



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

JEANE FRANCISCA ALVES RIBEIRO

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA BIOMONITORADA DA
TINTURA 70°GL DE *Arrabidaea chica* Humb. & Bompl.
Verlot**

**BELÉM
2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

JEANE FRANCISCA ALVES RIBEIRO

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA BIOMONITORADA DA
TINTURA 70% DE *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.)
Verlot**

Autor: Jeane Francisca Alves Ribeiro

Orientador: Wagner Luiz Ramos Barbosa

Co-orientador: Prof. Dr. José Otávio Carréra Silva Junior

Trabalho apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas área de concentração: Fármacos E Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde Como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

**BELÉM
2011**

Ribeiro, Jeane Francisca Alves.

Investigação fitoquímica biomonitorada da tintura 70°GL de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bopl.) Verlot / Jeane Francisca Alves Ribeiro ; orientador, Wagner Luiz Ramos Barbosa. — 2011

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) Belém, 2011.

1. *Arrabidaea chica* (H&B) Verlot 2. RENISUS 3. CCD 4. CLV 5.LC-MS 6.LC - DAD 7. Apigenina. I-Título.

615.321

CDD: 22.ed. :

FOLHA DE APROVAÇÃO

JEANE FRANCISCA ALVES RIBEIRO

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA BIOMONITORADA DA TINTURA 70% DE
Arrabidaea chica (Humb. & Bompl.) Verlot

Trabalho apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas área de concentração: Fármacos E Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde Como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: ____/____/____

Conceito: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. WAGNER LUIZ RAMOS BARBOSA/ UFPA
Orientador

Prof. Dr. JOSÉ OTÁVIO CARRÉRA SILVA JÚNIOR/ UFPA

Prof. Dr. VALDIR FLORENCIO DA VEIGA JUNIOR/UFAM

Dedico este trabalho a todos aqueles que sempre acreditaram na minha vontade de vencer, mesmo diante dos mais temíveis obstáculos. E estes, com muito amor, carinho, companheirismo e amizade só me fizeram crescer e aprender que é preciso lutar para vencer, e que, nesse meio tempo o sofrer é apenas uma barreira a ser transposta, pois a melhor escola que podemos estudar é a escola da vida, que nos forma o caráter e personalidade.

Dentre as pessoas mais importantes nessa minha caminhada está Deus; meus pais; meus irmãos, Dariane e Jarbas (em memória); primos que sempre foram como irmãos, Aleandra e Rafael e a todos os outros familiares; Ao meu orientador Prof. Dr. Wagner Barbosa; aos amigos que acompanharam mais esta etapa Alessandra Machado, Alessandra Nascimento, Andressa Santa Brigida, Andreia Alves, Fabiana Nunes, Luana Lorena, Fernanda Lima, Luciana Queiroz, Luiz Mário, Patrick Cruz, tayssa entre outros.

Agradeço também à CAPES e à UFPA, pelo estrutura oferecida e o incentivo financeiro nesses dois anos inclusive a oportunidade do intercambio em Maringá - PR e Ribeirão Preto – SP.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pois ele o responsável pelo meu existir e nele eu sempre confiarei.

Agradeço em especial a minha família pelo amor e apoio incondicional, além da superação da distancia, da saudade e por sempre acreditarem em meu potencial de chegar cada vez mais longe.

Ao meu orientador prof. Dr. Wagner Barbosa, pela orientação, paciência e dedicação incondicional para a realização deste trabalho.

Ao farmacêutico Sr. Jailton Nascimento, por todo o suporte técnico dentro e fora do laboratório de fitoquímica. Aos colegas de laboratório pelo companheirismo e ajuda em todas as horas.

Aos professores e funcionários do PPGCF\UFPA, pelo acolhimento e carisma.

Aos colegas de mestrado por fazerem parte da minha vida como fontes de inspiração, amizade e companheirismo que ultrapassam as barreiras dos portões da faculdade, o que muito ajuda nesta caminhada.

Aos professores José Maria vieira, Marta Chagas e Maurimélia juntamente com sua equipe de técnicos e estagiários do laboratório de microbiologia pela ajuda e paciência em minha estadia neste laboratório.

Ao professor Dr. João Carlos Palazo Melo e toda sua equipe no laboratório de farmacognosia da UEM – Maringá/PR, pela sua disponibilidade e paciência em minha estadia em seu laboratório.

Ao professor Dr. Norberto Pepporine Lopes e toda a sua equipe, em especial ao Sr. Tomaz por toda dedicação e ajuda em meus experimentos em seu laboratório.

A todos aqueles que direto ou indiretamente contribuem para a realização deste trabalho.

RESUMO

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA BIOMONITORADA DA TINTURA 70°GL DE *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) Verlot

A *Arrabidaea chica* (H&B) Verlot, popularmente conhecida como pariri ou crajirú. É um arbusto escandente de pequeno porte, aproximadamente 2,5 m de altura, que ocorre do sul do México até o Brasil central, sendo comum na Amazônia, onde é utilizada pelos índios para a pintura corporal. Popularmente o chá das folhas é indicado para inflamação, anemia, cólicas intestinais, regulação de menstruação, diarreia entre outros. Estudos recentes comprovam sua atividade antioxidante e cicatrizante *in vivo* e *in vitro*, além de atividade antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes* e do efeito tripanocida. O presente trabalho tem por objetivo contribuir para a validação da alegação de uso e para a padronização de forma de emprego da *A. chica* enquanto recurso fitoterápico, uma vez que a mesma encontra-se na RENISUS. Os extratos etanólico e aquoso da planta foram investigados quanto a seus metabolitos secundários. Foram determinados parâmetros para o controle de qualidade da droga vegetal, através de granulometria, perda pó dessecação e cinzas totais. Além da obtenção de perfis cromatográficos por CCD, CLV, LC-MS e LC - DAD. A planta encontra-se com seus parâmetros de controle de qualidade em conformidade com a literatura. Um perfil de CCD obtido com o eluente Hexano/Acetona/MeOH (67,5:27,5:5) e revelado com NP/PEG, revelou uma banda com $R_f=0,17$ com fluorescência amarela característico de flavonóides. No perfil de CLAE - DAD obteve-se cromatogramas com características de quinonas e flavonóides também. A partir destes resultados o trabalho foi direcionado para o isolamento, inicialmente com o fracionamento da FAE por CLV e a análise das frações resultantes por CLAE-DAD, e como resultado foi sugerido a presença de um flavonóide derivado do flavonol apigenina. Os resultados microbiológicos corroboram com alguns de seus usos populares contribuindo assim para a validação da forma de uso alegada da planta.

Palavras chaves: *Arrabidaea chica* (H&B) Verlot; RENISUS; CCD; CLV; LC-MS; LC - DAD; Apigenina.

ABSTRACT

Phytochemical biomonitoring 70°GL dye of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.)

