg/mL	Resposta Área	<b>Avaliação de Valores Extremos</b> (Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos) Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.	
1	01	16,425	601461		
	02	16,425	600949		
2	03	32,850	1199562		
	04	32,850	1196864		
3	05	49,275	1792457		
	06	49,275	1785332		
4	07	65,700	2368492		
	08	65,700	2371280		
5	09	82,125	2962932		
	10	82,125	2953711		
6	11	98,550	3530228		
	12	98,550	3543066		
7	13	114,975	4148605		
	14	114,975	4129577		
<b>Normalidade dos Resíduos</b> (Teste de Ryan-Joiner)					
Req			0,98		
Rcrit (α = 0,05)			0,94		
<b>Autocorrelação dos Resíduos</b> (Teste de Durbin-Watson)					
d (calculado)			1,80		
dL (Limite Inferior) α = 0,05			1,05		
dU (Limite Superior) α = 0,05			1,35		
<b>Homogeneidade da Variância dos Resíduos</b> (Teste de Brown-Forsythe)					
Variância Combinada			6,29E+07		
t <sub>i</sub> calculado			-6,64E-01		
t <sub>tabelado</sub> (α = 0,05)			2,18E+00		
p			5,19E-01		
<b>Resumo da Avaliação</b>					
Homogeneidade de variância					
Há Homocedasticidade p > 0,05					
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade					
A regressão é significativa p < 0,001					
Não há desvio de Linearidade p > 0,05					
Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05)					
Não há autocorrelação d > dU					
Teste de Normalidade (α = 0,05)					
Segue a Normal Req > Rcrit					
<b>Estadísticas da Regressão Linear (Modelo: Y = a + bX)</b>					
Coeficiente Angular (b):		3,58E+04	Coeficiente Linear (a):		1,89E+04
r		1,0000	R <sup>2</sup>		1,0000
N		14	Graus de Liberdade		12
<b>Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)</b>					
Limite de Detecção		5,57E-01	Limite de Quantificação		1,67E+00
<b>ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)</b>					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	1,94E+13	1,94E+13	3,14E+05	7,05E-28
resíduos	12	7,40E+08	6,17E+07		
Ajuste	5	4,01E+08	8,02E+07	1,66E+00	2,62E-01
erro puro	7	3,39E+08	4,84E+07		
total	13	1,94E+13			
<b>Observações</b>					
Responsável: _____				Data: __/__/__	
Verificado por: _____				Data: __/__/__	
AValiação de LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA				Pág.:1/1	

Fonte da planilha: (BAZILIO et al, 2012)

## IV) Curva analítica do marcador rutina

Tabela 35 Curva analítica (estimada) da rutina

Ministério da Saúde		FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		INCQS	
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde					
<b>AValiação de Linearidade de Curva Analítica</b>					
<b>Dados da Curva Analítica</b>					
Análise:	Curva analítica da cumarina no MIX-PAD				
Data de Confeção da Curva:	20/03/2014	Curva N°:	1		
Replicatas por Nível (k):	2	N° de Níveis (n):	7		
Equipamento:	Shimadzu 3	Responsável:	José Luiz		
<b>Tabela de dados originais</b>					
Nível (k)	i	Conc. µg/mL	Resposta Área		
1	01	7,147	2926668		
	02	7,147	2920747		
2	03	14,293	5840302		
	04	14,293	5826666		
3	05	21,440	8717079		
	06	21,440	8684480		
4	07	28,587	11498262		
	08	28,587	11513070		
5	09	35,733	14362457		
	10	35,733	14303030		
6	11	42,880	17027416		
	12	42,880	17096435		
7	13	50,027	20044142		
	14	50,027	19937754		
<b>Avaliação de Valores Extremos</b> (Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)					
Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.					
<b>Curva Analítica Final</b>					
<b>Gráfico de Resíduos</b>					
<b>Normalidade dos Resíduos</b> (Teste de Ryan-Joiner)					
Req	0,97				
Rcrit ( $\alpha = 0,05$ )	0,94				
<b>Autocorrelação dos Resíduos</b> (Teste de Durbin-Watson)					
d (calculado)	1,44				
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,05				
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,35				
<b>Homogeneidade da Variância dos Resíduos</b> (Teste de Brown-Forsythe)					
Variância Combinada	3,32E+09				
$t_i$ calculado	-6,44E-01				
$t_{\text{tabelado}} (\alpha = 0,05)$	2,18E+00				
p	5,32E-01				
<b>Resumo da Avaliação</b>					
Homogeneidade de variância					
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$				
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade					
A regressão é significativa	$p < 0,001$				
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$				
Autocorrelação dos Resíduos ( $\alpha = 0,05$ )					
Não há autocorrelação	$d > dU$				
Teste de Normalidade ( $\alpha = 0,05$ )					
Segue a Normal	Req > Rcrit				
<b>Estadísticas da Regressão Linear (Modelo: <math>Y = a + bX</math>)</b>					
Coefficiente Angular (b):	3,96E+05	Coefficiente Linear (a):	1,51E+05		
r	1,0000	R <sup>2</sup>	0,9999		
N	14	Graus de Liberdade	12		
<b>Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)</b>					
Limite de Detecção	3,70E-01	Limite de Quantificação	1,11E+00		
<b>ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)</b>					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	4,49E+14	4,49E+14	1,34E+05	1,14E-25
resíduos	12	4,01E+10	3,34E+09		
Ajuste	5	2,95E+10	5,90E+09	3,91E+00	5,17E-02
erro puro	7	1,06E+10	1,51E+09		
total	13	4,49E+14			
<b>Observações</b>					
Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___					
AValiação de Linearidade de Curva Analítica				Pág.:1/1	

Fonte da planilha: (BAZILIO *et al*, 2012)

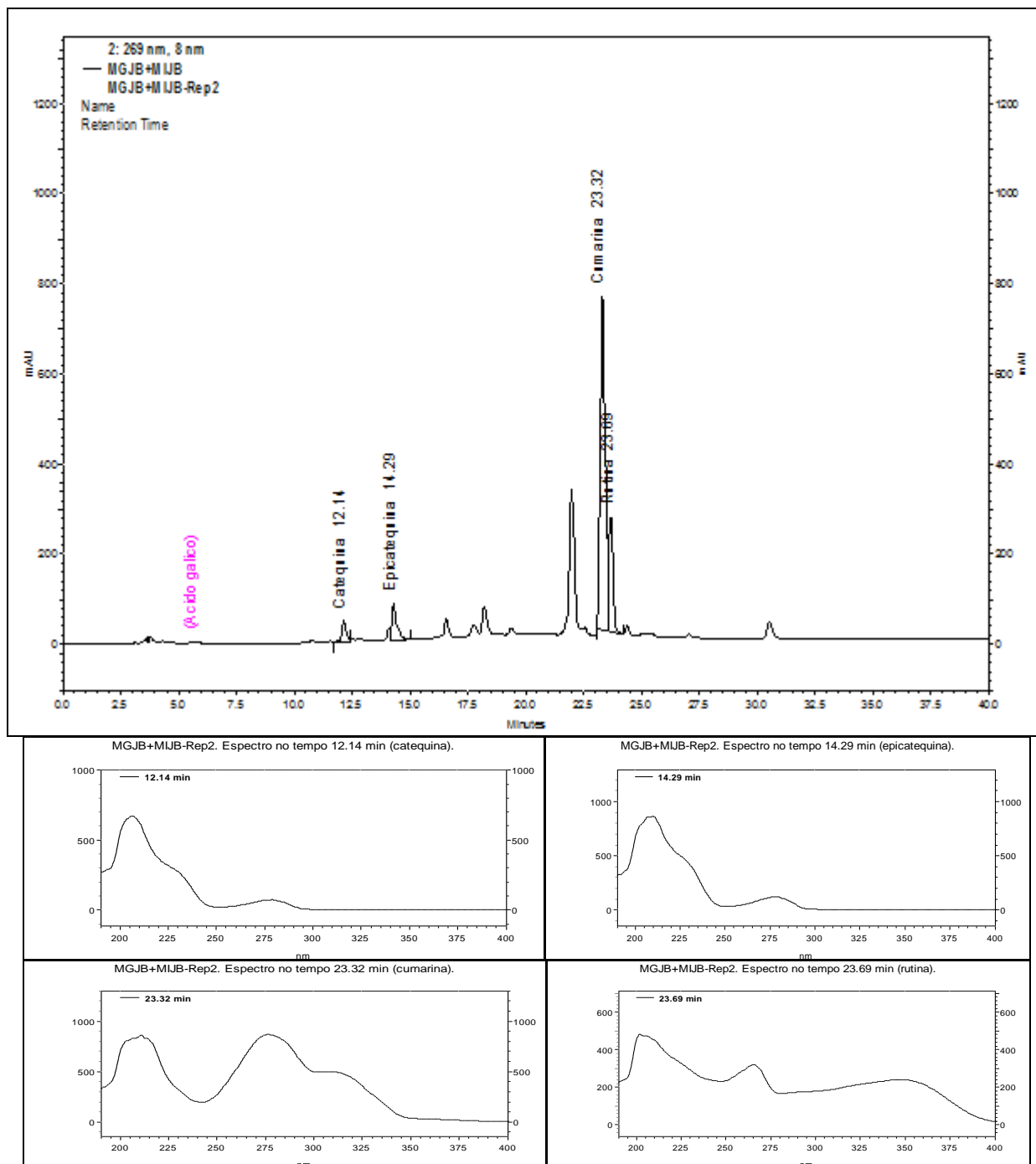
#### 4.2.4 Perfis cromatográficos obtidos por Cromatografia Líquida com detector UV/Vis (DAD) de misturas (MIX) das plantas espinheira-santa (MIJB), guaco (MGJB) e aroeira-da-praia (STJB) utilizando o método 2

O primeiro objetivo deste estudo foi avaliar preliminarmente a existência de algum efeito sinérgico em relação ao tempo de retenção e em relação ao espectro de absorção molecular na região UV/VIS, quando estes marcadores estão associados. O segundo objetivo foi de (caso não haja efeitos sinérgicos) avaliar a possibilidade de usar esta mistura de marcadores (MIX-pad) na caracterização de associações de extratos destas plantas.