Verlot

The *Arrabidaea chica* (H & B) Verlot, popularly known as Pariri or crajirú. Scandentia is a small shrub about 2.5 m high, occurring from southern Mexico to central Brazil, is common in the Amazon, where it is used by Indians for body painting. Popularly tea leaves is indicated for inflammation, anemia, intestinal cramps, regulate menstruation, diarrhea, among others. Recent studies have shown its antioxidant activity and wound healing in vivo and in vitro, and antifungal activity against Trichophyton mentagrophytes and trypanocidal effect. This paper aims to contribute to the validation of the claim of use and to standardize the form of employment *A. chica* herbal medicine as a resource, since it is in RENISUS. The ethanolic and aqueous extracts of the plant were investigated for their secondary metabolites. Parameters were determined for quality control of the plant drug, through grading, drying powder loss and total ash. Besides the chromatographic profiles obtained by TLC, CLV, LC-MS and LC - DAD. The plant meets the parameters of quality control in accordance with the literature. A CCD profile obtained with the eluent Hexane / Acetone / MeOH (67,5:27,5:5) and revealed with NP / PEG revealed a band with $R_f = 0.17$ with yellow fluorescence characteristic of flavonoids. In the profile of HPLC - DAD chromatograms were obtained with characteristics of quinones and flavonoids as well. From these results, the work was directed to the isolation, initially with the FAE by fractionation of CLV and analysis of resulting fractions by HPLC-DAD, and as a result suggested the presence of a flavonoid apigenin derivative of the flavonol. The microbiological results corroborate some of its popular uses thus contributing to validate the form of alleged use of the plant.

Keywords: *Arrabidaea chica* (H&B) Verlot; RENISUS; CCD;CLV; LC-MS, LC - DAD, Apigenin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA		PAGINA
Figura 1	<i>Arrabidaea chica</i> (Humb. & Bompl.) Verlot	22
Figura 2	Estrutura básica dos flavonóides	25
Figura 3	Determinação da distribuição granulométrica do pó de <i>A. chica</i>	46
Figura 4:	Cromatoplaça de CCD FH, FC e FAE de <i>A. chica</i> , eluente Hex\Acetona\MetOH 67,5:27,5:5	51
Figura 5	Cromatograma obtido por CLAE-DAD do EEB de <i>A. chica</i> no comprimento de onda de 330nm.	52
Figura 6	Espectro do pico registrado, por CLAE-DAD de <i>A. chica</i> a 330nm, com Rt de 8,67min e pureza de 0,9914., observa-se dois máximos de absorção um em 275,7 nm e outro em 324,7nm.	52
Figura 6a	Espectro do pico registrado, por CLAE-DAD de <i>EEB de A. chica</i> a 330nm, com Rt de 11,49 min observa-se dois máximos de absorção um em 268 nm e outro em 324.	53
Figura 6b	Espectro do pico registrado, por CLAE-DAD do EEB de <i>A. chica</i> a 330nm, com Rt de 15,07 min , observa-se dois máximos de absorção um em 266 nm e outro em 331nm.	53
Figura 7	Cromatograma obtido por CLAE-DAD do EEB de <i>A. chica</i> , registrado no comprimento de onda de 400nm. Com destaque para os picos no tempo de 37 a 54min, especialmente o pico do tempo de retenção de 50,64 min, indicado pela seta.	54
Figura 8:	Espectro do pico observado por CLAE-DAD DO EEB de <i>A. chica</i> em 400nm com (Rt) de 50,64 min e pureza de 0,9989. Com quatro máximos de absorção: 222,6; 278,2; 324,7 e 404,6.	55
Figura 9	Cromatograma da fração 8, onde se observa o pico de 12,35min.	60
Figura 10	Pico de 12,35min da Fr8, com pureza de 0.9977 e máximos em 227, 266 e 336nm.	60
Figura 11	Cromatograma HPLC-DAD de apigenina pura a 0,5mg/mL.	61
Figura12	Espectro da Apigenina pura	61

LISTA DE TABELAS

TABELA		PAGINA
Tabela 1	CLV da fração Acetato de étila de <i>A.chica</i>	42
Tabela 2	<i>Resultado da perda por dessecação e teor de cinzas totais</i>	46
Tabela 3	<i>Resultado da abordagem Fitoquímica.</i>	48
Tabela 4	<i>Abordagem fitoquímica das frações para flavonóides e quinonas.</i>	49
Tabela 5	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> do EEB de <i>Arrabidade chica</i> pelo método de disco-difusão.	50

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN : Acetonitrila

ANVISA: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CID: Código Internacional de Doenças

CLAE: Cromatografia liquida de alta eficiência

CLV: Cromatografia Liquida a Vácuo

DAD: Detector de arranjo diodo

DMSO: Dimetilsulfóxido

FAE: Fração acetato de etila

FC: Fração Clorofórmica

FH: Fração Hexanica

FM: Fração metanólica

FR: Fração residual

MeOH: Metanol

MS: Ministério da Saúde

RENAFITO: Relação Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápicos

RENISUS: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS

SUS: Sistema Único de Saúde

UV: ultravioleta

LC-DAD: Cromatografia liquida acoplada com detector de arranjo diodo

LC-MS: Cromatografia liquida acoplada com espectrômetro de massa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. POLITICAS NACIONAIS DE SAÚDE E RENISUS	17
1.2. ETNOFARMÁCIA	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. Família Bignoniácea	21
2.1.1. Aspectos Gerais	21
2.2. QUÍMICA DA FAMÍLIA BIGNONIACEAE	21
2.3. <i>Arrabidaea chica</i> (Humb. & Bompl.) Verlot	22
2.3.1. FARMACOLOGIA	23
2.3.2. QUÍMICA	24
2.4. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	25
2.4.1. Flavonoides	25
2.4.1.1. Antocianinas	27
2.4.2. Quinonas	29
3. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	30
3.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	31
3.2. CROMATOGRAFIA EM COLUNA	31
3.3. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	32
3.4. LC-DAD	32
3.5. LC-MS e LC-MS-MS	34
4. JUSTIFICATIVA	35
5. OBJETIVOS	36
5.1. OBJETIVO GERAL	36
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
6. MATERIAL E MÉTODOS:	37
6.1. MATERIAIS:	37
6.1.1. Matéria Prima Vegetal:	37
6.1.2. Solventes e Reagentes:	37
6.1.3. Equipamentos:	38
6.2. MÉTODOS	38
6.2.1. Processamento da amostra	38
6.2.3. Determinação da granulometria do pó	39
6.2.4. Determinação de cinzas totais	39
6.2.5. Determinação de perda por dessecação	39
6.2.6. Obtenção da tintura de <i>Arrabidaea chica</i> (Humb. & Bompl.) B. Verlot:	39
6.2.7. Determinação do pH da tintura	40
6.2.8. Concentração e secagem da tintura	40
6.2.9. Obtenção do extrato aquoso	40
6.2.10. Abordagem Fitoquímica	40
6.2.10. Fracionamento do extrato seco	41
6.2.13. Análises cromatográficas	41

6.2.13.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)	41
6.2.13.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	41
6.2.13.3. Análise por LC-MS	42
6.2.13.4. Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV)	42
6.2.14. Avaliação microbiológica	44
6.3.14.1. Meios de cultura	44
6.3.14.2. Microorganismos	44
6.3.14.3. Preparação dos extratos e frações para os testes microbiológicos	44
6.3.14.4. Controles	45
6.3.14.5. Ensaio antimicrobiano <i>in vitro</i>	45
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO:	47
7.1. Processamento da amostra	47
7.2. Determinação da distribuição granulométrica do pó:	48
7.3. Determinação de perda por dessecação	49
7.4. Determinação de cinzas totais	49
7.5. Obtenção da tintura de <i>Arrabidaea chica</i> (Humb. & Bompl.) Verl	49
7.6. Obtenção do Extrato Etanólico Seco - EEB	49
7.7. Obtenção do Extrato Aquoso Bruto - EAB	49
7.8. Abordagem Fitoquímica de EEB; EAB e frações	51
7.9. Fracionamento do extrato seco	51
7.10. Determinação do perfil cromatográfico	51
7.10.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	52
7.10.2. Cromatografia Líquida de Alta Pressão – CLAE	56
7.10.3. LC-MS	60
7.10.4. Cromatografia Líquida a Vácuo	61
7.10.5. Avaliação microbiológica	62
8. CONCLUSÃO	63
9. REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

O tratamento, cura ou prevenção de doença mediante o uso de plantas, é uma prática já realizada desde os mais longínquos tempos, quando nossos ancestrais, na procura de alimentos para sua sobrevivência, acabaram por descobrir as plantas medicinais, e desde então, estas foram empiricamente usadas para ao tratamento de patologias (WAGNER; WIESENAUER, 2006).

Há registro de diversos procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais, ao longo dos tempos. Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua grande utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA JUNIOR, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) (2000) define plantas medicinais como: “aquelas que têm uma história de uso tradicional como agente terapêutico”. Relatando que mais da metade dos habitantes do planeta, especialmente dos países pobres e em desenvolvimento, fazem uso de algum tipo de erva na busca de alívio de sintomatologias dolorosas ou desagradáveis, e que desse total pelo menos 30% dão-se por indicação médica.

As plantas medicinais têm despertado interesse crescente na indústria farmacêutica, pois representam uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos (WALL; WANI, 1996). Com o desenvolvimento da tecnologia aliado ao interesse em se confirmar o conhecimento em medicina popular, as plantas medicinais têm tido seu valor terapêutico pesquisado mais intensamente pela ciência (ARNOUS, 2005; ANGRA, 2007).

Porém, uma das principais limitações até agora relacionadas com a questão dos produtos naturais como fonte de novos fármacos é a complexidade do processo de avaliação, pois são misturas biológicas complexas de difícil caracterização. Além

dos constituintes das plantas medicinais podem variar de acordo com fatores genéticos, clima, qualidade do solo e outros fatores externos (BRITO, 1999).

O desenvolvimento de fitoterápicos inclui várias etapas e envolve um processo interdisciplinar, multidisciplinar e muitas vezes interinstitucional. As áreas de conhecimento envolvidas vão desde a antropologia, botânica, ecologia, química, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, biotecnologia, química orgânica até a tecnologia farmacêutica (TOLEDO, 2003). O ponto de partida pode ser um levantamento bibliográfico na literatura científica e popular enfocando a droga vegetal e suas propriedades químicas e farmacológicas. O estudo fitoquímico-biológico de plantas medicinais proporciona compostos bioativos que além de seu potencial como nova droga são necessários como marcadores químicos para padronização de extratos a serem avaliados quanto à eficácia e segurança no desenvolvimento de fitomedicamentos (FTM) (GIBBONS, 2003).

Em países industrializados, dados mostram que o uso das plantas medicinais constitui cerca de 20% do total de prescrições médicas, sendo que em países emergentes esse número atinge 80%. Diante desse quadro, diversos alertas têm surgido na literatura, científica e leiga, no sentido de incentivar a comunidade médica à utilização de fitoterápicos como uma possibilidade real de tratamento. Ponderando sempre sobre a dosagem, forma de dispensação, os efeitos benéficos, os potenciais efeitos tóxicos e as interações medicamentosas, a fim de assegurar o uso racional dos mesmos (BRUNETON, 1991 e RODRIGUES, 2006).

Sabe-se que a intervenção humana em habitat que antes eram estáveis gera grandes perdas de biodiversidade. Biomas estão sendo ocupados em diferentes escalas e velocidades. No Brasil temos áreas extensas de vegetações nativas devastadas como no Cerrado do Brasil Central, na Caatinga e na Mata Atlântica. É necessário que sejam conhecidos os estoques dos vários habitat naturais e dos modificados existentes no Brasil, de forma a desenvolver uma abordagem equilibrada entre conservação e utilização sustentável da diversidade biológica, considerando o modo de vida das populações locais (BRASIL, 2009). Isso é importante, especialmente considerando que a maior parcela da população encontra

nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais, a principal fonte de recurso terapêutico (DI STASI, 1996).

A flora brasileira é considerada uma das mais ricas do mundo, com mais de 56.000 espécies, representando cerca de 19% da flora mundial. O Brasil também é o país com a maior diversidade biológica do planeta, com alto índice de espécies endêmicas. Essa diversidade biológica é muito expressiva tanto em relação às potencialidades genéticas como em relação ao número de espécies e de ecossistemas (BRASIL, 1998). Considerando a biodiversidade vegetal, a Floresta Amazônica é detentora da maior reserva de plantas medicinais do mundo (FIEAM, 2002). Porém apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (SIMÕES, 2003)

De acordo com a legislação sanitária brasileira, Fitoterápico é o medicamento obtido empregando se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004a). No Brasil, o principal órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autarquia do Ministério da Saúde que tem como papel proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços e participando da construção de seu acesso avaliando-os quanto a sua segurança, eficácia e qualidade antes de serem exposta a venda para utilização pela população (Brasil, 1999). A regulamentação em vigor para o registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) Nº. 14, de 31 de março de 2010, que determina os aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade e identidade e provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas

De acordo com projeções do Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais (IBPM), o mercado de medicamentos fitoterápicos movimenta até 500 milhões de dólares por ano, somente no Brasil. Há uma estimativa que, no mundo seria gasto cerca de US\$27 bilhões (em torno de 7% do mercado mundial de medicamentos) com plantas

medicinais. O mercado farmacêutico tradicional cresce, mundialmente, de 3% a 4% ao ano, enquanto o de fitoterápicos sobe de 6% a 7% (PINHEIRO, 2011)

É importante salientar que a idéia primordial na indicação do uso de FTM na medicina humana é aumentar a opção terapêutica para os profissionais da saúde e não a substituição de medicamentos registrados e já comercializados, FTM registrados, com espectro de ação adequado e com indicações terapêuticas definidas, conta com a segurança de um medicamento padronizado e com eficácia garantida (KLEIN et al, 2010).

2.4. POLITICAS NACIONAIS DE SAÚDE E RENISUS

A partir da criação do Sistema Único de Saúde (SUS), o uso da fitoterapia passou a ser defendido com mais ênfase por profissionais dos serviços de saúde, pelos seus usuários, por pesquisadores e por gestores (BRASIL, 2006). Apesar de o primeiro passo ter sido dado antes mesmo da criação do SUS com a Resolução nº 04/88 da CIPLAN que disciplinou o uso da Fitoterapia nos serviços de saúde (BRASIL, 1988), esse movimento se intensificou neste sentido até que no ano de 2006 o Ministério da Saúde juntamente com outros ministérios propôs a PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares – visando à inclusão da Fitoterapia e de outras terapêuticas integrativas e complementares no SUS, regulamentada pela portaria 971, em 03 de maio de 2006, (BRASIL, 2006b).