##### 4.2.4.1 *Resultados da mistura dos extratos da planta guaco e da planta espinheira-santa (MIX MGJB e MIJB) em água (decoção diferenciada)*

O perfil do cromatograma (MGJB+MIJB) da mistura das soluções obtidas por decoção diferenciada das plantas guaco (MGJB) e espinheira (MIJB) foram registrados. Os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS, no tempo de retenção referentes aos quatro sinais (Figura 78) foram comparados aos espectros de absorção molecular na região do UV/VIS referente a cada marcador da mistura de marcadores (MIX pad). Observou-se similaridade entre os espectros obtidos no tempo de retenção da catequina (Figura 76; em 12,44 min) e o espectro do sinal em 12,14 min; da epicatequina (Figura 76; em 14,70 min) e o espectro do sinal em 14,29 min e, da cumarina (Figura 76; em 23,69 min) e o espectro do sinal em 23,32 min do perfil cromatográfico por decoção diferenciada. Observou-se, também, similaridade entre os espectros obtidos no tempo de retenção da rutina (Figura 75; em 23,86 min), injetada individualmente e o espectro do sinal em 23,69 min do perfil cromatográfico por decoção diferenciada.

**Figura 78:** Perfil cromatográfico da mistura dos extratos das plantas guaco e espinheira-santa (MIX MGJB e MIJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL

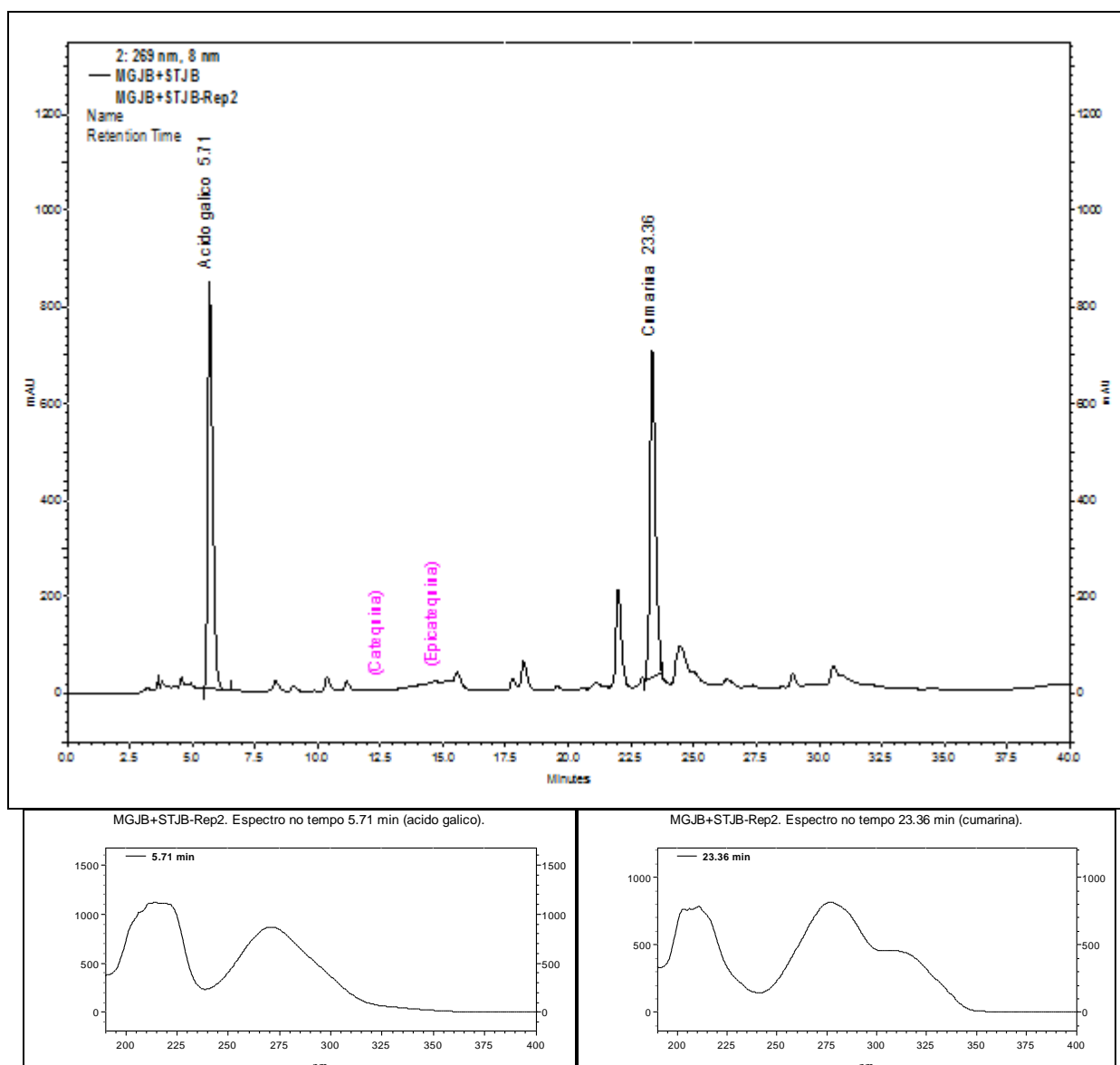




#### 4.2.4.2 Resultados da mistura dos extratos da planta guaco e da planta aroeira-da-praia (MIX MGJB e STJB) em água (decoção diferenciada)

O perfil do cromatograma (MGJB+STJB) da mistura dos extratos por decoção diferenciada das plantas guaco (MGJB) e aroeira (STJB) foram registrados. Os espectros de varredura de absorção molecular na região do UV/VIS, no tempo de retenção referentes aos dois sinais (Figura 79) foram comparados aos espectros de varredura de absorção molecular na região do UV/VIS referente a cada marcador da mistura de marcadores (MIX pad). Observou-se similaridade entre os espectros obtidos no tempo de retenção do ácido gálico (Figura 76; em 5,77 min) e o espectro do sinal em 5,71 min e, o espectro da cumarina (Figura 76; em 23,69 min) e o espectro do sinal em 23,36 min do perfil cromatográfico por decoção diferenciada.

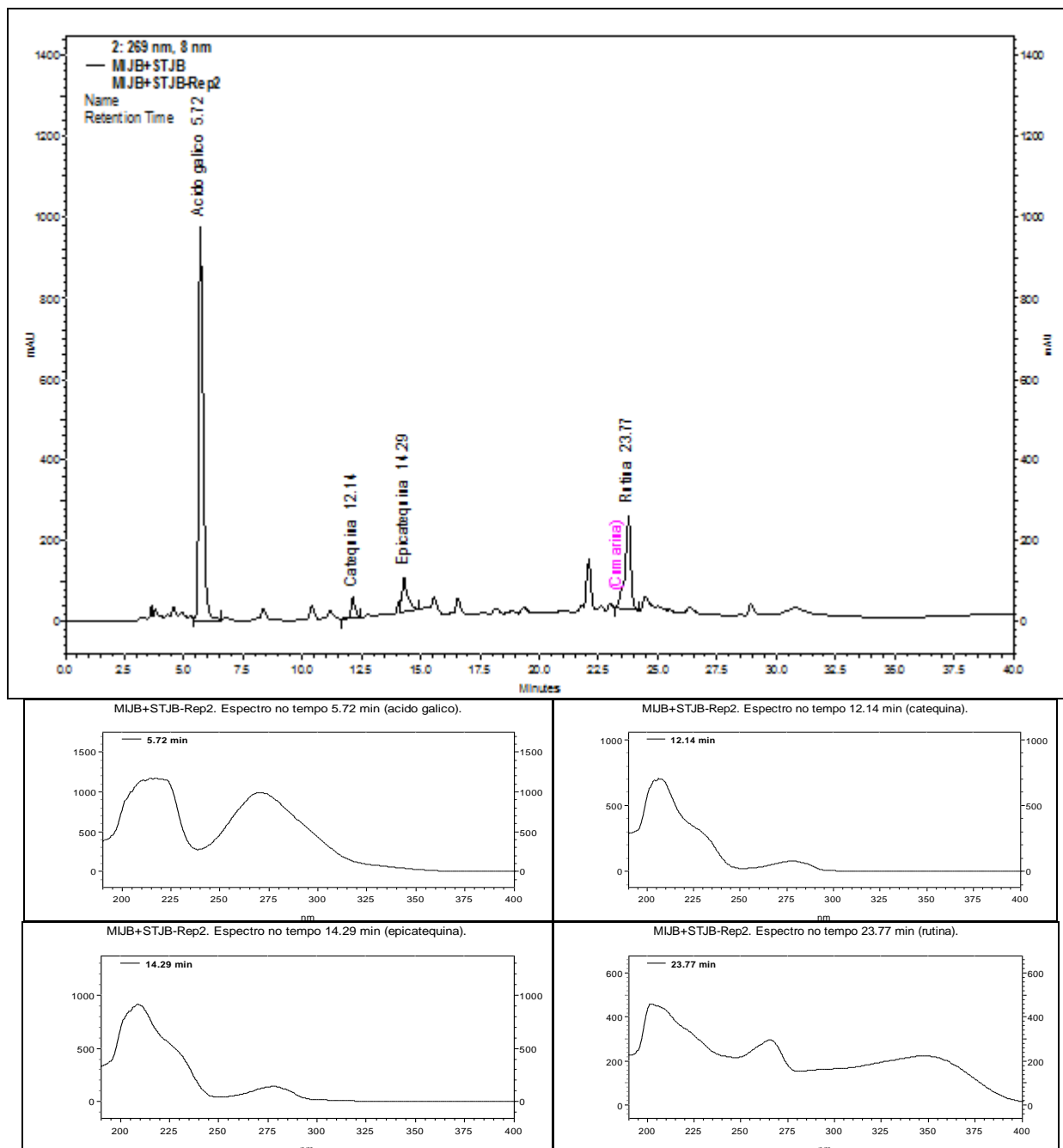
**Figura 79:** Perfil cromatográfico da mistura dos extratos das plantas guaco e aroeira-da-praia (MIX MGJB e STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