No intuito de consolidar a utilização da Fitoterapia no SUS, posteriormente, também foi instituída a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que traz as diretrizes para viabilizar o acesso da população a plantas medicinais e fitoterápicos e a produção e oferta destes; a política trata ainda da inclusão social e regional, do desenvolvimento industrial e tecnológico, da promoção da segurança alimentar e nutricional, além do uso sustentável da biodiversidade brasileira e da valorização e preservação do conhecimento tradicional associado às comunidades e povos tradicionais. (BRASIL, 2006a). Para concretizar a política foi lançado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que, em conformidade com as diretrizes e linhas prioritárias da Política Nacional, estabelece ações para os diversos parceiros, em torno de objetivos comuns voltados à garantia

do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país. O programa visa ampliar as opções terapêuticas e melhorar a atenção à saúde dos usuários do Sistema Único de Saúde; propõe ainda desenvolver tecnologias e inovar, assim como fortalecer as cadeias e os arranjos produtivos, para o uso sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde. (BRASIL, 2009b).

Em fevereiro de 2009, foi publicada a RENISUS que é a relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, e que traz uma lista de plantas medicinais com potencial de avançar nas cadeias produtivas para gerar produtos de interesse ao SUS (BRASIL, 2009). A finalidade da RENISUS é subsidiar o desenvolvimento de toda cadeia produtiva, inclusive nas ações que serão desenvolvidas também pelos outros ministérios participantes do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas, relacionadas à regulamentação, cultivo/manejo, produção, comercialização e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos. A RENISUS terá também a função de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da RENAFITO (Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico) e o desenvolvimento e inovação na área de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2009a).

Em 2005, a Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos, por meio do Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (DAF/SCTIE/MS) construiu em parceria com outros ministérios e, com a colaboração de consultores e pesquisadores, uma lista com espécies vegetais considerando as já utilizadas nos serviços de saúde estaduais e municipais, o conhecimento tradicional e popular e os estudos químicos e farmacológicos disponíveis. Esse documento subsidiou, em 2008, a construção da RENISUS (BRASIL, 2009).

Técnicos da ANVISA e do Ministério da Saúde (MS), profissionais de serviços e pesquisadores da área de plantas medicinais e fitoterápicos, vinculados à área da saúde, representando as diversas regiões brasileiras, fizeram uma pré-seleção das espécies vegetais, por região geográfica que referenciavam seu uso, por indicações de uso e de acordo com as categorias do Código Internacional de Doenças (CID-10). Essa parte inicial do trabalho foi realizada por técnicos da ANVISA. A partir desta pré-seleção foram excluídas espécies exóticas e as que constam da lista de

espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, do Ministério do Meio Ambiente (IN nº 6/2008), finalizando assim a RENISUS (BRASIL, 2009).

O Ministério da Saúde espera que os pesquisadores e o setor produtivo interajam para estudar as espécies e que os resultados alcançados gerem produtos de interesse para o SUS, pois só assim serão garantidos à população plantas medicinais e fitoterápicos com qualidade, segurança e eficácia, como também a promoção do uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Após estudos destas plantas, caso alguma(s) apresente toxicidade esta(s) poderá (ao) ser contra-indicadas(s) e excluídas da relação (BRASIL, 2009).

Na produção de fitomedicamentos o ponto de partida pode ser um levantamento bibliográfico na literatura científica e popular enfocando a droga vegetal e suas propriedades químicas e farmacológicas. Através do levantamento bibliográfico pode-se selecionar uma espécie por meio de pesquisa quimiotaxonômica (onde aspectos morfológicos associados a identificação de grupos botânicos podem indicar a presença de determinados grupos químicos que tenham atividade farmacológica) (TOLEDO et al, 2003).

2.3. ETNOFARMÁCIA

Segundo Heinrich (2001) a etnofarmácia é uma ciência interdisciplinar que estuda recursos farmacêuticos, levando em conta determinantes culturais que caracterizam o uso desses recursos em um determinado grupo humano. Neste contexto ele engloba: a etnobotânica, na identificação, classificação e categorização cognitiva do material natural do qual o remédio será produzido; a prática farmacêutica, na preparação das formas farmacêuticas; a etnofarmacologia, no legado atribuído efeitos desta preparação e a etnomedicina, sobre aspectos implícitos nesses usos.

Um importante instrumento da etnofarmácia é o chamado levantamento etnofarmacêutico, que se caracteriza pela prospecção de plantas medicinais utilizadas como recurso terapêutico pela população, quando realizada no âmbito das Ciências Farmacêuticas, combinando elementos da Assistência Farmacêutica com elementos da cultura popular e o conhecimento associado aos recursos naturais (BARBOSA, 1998). O foco desse levantamento inclui a preparação do remédio e a relação do usuário com ele, busca se ainda identificar problemas relacionados à utilização das plantas e orientar para o uso seguro e eficaz desses recursos terapêuticos (BARBOSA, 1997). Na última década, a consolidação da Assistência Farmacêutica tem possibilitado um permanente aperfeiçoamento dos conceitos e das estratégias de aplicação do método etnofarmacêutico (BARBOSA, 2004 e BARBOSA, 2005).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Bignoniaceae

2.1.1. Aspectos Gerais

A família Bignoniácea é constituída por cerca de 120 gêneros e 800 espécies, amplamente encontradas em regiões tropicais da América do sul e África (GENTRY, 1980). A família é dividida em sete tribos baseado em sua distribuição geográfica, hábito e, principalmente, morfologia do fruto, sendo elas Bignonieae, Coleeae, Crescentieae, Eccremocarpeae, Oroxyleae, Tourrettieae e Tecomeae (ZJHRA et al, 2004; FISHER et al, 2004). Sua distribuição é pantropical, com maior número de espécies nos Neotrópicos e poucas espécies na zona temperada. Para Gentry (1980), o centro de diversidade da família está no Brasil, onde ocorrem 56 gêneros e cerca de 338 espécies, incluindo muitos táxons endêmicos. As espécies da família Bignoniaceae são usados para vários propósitos, como a horticultura, a madeira, corantes e como medicamentos. Entre seus usos medicinais mais conhecidos temos: anticancer; antiinflamatório, antiviral, antimicrobiano e antimalarico (CHATTOPADHYAY & NAIK, 2007; GENTRY, 1992).

O gênero *Arrabidaea* ocorre do sul do México até o Brasil central, sendo a espécie. É o maior gênero da tribo Bignoniaceae, com aproximadamente 100 espécies. Sua taxonomia é complexa, pois muitas características do gênero *Arrabidaea* são compartilhadas com espécies de outros gêneros. É caracterizado pela inflorescência em panícula ou tirso multifloro, mas também podem ser encontradas espécies com racemos paucifloros. As flores têm corola rósea a roxa, raramente alva, mas nunca amarela. O gênero mais próximo morfologicamente é *Cuspidaria*, que se diferencia de *Arrabidaea* pelos lacínios do cálice, mais alongados. No entanto, são encontradas espécies de *Arrabidaea* que possuem cálice muito semelhante ao de *Cuspidaria*. Outros caracteres importantes para diferenciar os dois gêneros são as cápsulas, aladas nas margens em *Cuspidaria* e lisas em *Arrabidaea*, e os grãos de pólen, formando tétrades em *Cuspidaria* e isolados em mônades em *Arrabidaea* (SILVA e QUEIROZ, 2003). *A. chica* muito comum na Amazônia, onde as folhas desta são utilizadas pelos índios, devido à sua pigmentação vermelha ou marrom, como pintura para o corpo, servindo como

protetor solar e também repelente. Os bichos da seda alimentados com suas folhas produzem seda vermelha. Todas essas peculiaridades da planta despertaram desde o início do século XX interesse para estudos químicos que visam à determinação dos componentes presentes em sua tintura (CORRÊA, 1989; CHAPMAN et al, 1927).

2.1.2. QUÍMICA DA FAMÍLIA BIGNONIACEAE

Apesar do grande número de espécies e seu grande uso na medicina tradicional apenas a partir do final da última década do século XX os membros da família foram mais intensamente investigados quanto à sua composição química (VON POSER, 2000).

O Brasil é o principal centro de diversidade para a família Bignoniaceae com 56 gêneros e 338 espécies. Distribuídas entre as tribos Bignonieae, Crescentieae e Tecomeace (Gentry, 1992). Quimicamente, as plantas desta família são caracterizadas pela presença de flavonóides, terpenóides, quinonas, principalmente naftoquinonas e compostos aromáticos, tais como lignanas, cinamoil, benzoíla e derivados de acetofenona (WARASHINA et al. 2006).

Naftoquinonas ocorrem em muitas espécies da família e podem ser responsáveis por diferentes atividades biológicas, incluindo anticâncer, antiinflamatórias, antivirais, antimicrobianas, antifúngicas, antimalárica e antiparasitária. Flavonóides e terpenóides têm sido mostrados para divulgar um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo como inibidores do efeito citopático de diversos vírus (CHATTOPADHYAY & NAIK, 2007).

2.2. A Espécie *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) Verlot

2.2.1. Aspectos Gerais

A *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) Verlot. (Figura 1) é conhecida popularmente por crajirú, carajiru, crejeru, cajuru-piranga, piranga, capiranga, cipó cruz, cipó-pau entre outros. É um arbusto escandente de pequeno porte, cerca de

2,5 m de altura, com folhas compostas di ou trifoliadas, penaticomposta do tipo imparipenada e com filotaxia tipo oposta dística, é comum a presença de folhas modificadas, denominadas gravinhas, com folíolos oblongos lanceolados estreitos, de cor verde opaca, possui glabras em ambas as faces e flores campanuladas de cor róseo-lilacinas em pedúnculos terminais (CORRÊA, 1931; GENTRY, 1980), Como características marcantes desta espécie Phul et al (2006) determinou a presença de cristais no tecido parenquimático e a estruturação reticulada de parênquima e esclerênquima frente aos tecidos condutores do caule.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 1: *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) Verlot

Na medicina popular é utilizada como antiinflamatório, adstringente, na lavagem de feridas e úlceras assim como para cólicas intestinais, diarréias, anemias, infecções uterinas, hemorragias, herpes, impigens, micose e outras afecções na pele, antiacne, icterícia, cogumelo, verminose, amebíase e como diurético (CASTRO, 1989; CORRÊA, 1984; LORENZI E MATOS, 2002; BARBOSA, 2004).

2.2.2. FARMACOLOGIA da *Arrabidaea Chica* (H &B) Verlot

Estudos farmacológicos atestam que *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) Verlot possui as seguintes atividades: cicatrizante, através do estímulo de crescimento de

fibroblastos e síntese de colágeno *in vitro* e *in vivo* (JORGE, 2008); antioxidante (AMARAL et al, 2002); antifúngica para *Trichophyton mentagrophytes*, atividade tripanocida contra *Tripanosoma cruzi*, na concentração mínima de 3,125 mg/m, não sendo detectada qualquer toxicidade aguda relevante, em uma dose de até 1000 mg/kg (BARBOSA et al, 2008). A atividade contra *Trichophyton mentagrophytes*, também é relatada para outras espécies gêneros de Bignoniácea e foi atribuído à quinonas (ALI et al, 1998; SAÚDE-GUIMARÃES & FARIA, 2007). As frações hexânica, diclorometano e acetato de etila apresentaram grande potencial sequestrador de radicais livres, apresentando atividade antioxidante maior que o *Ginko biloba*, com destaque para a fração diclorometano que apresentou a melhor atividade dentre as frações utilizadas (AMARAL, et al 2002).

2.2.2. QUÍMICA da *Arrabidaea Chica* (H &B) verlot

O gênero *Arrabidaea*, pertencente à tribo Bignoniácea, uma grande classe de neotropicalianas morfológicamente diversa, contém cerca de 70 espécies, distribuídas desde o México até a Argentina.

Estudos fitoquímicos anteriores indicam que este gênero é uma fonte de C-glucosylxanthonas, fenilpropanóides, flavonóides, antocianidinas, alantoínas e triterpenos (PAULETTI, 2003 e LEITE, 2000).

Em estudos fitoquímicos de *A. chica* foi identificada a presença de antocianinas, antraquinonas, flavonoides, catequinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, esteroides, taninos, flavonóis, flavononóis e xantonas. Assim como foram isolados fitosteróis, flavononóis além do isolamento de flavonoides como: 4'-hidroxi-3,7-dimetoxiflavone; vicenina-2 e canferol (BARBOSA et al, 2008). Identificou-se a presença da luteolina por HPLC, RMN 1H e RMN 13C (AMARAL et al, 2002). Foi descrita a presença de pigmentos utilizados em cosméticos como: carajurona, carajurina (SCOGIN, 1980), e 3-deoxiantocianidina (ESTRELA, 1995; ZORN et al, 2001; DEVIA et al 2002). Foram isolados e identificados: a flavona 6,7,4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavona, denominada de carajuflavona, além de cinco 3-desoxiantocianidinas, entre elas a 6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5- metoxiflavilium e a 6,7,3'-

trihidroxi-5,40-dimetoxi-flavilium obtidas por fracionamento biomonitorado, utilizando o fator de transcrição NF-kB, e o pigmento carajurina (ZORN et al, 2001; DEVIA et al, 2002 e CHAPMAM et al, 1927). A presença dos minerais como Cu, Fe, Mn, e Zn, foram descrita por Magalhães (2009).

2.3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As substâncias ativas vegetais provêm na sua maioria, do metabolismo secundário. Em cada planta os compostos do metabolismo secundário são diferentes. Representando assim uma característica, uma impressão digital (“fingerprint”) química pertinente a cada planta. O padrão de substâncias ativas varia de acordo com a origem a época da colheita e condições de conservação. Por esta razão são necessários métodos analíticos padronizados para garantia de reprodutibilidade das ações farmacológicas e da eficácia. Estas substâncias englobam, em geral, 0,5 a 5% do peso total da droga (WAGNER e WIESENAUE, 2003).