#### 4.2.4.3 Resultados da mistura dos extratos da planta espinheira-santa e da planta aroeira-da-praia (MIX MIJB e STJB) em água (decoção diferenciada)

O perfil do cromatograma (MIJB+STJB) da mistura das soluções obtidas por decoção diferenciada, das plantas espinheira (MIJB) e aroeira (STJB) foram registrados. Os espectros de varredura de absorção molecular na região do UV/VIS no tempo de retenção referente a quatro sinais (Figura 80) foram comparados aos espectros de absorção molecular na região do UV/VIS referentes a cada marcador da mistura de marcadores (MIX pad). Observou-se similaridade entre os espectros obtidos no tempo de retenção do ácido gálico (Figura 76; em 5,77 min) e o espectro do sinal em 5,72 min; da catequina (Figura 76; em 12,44 min) e o espectro do sinal em 12,14 min; da epicatequina (Figura 76; em 14,70 min) e o espectro do sinal em 14,29 min do perfil cromatográfico por decoção diferenciada. Observou-se, também, similaridade entre os espectros obtidos no tempo de retenção da rutina (Figura 75; em 23,86 min) injetada individualmente e o espectro do sinal em 23,77 min do perfil cromatográfico por decoção diferenciada.

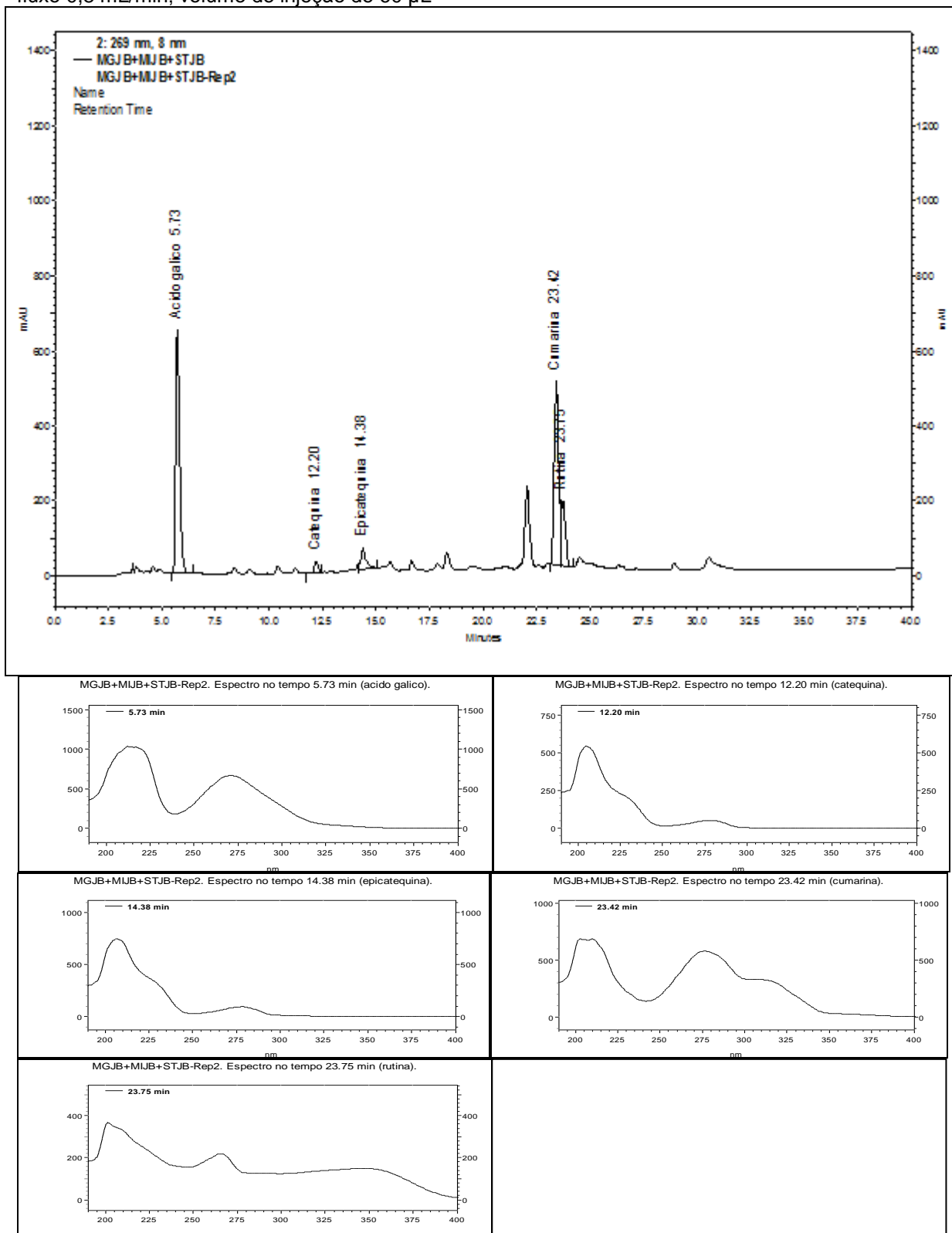
**Figura 80:** Perfil cromatográfico da mistura dos extratos das plantas espinheira-santa e aroeira-da-praia (MIX MIJB e STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



#### 4.2.4.4 Resultados da mistura dos extratos das plantas guaco, espinheira-santa e da planta aroeira-da-praia (MIX MGJB, MIJB e STJB) em água (decoção diferenciada)

O perfil do cromatograma (MGJB+MIJB+STJB) da mistura das soluções obtidas por decoção diferenciada das plantas guaco (MGJB), espinheira (MIJB) e aroeira (STJB) foram registrados. Os espectros de absorção molecular na região do UV/VIS, no tempo de retenção referentes aos cinco sinais (Figura 81) foram comparados aos espectros varredura de absorção molecular na região do UV/VIS referente a cada marcador da mistura de marcadores (MIX pad). Observou-se similaridade entre os espectros obtidos no tempo de retenção do ácido gálico (Figura 76; em 5,77 min) e o espectro do sinal em 5,73 min; da catequina (Figura 76; em 12,44 min) e o espectro do sinal em 12,20 min; da epicatequina (Figura 76; em 14,70 min) e o espectro do sinal em 14,38 min e da cumarina (Figura 76; em 23,69 min) e o espectro do sinal em 23,42 min do perfil cromatográfico por decoção diferenciada. Observou-se, também, similaridade entre os espectros obtidos no tempo de retenção da rutina (Figura 75; em 23,86 min), injetada individualmente e o espectro do sinal em 23,75 min do perfil cromatográfico por decoção diferenciada.

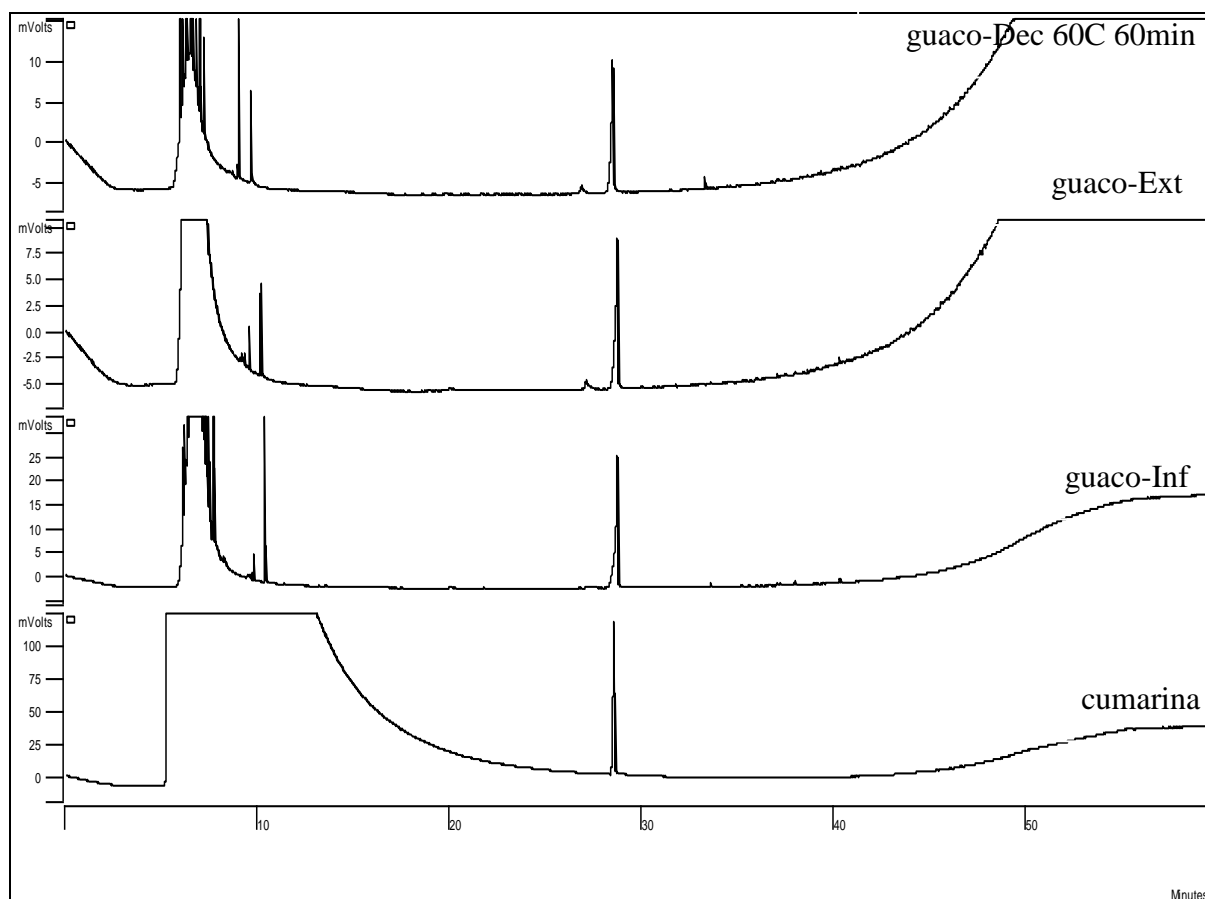
**Figura 81:** Perfil cromatográfico da mistura dos extratos das plantas guaco, espinheira-santa e aroeira-da-praia (MIX MGJB+MIJB+STJB), cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm) e os espectros de varredura de absorção molecular na região UV/Vis (DAD) nos tempos de retenção destacados no cromatograma. Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