E entre os principais metabólitos secundários ou substâncias vegetais ativas temos: Alcalóides, Glicosídeos Cardiotônicos, Saponinas, Flavonóides, Antraderivados, Cumarinas, Óleos Essenciais, Quinonas entre outros. A seguir serão apresentadas as principais características de metabólitos presente neste estudo.

2.3.1. FLAVONOIDES

Os flavonóides são conhecidos como pigmentos quase universais nos vegetais, pois são responsáveis pela coloração de flores, frutos e também das folhas (BRUNETON, 2001). Constituem uma importante e abundante classe de polifenóis, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides (SIMÕES, 2007).

São conhecidos até o momento mais de 8.000 diferentes flavonóides (PIETTA, 2000), estes estão presentes em briófitas, pteridófitos e abundantemente em angiospermas. Podem ser encontrados em diversas estruturas vegetais tais

como vacúolos (hidrossolúveis), epiderme das folhas, células epidérmicas de flores e na cutícula foliar, geralmente quando lipofílicos (BRUNETON, 2001).

Possuem uma estrutura básica (figura 2) constituída de 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, dois anéis benzênicos (A e B) ligados, por uma cadeia de três carbonos, a um anel pirano (C) os carbonos recebem numeração crescente em números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguido de ' o B. Os flavonóides de origem natural apresentam-se freqüentemente, oxigenados e um grande numero ocorre conjugado com açúcares. Esta forma, conjugada, também é conhecida como heterosídeo, podendo apresentar-se como O-heterosídeos quando a ligação se dá por intermédio de um átomo de oxigênio ou C-heterosídeos quando a ligação se dá diretamente a um átomo de carbono. A forma livre de açúcar, conhecida como genina ou aglicona também possui seus representantes dentre os compostos flavonoídicos (SIMÕES, 2007).

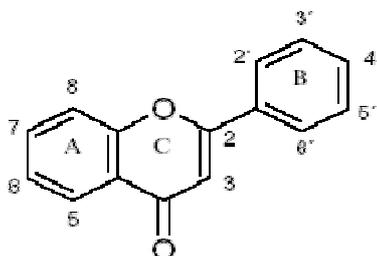


Figura 2. Estrutura básica dos flavonóides

Nas plantas os flavonóides desempenham inúmeras funções tais como: proteção dos vegetais contra a incidência de raios UV; contra fungos bactérias e vírus; atração de insetos com finalidade de polinização; antioxidantes; controle hormonal e inibição de enzimas. Nos seres humanos, diversas atividades farmacológicas podem ser desempenhadas por flavonoides dentre elas a ação anti-hipertensiva, antiinflamatória, antimicrobiana, antiviral, além de hepatoprotetor, antioxidante e antitumoral (SIMÕES, 2007; BEHLING, 2004,).

Os flavonoides são divididos em subclasses que se diferenciam quimicamente pelo nível de oxidação e posição dos substituintes. Nesta divisão as principais

classes são: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonóides (BRAVO, 1998 e DI CARLO, 1999).

2.3.1.1. ANTOCIANINAS

Antociano é um termo designado aos metabólitos responsáveis pela coloração nas plantas, são hidrossolúveis e definem geralmente as cores rosa, laranja, escarlate, vermelho, violeta e azul. Estão presente geralmente nas pétalas de flores e frutos, podendo ocorrer ocasionalmente nas brácteas, folhas, pecíolos, raízes ou em bulbos. Em geral se acumulam, em solução, nos vacúolos dos tecidos epidérmicos, raramente como antociânoplastos (BRUNETON, 2001; SIMOES et al, 2007).

Os antocianos estão presentes em quase todas as Angiospermas, exceto uma grande parte das plantas pertencentes à ordem das *Caryophyllales*, sendo rara sua presença em Gymnospermas. Devido às suas cores vivas, que atraem insetos e pássaros, possuem importante papel na polinização e dispersão de sementes (BRUNETON, 2001).

Em meio ácido os antocianos encontram-se na forma catiônica. Em sua maioria são hidroxilados no C-3, e frequentemente são penta (3, 5, 7, 3' e 4') ou hexa-substituídos (3, 5, 7, 3', 4'e 5) por hidroxilas e metoxilas. Não se conhece nenhum composto antocianídico cujas suas hidroxilas se encontrem totalmente metiladas ou glicosiladas, ao menos uma hidroxila seja C-5, C-7 ou C-4' deve estar livre para permitir a formação de estruturas quinonoidicas coloridas (SIMÕES et al, 2007).

As antocianidinas (forma livre) podem apresentar-se na forma mais estável de heterosídeos, chamados antocianosídeos. Os açúcares encontrados mais frequentemente são glicose, galactose, ramnose, arabinose e xilose. Esses sacarídeos estão localizados na maior parte dos casos na posição C-3 e C-5 do núcleo favílio (fenil-2-benzopirílio). Os antocianos e antocianidinas apresentam

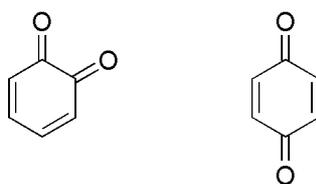
frequentemente substituintes acilas, sendo mais comuns os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos, como ácido cumárico, ácido caféico e ácido ferúlico. Os antocianos também podem fazer parte de grandes complexos coloridos com outros compostos e frequentemente diferentes metais (SIMÕES, 2007).

Os 3-desoxicianosideos conhecidos até o momento são escassos, porém relativamente estáveis. Diferente dos antocianosideos cuja hidroxila em C-3 (fator de instabilidade pelo íon flavílio) está sempre unida a um açúcar (geralmente glucose) para formar um antacianosideo estável e solúvel (BRUNETON, 2001).

Os antocianosideos são produtos do metabolismo geral dos flavonóides. Estudos genéticos demonstram experimentalmente que o 2,3-transdihidro-3 e o 4-cis-dihidroflavones são os percussores dos antocianinos. Todavia não foram elucidadas as últimas etapas de formação dos antocianosideos: é provável que os dióis sofram uma hidroxilação em C-2 e uma dupla desidratação. A glicosilação (que necessita da intervenção de UDP- glucose) sem dúvida é tardia. As antocianidinas apresentam ação antiinflamatória por inibição da liberação e síntese de substâncias endógenas, que promovem inflamação como histamina, protease e leucotrienos (AMELLA ET AL, 1985; BARUCH, 1984). O emprego clínico tem demonstrado eficácia na prevenção do edema pós-operatório da face (BARUCH, 1984). A ação anti-histaminica de pró-antocianidinas é medida pela inibição da enzima histidina-decarboxilase, que é responsável pela produção de histamina. Este efeito é aumentado pela capacidade das pró-antocianidinas de inibir a hialuronidase, enzima que facilita a liberação de histamina nos tecidos. Em função deste efeito as antocianidinas apresentam forte ação antialérgica. (AMELLA et al, 1985; PERARCE et al, 1984).