#### 4.2.5 Perfis cromatográficos obtidos por Cromatografia Gasosa de alta Resolução com detector DIC das plantas guaco (MGJB), aroeira-da-praia (STJB) e espinheira-santa (MIJB) utilizando o método 3

##### 4.2.5.1 Resultados dos extratos da planta guaco (MGJB) em água (infusão, extrato e decocção diferenciada)

O perfil do cromatograma da planta guaco (MGJB), extraída por decocção diferenciada, por extração em soxhlet e por infusão foram registrados e comparados à solução que continha o marcador cumarina. Observou-se a presença de poucos sinais e de um sinal de mesmo tempo de retenção em todos os extratos comparados (Figura 82).

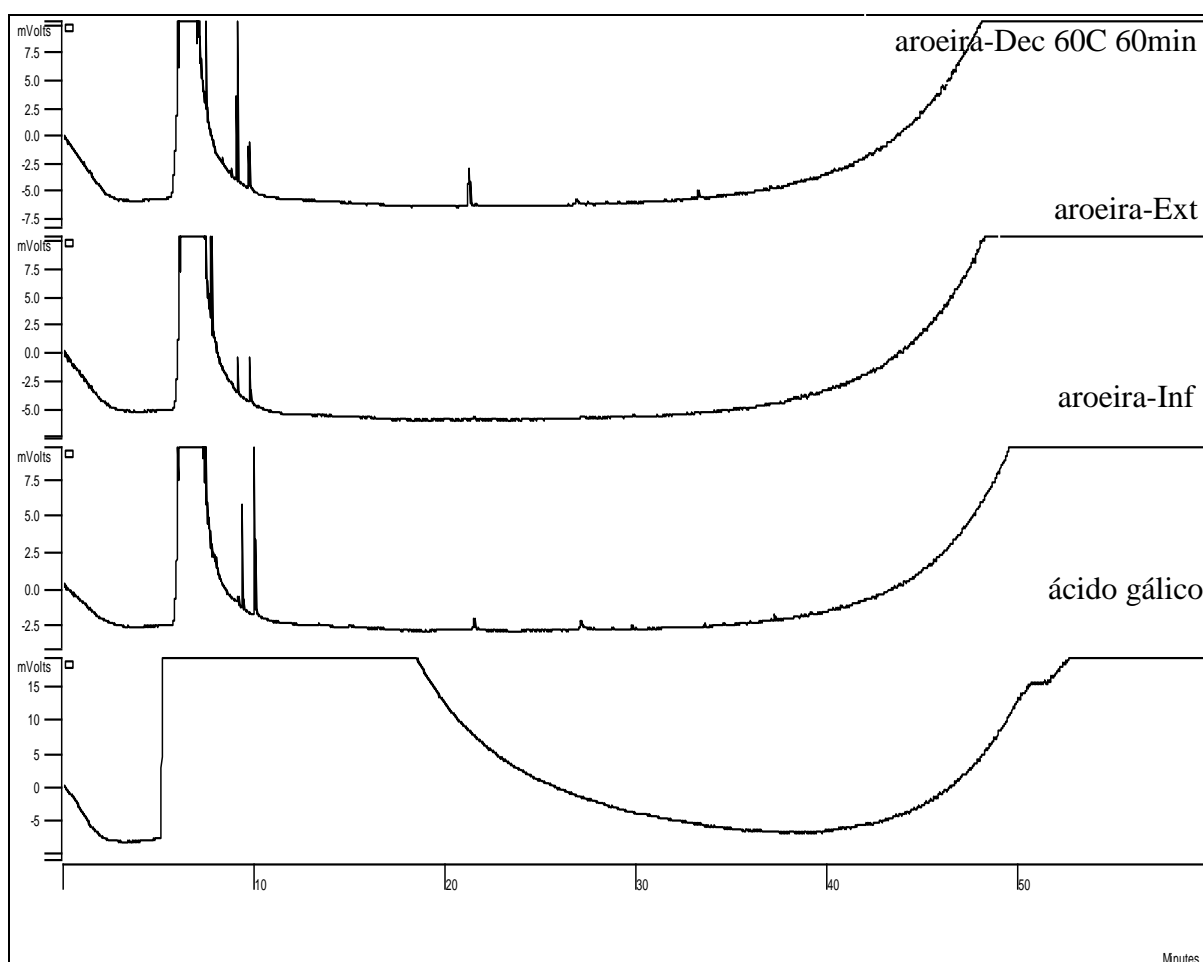


**Figura 82:** Comparação dos perfis cromatográficos do guaco (MGJB) com o da cumarina, cromatograma obtido por CG (DIC). Solvente água, preparação por infusão (Inf), extração em soxhlet (ext) e decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 3: coluna 5 % fenil silicone (5  $\mu$ m de diâmetro do filme, 30 m x 0,25 mm d.i); gás carreador: N<sub>2</sub>; gradiente de temperatura; fluxo 1,0 mL/min; volume de injeção de 1,0  $\mu$ L

#### 4.2.5.2 Resultados dos extratos da aroeira-da-praia (STJB) em água (infusão, extrato e decocção diferenciada)

O perfil do cromatograma da planta aroeira (STJB), extraída por decocção diferenciada, por extração em soxhlet e por infusão foram registrados e comparados a solução que continha o marcador ácido gálico. Observou-se poucos sinais e não houve presença de sinal de mesmo tempo de retenção em todos os extratos comparados (Figura 83).

**Figura 83:** Comparação dos perfis cromatográficos da aroeira-da-praia (STJB) com o do ácido gálico, cromatograma obtido por CG (DIC). Solvente água, preparação por infusão (Inf), extração em soxhlet (ext) e decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 3: coluna 5 % fenil silicone (5  $\mu$ m de diâmetro do filme, 30 m x 0,25 mm d.i); gás carreador: N<sub>2</sub>; gradiente de temperatura; fluxo 1,0 mL/min; volume de injeção de 1,0  $\mu$ L

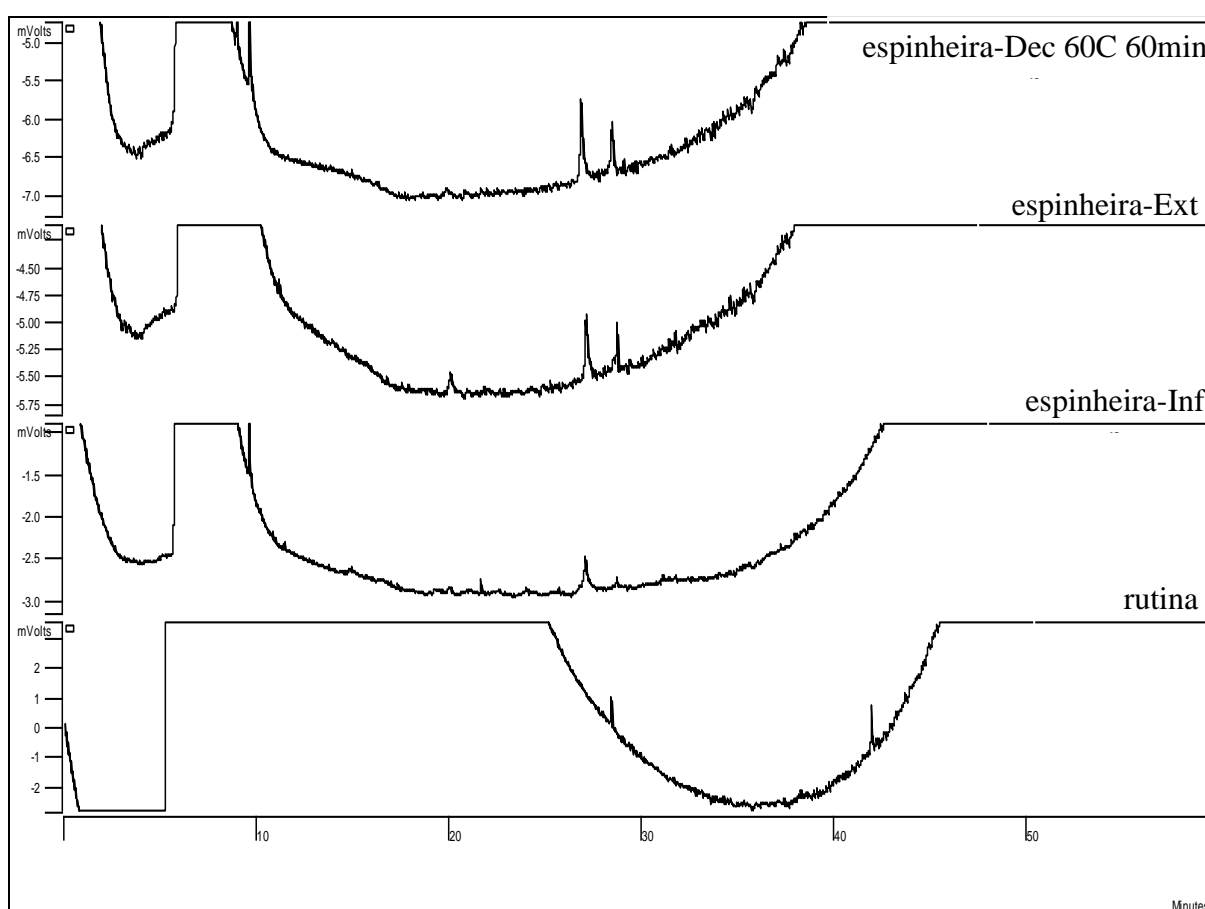




#### 4.2.5.3 Resultados dos extratos da espinheira-santa (MIJB) em água (infusão, extrato e decocção diferenciada)

O perfil do cromatograma da planta espinheira (MIJB), extraída por decocção diferenciada, por extração em soxhlet e por infusão foram registrados e comparados a solução que continha o marcador rutina. Observou-se pouco sinais e não houve presença de sinal de mesmo tempo de retenção em todos os extratos comparados (Figura 84).

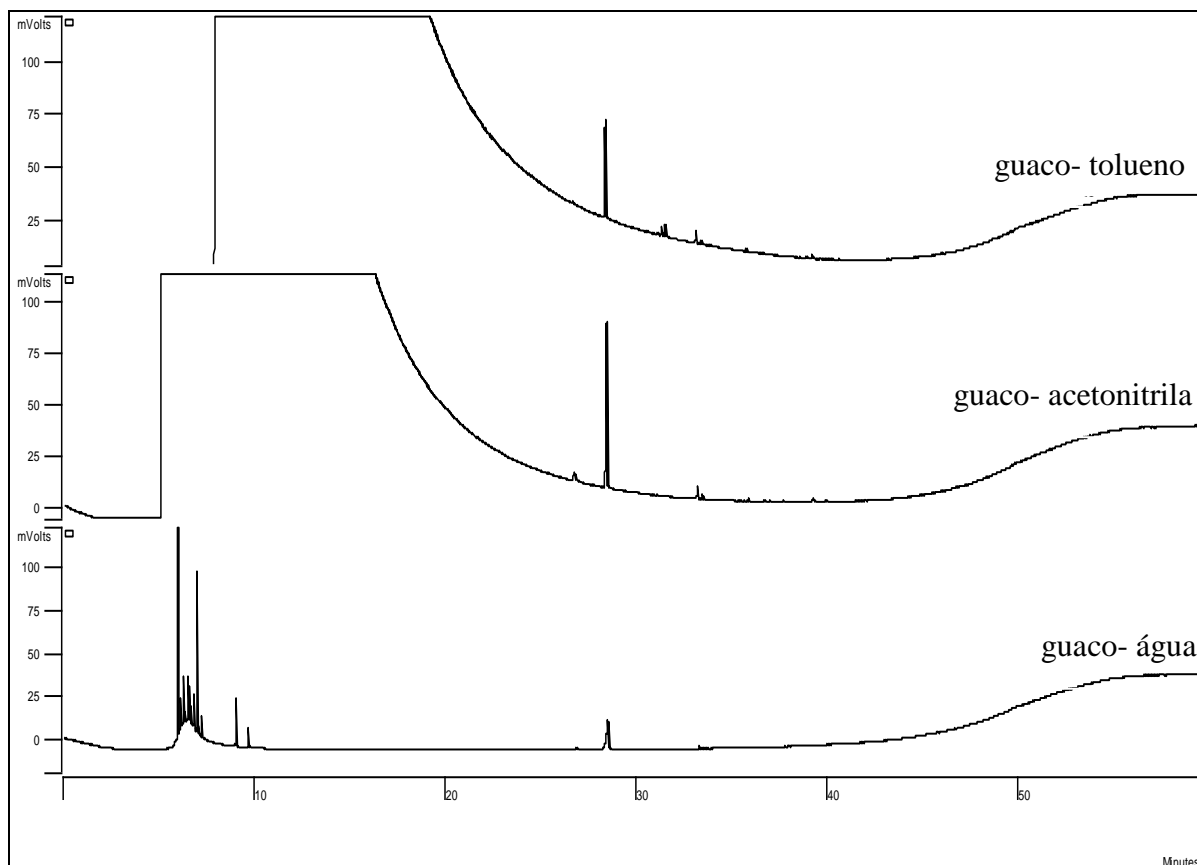
**Figura 84:** Comparação dos perfis cromatográficos da espinheira-santa (STJB) com o da rutina, cromatograma obtido por CG (DIC). Solvente água, preparação por infusão (Inf), extração em soxhlet (ext) e decocção diferenciada (Dec 60C 60min). Condições cromatográficas do método 3: coluna 5 % fenil silicone (5  $\mu$ m de diâmetro do filme, 30 m x 0,25 mm d.i); gás carreador: N<sub>2</sub>; gradiente de temperatura; fluxo 1,0 mL/min; volume de injeção de 1,0  $\mu$ L



#### 4.2.5.4 Resultados dos extratos do guaco (MGJB) em água, acetonitrila e tolueno (decoção diferenciada)

O perfil do cromatograma da planta guaco (MGJB), extraída por decoção diferenciada utilizando tolueno e acetonitrila, foram registrados e comparados ao perfil do cromatograma da planta guaco (MGJB), extraída por decoção diferenciada utilizando água. Observou-se a presença de poucos sinais e de um sinal de mesmo tempo de retenção em todos os extratos comparados, porém a intensidade do sinal foi diferente em cada solvente utilizado, sendo maior intensidade quando foi usado a acetonitrila e de menor intensidade quando foi usado a água (Figura 85).

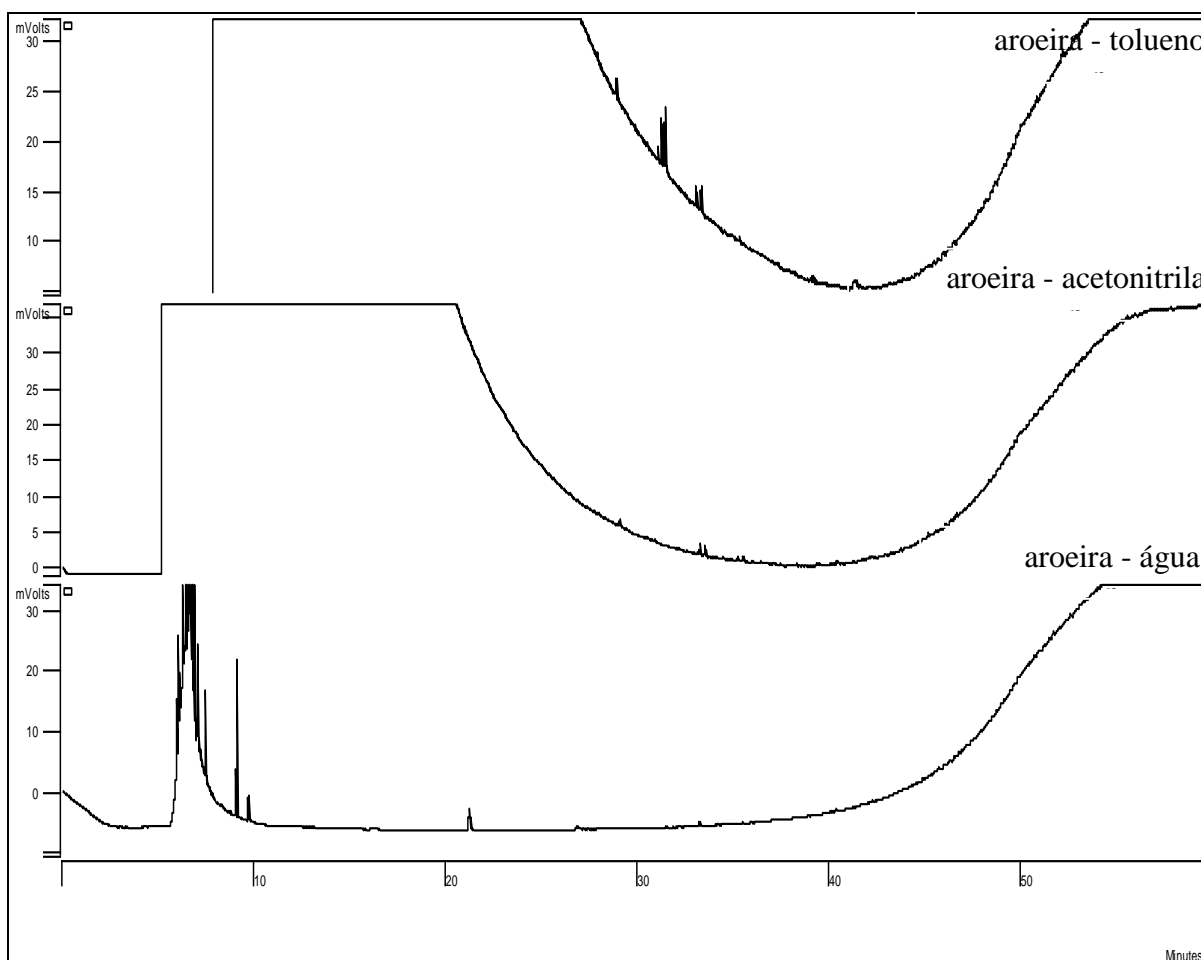
**Figura 85:** Comparação dos perfis cromatográficos do guaco (MGJB), cromatograma obtido por CG (DIC). Solvente água, acetonitrila e tolueno, preparação por decoção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 3: coluna 5 % fenil silicone (5  $\mu$ m de diâmetro do filme, 30 m x 0,25 mm d.i); gás carreador: N<sub>2</sub>; gradiente de temperatura; fluxo 1,0 mL/min; volume de injeção de 1,0  $\mu$ L



#### 4.2.5.5 Resultados dos extratos da aroeira (STJB) em água, acetonitrila e tolueno (decoção diferenciada)

O perfil do cromatograma da planta aroeira (STJB), extraída por decoção diferenciada utilizando tolueno e acetonitrila, foram registrados e comparados ao perfil do cromatograma da planta aroeira (STJB), extraída por decoção diferenciada utilizando água. Observou-se a presença de poucos sinais e não houve a presença de sinal de mesmo tempo de retenção em todos os extratos comparados (Figura 86).