2.3.2. QUINONAS

Quinonas são compostos orgânicos que podem ser considerados como produtos da oxidação de fenóis (da mesma forma, a redução de quinonas pode originar os correspondentes fenóis). A principal característica desta classe de metabólitos é a presença de dois grupos carbonílicos que formam sistemas conjugados com pelo menos duas ligações duplas C=C (FALKENBERG, 2007).



orto- e para-quinona
Fonte: en.wikipedia.org

A nomenclatura de quinonas é definida pelo esqueleto do anel aromático, estabelecendo-se as posições dos dois grupos carbonílicos na molécula (orto ou para) acrescentando-se o sufixo quinona. Em função do tipo de ciclo no qual o sistema de ligações duplas e cetonas conjugadas estão inseridos, têm-se os três principais grupos de quinonas, nos quais se enquadra a maioria dos compostos conhecidos atualmente: benzo-, nafto- e antraquinonas. Na natureza também ocorrem quinonas terpênicas e policíclicas de estrutura mais complexas, como as diterpenoquinonas e os pigmentos policíclicos relacionados com a hipericina, encontrada em Hypericaceae (FALKENBERG, 2007).

Plantas contendo quinonas são utilizadas, desde as mais longínquas gerações, para tratar diversas enfermidades ou como corantes. Geralmente são descritas por seu importante papel na defesa da planta contra insetos e outros patógenos, além de atividade alelopática (VAN DEN BERG & LABADIE, 1989). A utilização de plantas contendo quinonas para uso terapêutico é limitada devido aos seus efeitos tóxicos. Em seu uso popular a atividade laxante é a que se destaca, outras atividades como antiprotozoária, antibacteriana, antifúngica, antiviral e antitumoral também são relatadas (família Ebenaceae, Bignoniácea e Plubanginacea) (BINUTU et al, 1996; SEMPLE et al, 2001).

3. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a *fase móvel* e a *fase estacionária*. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (COLLINS, 1993 e LOUGH & WAINER, 1995).

O termo cromatografia foi primeiramente empregado em 1906 pelo botânico russo Michael Semionovich Tswett ao descrever suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas. Nesse estudo, a passagem de éter de petróleo (fase móvel) através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio (fase estacionária), à qual se adicionou o extrato, levou à separação dos componentes em zonas de cores distintas. A partir desta observação, criou-se o conceito cromatografia (grego: *chrom*= cor e *graphie* = escrita), podendo levar à errônea idéia de que o processo seja dependente da cor, sabendo-se hoje que mesmo substâncias incolores podem ser separadas (SHARAPIN, 2000)

Apesar desses estudos anteriores, a cromatografia foi mais bem estudada e aperfeiçoada apenas após a década de 30 e em conjunto com os avanços tecnológicos, levaram-na a um elevado grau de sofisticação, o qual resultou no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas. A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura (COLLINS, 1993 e LOUGH & WAINER, 1995).

As diferentes formas de cromatografia podem ser classificadas considerando-se diversos critérios, como: forma física do sistema cromatográfico (coluna ou planar em papel ou camada delgada), fase móvel empregada (gasosa, líquida e supercrítica), fase estacionária (sólidas, líquidas e quimicamente ligadas) e modo de

separação (adsorção, partição, troca iônica, exclusão ou misturas desses) (DEGANI, 1998). As técnicas cromatográficas utilizadas no presente trabalho estão descritas a seguir.

3.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A CCD consiste na separação dos componentes de uma mistura (solução) por migração diferencial sobre uma camada fina de adsorvente inerte (sílica, alumina, etc.), retido sobre uma superfície plana, que pode ser uma placa de vidro ou alumínio ou material plástico. Sendo a placa colocada verticalmente dentro de uma câmara, contendo o eluente adequado que está saturada com o vapor próprio eluente, ficando o local de aplicação da amostra acima da superfície do eluente. Então, o eluente vai migrar por capilaridade sobre a placa cromatográfica, separando por migração diferenciada os diversos componentes da mistura. Após o desenvolvimento, o eluente é evaporado e a cromatoplaca, analisada sob luz UV e/ou visível, ou ainda aplicando-se reagentes que fornecem reações de cor com as substâncias contidas na mistura analisada (ROCHA, 2000; LOPES, 2007).

Dentre as vantagens oferecidas por essa técnica, e que favorecem a sua utilização, estão o seu baixo custo, a fácil compreensão de execução, a versatilidade, a rapidez na obtenção de resultados, a grande repetitividade, a economia de amostra e solvente e ainda permite a análise de diversas amostras em uma mesma cromatoplaca (ROCHA, 2000).

3.2. CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Esta técnica é muito utilizada para isolamento de produtos naturais e purificação de produtos de reações químicas. As fases estacionárias mais utilizadas são sílica e alumina, entretanto estes adsorventes podem servir simplesmente como suporte para uma fase estacionária líquida. Esses suportes são acondicionados em tubos cilíndricos geralmente de vidro, de diâmetros variados, os quais possuem uma torneira em sua extremidade inferior (DEGANI, 1998).

Os adsorventes possuem partículas na faixa de 60-230 mesh, de modo a possibilitar um fluxo razoável do solvente através da coluna. A principal etapa ao se utilizar essa técnica é o empacotamento, o qual, entre outros fatores, definirá a eficiência da separação. Enquanto a alumina é empacotada em sua forma original, a sílica deve sê-lo na forma de suspensão (COLLINS, 1993).

À coluna adiciona-se uma pequena quantidade de solvente e deposita-se na sua extremidade inferior um chumaço de algodão com espessura de aproximadamente 0,5 cm para impedir a passagem de partículas da fase estacionária. A adição de sílica deve ser feita com a torneira semi-aberta. O adsorvente é adicionado lentamente à coluna fixada na posição vertical. Nunca se deve permitir que o nível do solvente desça abaixo do nível do adsorvente, o que pode comprometer a eficiência da coluna. A eluição é promovida pela ação da gravidade e as frações individuais das amostras coletadas na extremidade inferior da coluna manualmente ou através de um coletor de frações (COLLINS, 2007 e COLLINS, 1993).

3.3. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica cromatográfica moderna, sendo o primeiro aparelho para tal construído em 1975, possui várias denominações como cromatografia líquida de alta velocidade, alta pressão, alto desempenho e alta eficiência (mais empregado em português). É hoje um importante membro das técnicas de separação, especialmente pela sua capacidade de misturas complexas com presença de compostos similares (ROCHA, 2000 e LOPES, 2007).

A utilização de suporte com partículas diminuídas, em sua fase estacionária faz necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, devido a sua baixa permeabilidade. A instrumentação básica para esta modalidade de cromatografia consiste de reservatório de solvente, bomba, injetor, coluna, detector e registrador.

CLAE é uma técnica eficiente, capaz de possibilitar análises em poucos minutos, com alta resolução, eficiência, sensibilidade e reprodutibilidade, além de não depender de volatilidade ou estabilidade térmica das substâncias. Entretanto tem desvantagens, como o alto custo de instrumentação e de operação, difícil análise qualitativa, falta de detector sensível universal e a necessidade de experiência em seu manuseio (COLLINS, 1990).

O detector é o componente mais caro e sofisticado do sistema cromatográfico, ele mede de forma contínua propriedades físicas ou físico-químicas, enviando sinais para o registrador. Ele pode ser universal ou seletivo, segundo sua capacidade de trabalhar com todos os tipos de amostra ou com uma classe ou tipo de substância requerida, respectivamente. Atualmente, a maioria dos detectores não apresenta todas as opções desejadas, requerendo uma melhor instrumentação em relação a estes. Contudo raramente o emprego da CLAE é comprometido por causa do detector (COLLINS, 1990).