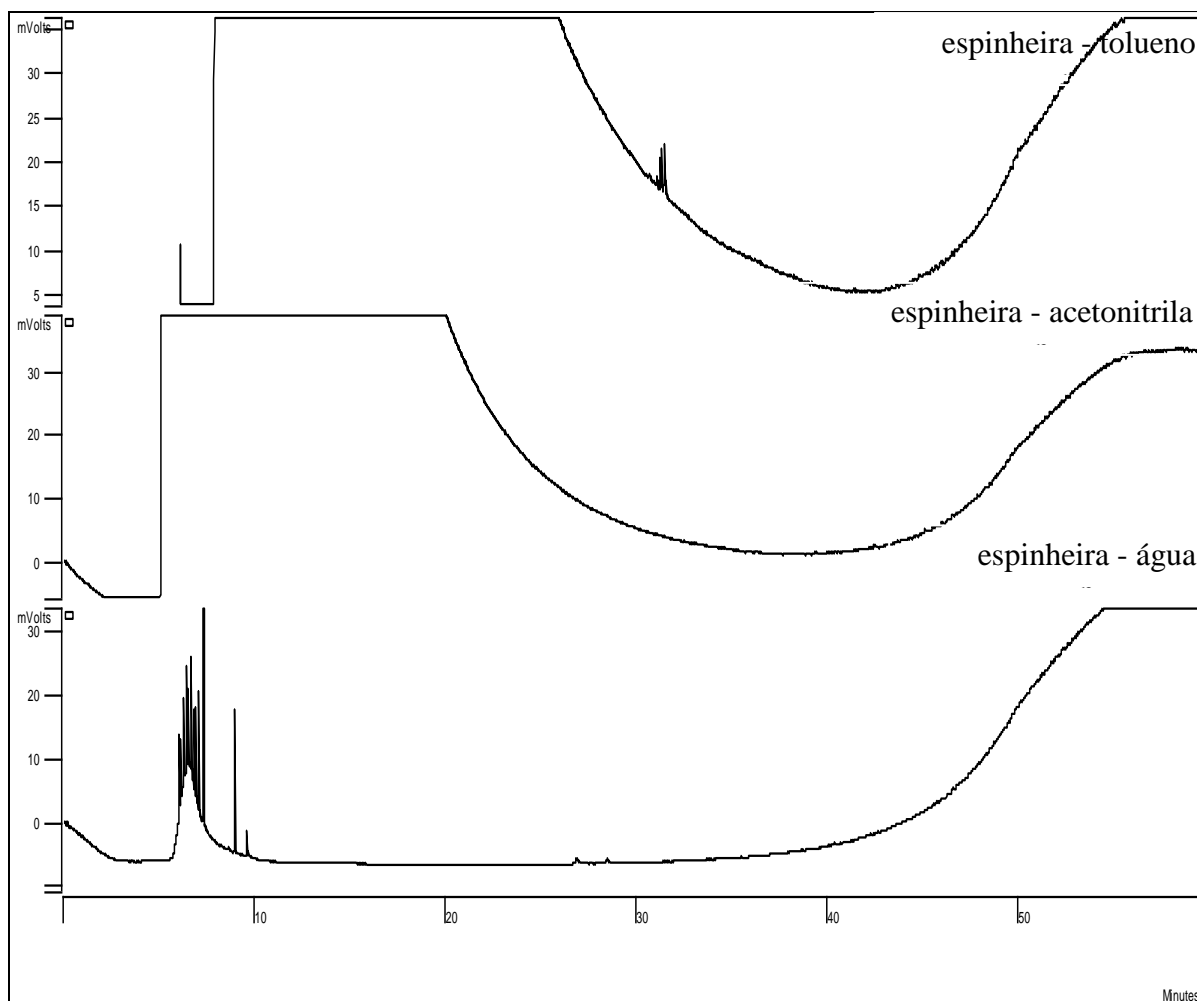
**Figura 86:** Comparação dos perfis cromatográficos da aroeira (STJB), cromatograma obtido por CG (DIC). Solvente água, acetonitrila e tolueno, preparação por decoção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 3: coluna 5 % fenil silicone (5  $\mu$ m de diâmetro do filme, 30 m x 0,25 mm d.i); gás carreador: N<sub>2</sub>; gradiente de temperatura; fluxo 1,0 mL/min; volume de injeção de 1,0  $\mu$ L



#### 4.2.5.6 Resultados dos extratos da espinheira (MIJB) em água, acetonitrila e tolueno (decoção diferenciada)

O perfil do cromatograma da planta espinheira (MIJB), extraída por decoção diferenciada utilizando tolueno e acetonitrila, foram registrados e comparados ao perfil do cromatograma da planta espinheira (MIJB), extraída por decoção diferenciada utilizando água. Observou-se a presença de poucos sinais e não houve a presença de sinal de mesmo tempo de retenção em todos os extratos comparados (Figura 87).

**Figura 87:** Comparação dos perfis cromatográficos da espinheira (MIJB), cromatograma obtido por CG (DIC). Solvente água, acetonitrila e tolueno, preparação por decoção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 3: coluna 5 % fenil silicone (5  $\mu$ m de diâmetro do filme, 30 m x 0,25 mm d.i); gás carreador: N<sub>2</sub>; gradiente de temperatura; fluxo 1,0 mL/min; volume de injeção de 1,0  $\mu$ L

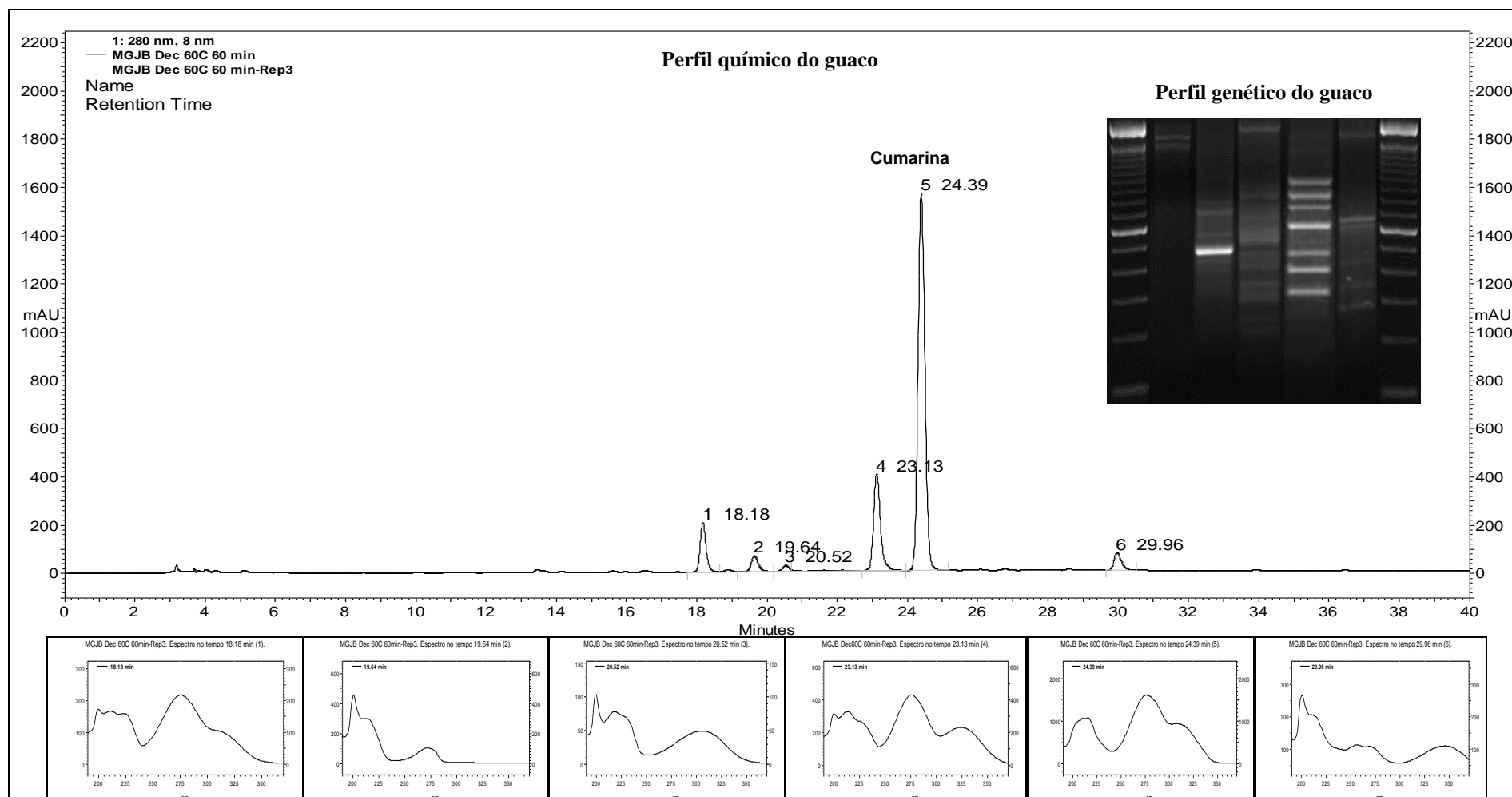


### 4.3 LIMITAÇÕES E VANTAGENS DO PROJETO

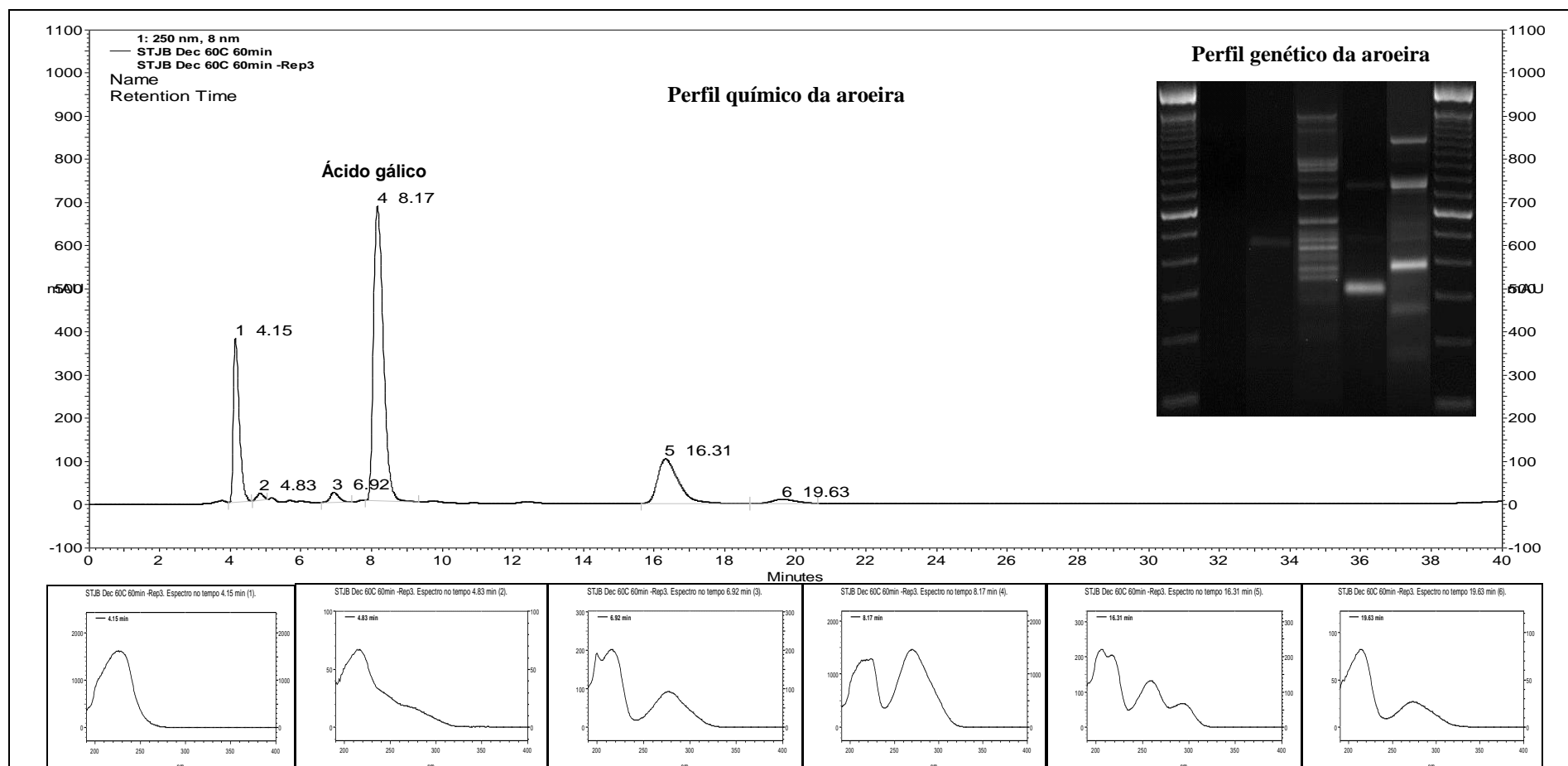
A caracterização dos marcadores deverá ser confirmada através dos espectros de massa obtidos através das técnicas CGAR-EM e CLAE-EM. Os teores dos marcadores nos extratos foi apenas estimado, considerando que o único padrão com certificado foi do marcador rotina (USP), todos os outros marcadores usados foram matérias-primas.

O Perfil genético (RAPD-PCR, figura 22), cromatográfico (CLAE-UV) e do espectro de absorção molecular no UV/VIS no tempo de retenção referentes aos sinais do perfil cromatográfico das três plantas, mostrou-se ser uma ferramenta eficiente para a identificação destas plantas (Figuras 88, 89 e 90).

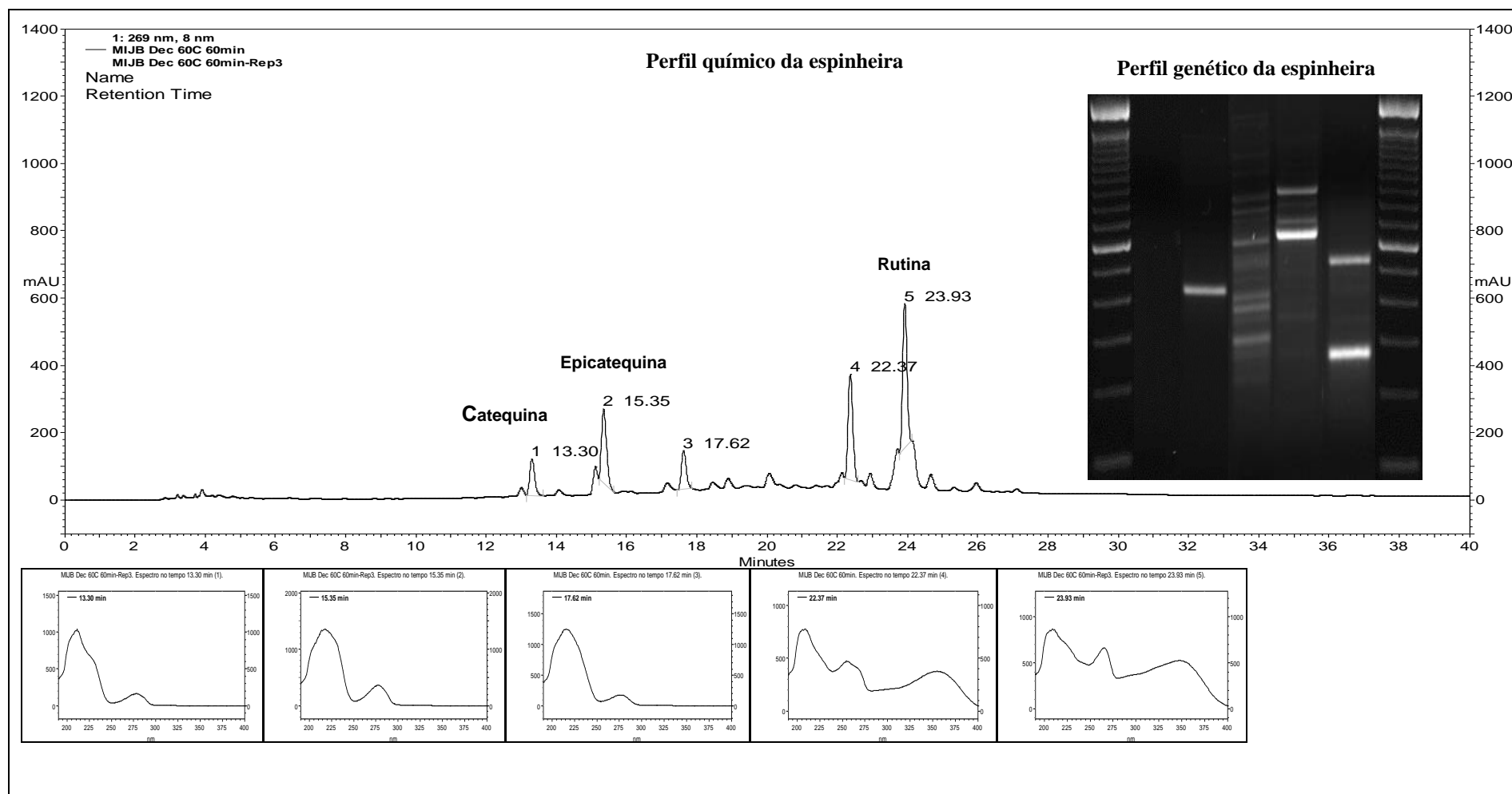
**Figura 88:** Perfis genético (RAPD-PCR, figura 22), químico (CLAE-UV) e do espectro de varredura de absorção molecular no UV-Vis no tempo de retenção dos sinais do perfil cromatográfico do guaco, cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 280 nm). Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



**Figura 89:** Perfis genético (RAPD-PCR, figura 22), químico (CLAE-UV) e do espectro de varredura de absorção molecular no UV-Vis no tempo de retenção dos sinais do perfil cromatografico da aroeira-da-praia, cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 250 nm). Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL



**Figura 90:** Perfis genético (RAPD-PCR, figura 22), químico (CLAE-UV) e do espectro de varredura de absorção molecular no UV-Vis no tempo de retenção dos sinais do perfil cromatografico da espinheira-santa, cromatogramas obtidos por CLAE UV-Vis (detecção a 269 nm). Solvente água, preparação por decocção diferenciada (Dec 60C 60 min). Condições cromatográficas do método 2: coluna LiChorosorb RP-select B (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i); fase móvel (Metanol grau CLAE e TFA 0,05 % v/v, gradiente); temperatura 50° C; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 60 µL







## 5 CONCLUSÕES

A escolha de cinco iniciadores no primeiro estudo para elaboração de um perfil (fingerprint) genético mostrou-se adequado na identificação das três espécies do estudo.

Os perfis de RAPD-PCR identificados no segundo estudo permitiu distinguir as duas plantas da mesma espécie de regiões diferentes e poderão servir de base para futuros trabalhos nesta área.

Os perfis cromatográficos e os perfis dos espectros obtidos por CLAE-UV/VIS (método 2) no terceiro estudo, das plantas extraídas por decocção diferenciada (em água), mostrou-se adequado na identificação das três espécies. Os perfis apresentaram uma boa quantidade de picos resolvidos de boa intensidade com espectros de absorção molecular na região UV/VIS bem definidos, indicando ser um perfil adequado para o monitoramento de matéria-primas.

O perfil cromatográfico por CGAR-DIC para as plantas em estudo não apresentou uma quantidade de picos razoável, portanto não sendo adequado.



## 6 PERSPECTIVAS

### I) Em relação ao estudo genético:

Verificar a existência de uma banda monomórfica em cada planta do estudo para ser sequenciada. Desenhar um iniciador específico com a finalidade de ser usado na identificação da planta no produto (monofarmacos ou em associações de plantas).

### II) Em relação ao estudo químico:

Identificar e elucidar as estruturas químicas dos componentes (sinais escolhidos no perfil cromatográfico) por CGAR-EM e CLAE-EM, com a finalidade de estabelecer um extrato padrão das plantas do estudo.

### III) Em relação aos estudos genético e químico:

Os resultados alcançados, poderão contribuir para elaboração de um Banco de Perfis (fingerprint) genético e químico das plantas do estudo regulamentadas pelo Sistema Único de Saúde do Brasil, desta forma, auxiliando no controle de qualidade destas espécies como matérias-primas na produção de medicamentos fitoterápicos

O Banco de Perfis, também, poderá ser utilizado como mais uma ferramenta, auxiliando na prevenção da biopirataria destas plantas medicinais.

Este projeto poderá servir de base para futuros trabalhos nesta área com as outras 68 plantas medicinais regulamentadas.



## REFERÊNCIAS

BAZILIO, F. S.; BONFIM, M.V.J.; ALMEIDA, R, J. e ABRANTES, S. M. P. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. *Analytica*, v. 59, p. 60-67, 2012. ISSN 1677-3055. Disponível em: <[http://www.revistaanalytica.com.br/ed\\_anteriores/59/analytica.pdf](http://www.revistaanalytica.com.br/ed_anteriores/59/analytica.pdf)>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Circula Técnica CT nº11, de 10 de dez. de 2006. Dispõe sobre Orientação ao Setor Regulado na Área de Medicamentos Fitoterápicos. *D.O.U.*, Brasília, 2006.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B. Medicamentos Fitoterápicos. In: Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Orgânica Moderna, Yunes, R.A. e Calixto, J.B. eds. p. 297-316. Argos Editora. Santa Catarina, 2001.

CARVALHER-MACHADO, S.C.; ROSAS, E.C.; BRITO, F.A.; HENRIGE, A.P.; OLIVEIRA, R.R.; KAPLAN, M.A.C.; FIGUEIREDO, M.R.; HENRIQUES, M.G.M.O. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves in IgE induced mice paw edema and pleurist. *International Immunopharmacology*, v.8, p. 1552-1560, 2008.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A. e LAGO, J.H.G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Química Nova*, v.30, p. 597-599, 2007.

CARVALHO-OKANO, R.M. Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Moench Mol. (Celastraceae) do Brasil extra-amazônico. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 250p.. (Tese Doutorado), 1992.

CRAGG, G.C.; NEWMAN D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, v. 60, p. 52-60, 1997.

CONCEIÇÃO, M. As plantas medicinais no ano 2000, dicionário de plantas medicinais. Brasília: Editera, 284p, 1987.

CORDEIRO, P. J. M.; VILEGAS, J. H. Y .; LANÇAS, F. M.; J. BRAZ. Chem. Soc. 10, 523, 1999.

ERIG, A. C. & SCUCH, M. W. Avaliação da fidelidade genotípica por marcadores RAPDs de brotações de pereira (*Pyrus communis L.*) cv. Carrick regeneradas *in vitro* regenerated. *Ciência Rural*, v. 33, n. 3, p. 449-454, 2003.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E. & QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491., 1992

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2a. ed. Brasília, EMBRAPA/CENARGEN, 220 pp., 1995.

FRITSCH, P. & RISEBERG, L. H. The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: Smith, T. B. & Wayne, R. K. (Ed.). *Molecular genetic approaches in conservation*, New York: Oxford University Press, pp. 54-73, 1996.

GAO, Q.; CHOU, G.; DONG, T.T.; LI, J.; DUAN, R.; CHEUNG, W.; TSIM, K.W. Identification and quality control of radix et rhizoma gentianae by chemical fingerprinting: evaluation of gentiopicrin from different cultivated regions in China. *Asian Journal of Traditional Medicines*, v.1, p. 3-4, 2006.

GILBERT B.; FERREIRA J.L.P. & ALVES L. F. Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas. 1 ed. Curitiba: Abifito, 2005.

GONÇALVES M. L. Q. Boas práticas para medicamentos fitoterápicos em escala magistral no setor público. Faculdade de farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, (Dissertação Mestrado), 2009.

HON C.C.; CHOW Y.C.; ZENG F.Y.; LEUNG F.C.C. Genetic authentication of ginseng and other traditional chinese medicine. *Acta Pharmacol Sin*, v. 24, n. 9, p. 841-846, 2003.

LACERDA, D. R.; Acedo, M. D. P.; Lemos Filho, J. P. & Lovato, M. B. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathyenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. *Molecular Ecology*, 10: 1143-1152, 2001.

KLEIN, R.M. Árvores nativas da mata pluvial da costa Atlântica de Santa Catarina. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 3, Curitiba, 1968. Anais. Curitiba: Federação das Indústrias do Paraná, p.65-103, 1968.

MARQUES, L.C.; PETROVICK, P.R. Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, UFSC, cap. 14, p. 327-369, 2007.

MARSTON, A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry*, v. 68, p. 2785-2797, 2007.

MOSSI, A. M.; CANSIAN, R. L.; CARVALHO, A. Z.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V .; MAZUTTI, M.; NASCIMENTO FILHO, I.; ECHEVERRIGARAY, S.; *Fitoterapia*, 75, 168, 2004.

NOVAK, J. Medicinal plants: DNA-based identification of raw and processed materials. Institute for Applied Botany and Pharmacognosy, University of Veterinary Medicine, A-1210 Wien, Austria, 2007.

OKIGBO, R.N.; EME, U.E.; OGBOGU, S. Biodiversity and conservation of medicinal and aromatic plants in Africa. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, v. 3, n. 6, p. 127-134, 2008.

OLIVEIRA, R. P., CRISTOFANI, M. & MACHADO, M. A. Marcadores RAPD para mapeamento genético e seleção de híbridos de citros. *Rev. Bras. Frutic.*, v. 23, n. 3, p. 477-481, 2001.

OMS. Organización Mundial de la Salud. Buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2003.



RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *J. Ethnopharmacol.* 39: 605-613, 2001.

ROBBERS, J.E.; SPEEDLE, M.K.; TYLER, V.E. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 337, 1996.

SHAW, P.C.; BUT, P.P.H. Authentication of *Panax* species and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction. *Planta Medica*, v. 61, p. 466-469, 1995.

SHEN, Y., NEWBURY, J. & FORD-LLOYD, B. V. Identification of Taxa in the Genus *Beta* using ITS1 Sequence Information. *Plant Molecular Biology Reporter* v. 16, p. 147–155, 1998.

SIANI, A.C; PIZARRO, A.P.B.; BITTENCOURT, F.S.N.; RIBEIRO, I.Q.C.; CASARA, J.; GUILHERMINO, J.F.; CALIXTO, J.B.; AUCÉLIO, J.G.; PIANOWSKY, L.F.; MESSIAS, W., PERET., P.S.A. Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos. 1 ed. Rio de Janeiro: Scriptorio Comunicação (Ed.), 2003.

SILVA, A.C.P. O laboratório oficial na avaliação analítica. In: Fundamentos da Vigilância Sanitária (Rozenfeld S.,org.). Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p. 271-301, 2000.

SILVA, S. R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA, L. H. M.; MARCUS VINÍCIUS M. *Plantas Mediciniais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio*. Disponível em: <[http://www.traffic.org/publications/traficc\\_portu.pdf](http://www.traffic.org/publications/traficc_portu.pdf)> Acesso em: 17 jul. 2005;

PESSUTO, M.B. Análise fitoquímica de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek. e avaliação do potencial antioxidante. 104 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

PIOVESAN, M. F. A construção política da agência nacional de vigilância sanitária. Rio de Janeiro: Fiocruz/ ENSP, 2002.

QUEIRES, L.C.; FAUVEL-LAFETVE, F.; TERRY, S.; DE LA TAILLE, A.; KOUYOUMDJIAN, J.C.; CHOPIN, D.K.; VACHEROT, F. RODRIGUES, L.E. e CRÉPIN, M. 2006. Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. *Anticancer Research*, v.26, p.379-387, 2006.

VURAL H.C. Genomic DNA isolation from aromatic and medicinal plants growing in Turkey. *Scientific Research and Essay*, v. 4, n. 2, p. 59-64, 2009.

Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535, 1990.

XIE, P.; CHEN S.; LIANG Y.; WANG X.; TIAN R.; UPTON R. Chromatographic fingerprint analysis-a rational approach for quality assessment of traditional chinese herbal medicine. *Journal of Chromatography A*, v. 1112, p. 171-180, 2006.

ZHANG Y.B.; SHAW P.C.; SZE C.W.; WANG Z.T.; TONG A.Y. Molecular authentication of chinese herbal materials. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 15, n.1, p. 1-9, 2007.

ZILDA, P.S. ; COROA, M.L. Vigilância Sanitária: Um Histórico Discursivo, 1998