A utilização de técnicas hifenadas, ou seja, acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas, com objetivo de obter uma ferramenta analítica mais rápida e eficiente, promoveu um grande avanço tecnológico para a detecção de substância por CLAE. Destacando-se os sistemas acoplados com técnicas espectrométricas como: CLAE-DAD (detector de arranjo diodo) ou LC-DAD e CLAE-MS ou LC-MS (espectrômetro de massa), que serão utilizados no presente trabalho, além de CLAE-RMN (RODRIGUES, 2006).

3.3.1. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODO (CLAE-DAD)

CLAE-DAD

A cromatografia líquida com o detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD ou LC-DAD) é uma técnica amplamente utilizada na análise de produtos naturais desde que o analito apresente grupos cromóforos que propiciem a absorção de luz na região de UV-visível. É uma técnica muito aplicada no controle de qualidade de produtos de origem vegetal; porém, sua utilização na identificação estrutural de compostos é limitada, pois o LC-DAD fornece apenas o espectro UV-Vis de cada

substância, o que não é suficiente para a caracterização da estrutura completa, pois vários compostos de um mesmo grupo químico apresentam espectros similares, impossibilitando sua distinção. As informações obtidas com esta técnica são complementares a outras técnicas hífenadas em cromatografia líquida como: LC-MS, LC-NMR. Um exemplo desta aplicação é análise de compostos fenólicos utilizando-se LC-DAD-MS (HE, 2000).

3.3.2. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS e LC-MS-MS)

Dentre os acoplamentos, o LC-MS é muito mais seletivo e, em certas circunstâncias, mais sensível que o LC-DAD. Já a identificação de compostos é mais difícil e nem sempre é viável, por causa da menor resolução cromatográfica (em comparação com Cromatografia Gasosa) e a possível coeluição de compostos. Uma dificuldade encontrada para acoplamento da LC com o MS era a manutenção do vácuo no detector de massas, o que foi resolvido em parte pela introdução da fase móvel de HPLC na forma de “spray” dentro da fonte de íons do MS, onde apenas uma pequena fração do solvente entra no analisador de massas (LEVSEN, 2000).

O principal problema do uso da LC-MS na química de produtos naturais é a ionização de uma grande variedade de compostos existentes no extrato bruto. Embora existam vários tipos de interfaces disponíveis no mercado, nenhuma delas permite a detecção universal de todos os constituintes da matriz vegetal. Cada interface tem suas próprias características e sua faixa de aplicação (WOLFENDER, 1998).

Inicialmente a LC-MS foi desenvolvida para aplicação na confirmação da identidade de compostos, mas sua precisão é suficientemente alta para permitir a quantificação de analitos por calibração interna e externa. O desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica, tais como a ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a ionização por eletronebulização ou eletrospray (ESI) tornaram a técnica de LC-MS aplicável para uma grande variedade de matrizes. Mais recentemente a disponibilidade do equipamento com fotoionização (APPI) conferiu universalidade à técnica de LC-MS, permitindo a análise de compostos com baixa massa molecular até proteínas (PEREIRA, 2005).

4. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a dificuldade da população, em especial a de baixa renda, em realizar seus tratamentos medicamentosos devido ao alto custo dos produtos, coloca-se então, a possibilidade de atendê-la com recursos de custo mais acessíveis, aqui surgem os fitoterápicos como uma alternativa para atender a esta necessidade. Para isto é necessária uma investigação mais detalhada das plantas medicinais, analisando sua composição química e suas aplicações ou efeitos farmacológicos, para então validar e padronizar uma metodologia, visando o desenvolvimento e produção de fitoterápicos com qualidade, eficácia e baixo custo, garantindo um tratamento seguro e menos oneroso aos serviços públicos de saúde e a toda a população.

Ao longo dos últimos anos, as ocorrências de infecções fúngicas humanas vêm apresentando um expressivo aumento, sendo as dermatomicoses as principais infecções responsáveis por esse aumento. O tratamento de micose nem sempre é efetivo devido aos fármacos que estão disponíveis atualmente causarem resistência, recorrência ou até mesmo toxicidade. Por estes motivos, há uma busca contínua de novos fármacos antifúngicos mais potentes e seguros (SIDRIM ET al., 1999; FENNER et al., 2006). A *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) B. Verlot, devido sua utilização empírica e estudos realizados com a mesma, tem se mostrado uma forte candidata a utilização antifúngica para micoses superficiais (BARBOSA, 2008). A presença desta espécie na RENISUS desperta o interesse para seu estudo, carecendo de verificação da atividade antifúngica alegada e da padronização da forma farmacêutica empregada, para garantir a produção de um fitoterápico com qualidade, segurança e eficácia.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Contribuir para a validação da alegação de uso e para a padronização da forma de emprego da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) Verl enquanto recurso fitoterápico.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção e caracterização físico-química do pó e da tintura de *Arrabidea chica* Verlot;
- Obtenção dos perfis cromatográficos de extratos e frações obtidos da espécie em estudo, utilizando de Cromatografia em Camada Delgada – CCD, para fins de fracionamento;
- Caracterização da ação contra fungos dermatófitos no extrato bruto e nas frações obtidas;
- Caracterizar uma ou mais substâncias que apresentem atividade, por bioautografia, que sirva(m) como marcadora(s) para fins de padronização da forma de uso.

6. MATERIAL E MÉTODOS:

6.1. MATERIAIS:

6.1.1. Matéria Prima Vegetal:

Foram adquiridos 8 kg de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) B. Verl fresca, através da associação Ver-as-Ervas, Belém, PA. O material foi coletado na região metropolitana de Belém. Uma exsicata da planta foi preparada e caracterizada por comparação com a de numero de registro MG 123919 depositada no herbário do Museu Paraense Emilio Goeldi

6.1.2. Solventes e Reagentes:

Acetona; acetato de etila; acetonitrila (ACN); ácido acético glacial; ácido clorídrico; ácido fórmico anidro; ácido fórmico 88%; ácido sulfúrico p.a; ácido trifluoroacético; álcool 70%; anidrido acético; butanol; clorofórmio; éter de petróleo; éter etílico; formaldeído a 4%; H₂O₂ 30 volume; metanol; HCl concentrado; tolueno; hexano, todos grau p.a. Iugol; H₂O destilada e ultra-pura; Na₂CO₃ a 25%; NH₄OH 6N; o-dinitrobenzeno a 5%; raspas de magnésio; reativo de Bouchardat; reativo de Dragendorff; reativo de Fehling A e B; reativo de Kedde; reativo de Mayer; reativo de Pascová; solução alcoólica de cloridrato de hidroxilamina; solução alcoólica de FeCl₃; solução aquosa de niidrina; solução de FeCl₃ a 1%; solução aquosa de vanilina 1%; solução de nitroprussiato de sódio 5%; sol. metanólica de difenilborato de aminoetanol 1% (NP)- Fluka; solução. de polietilenoglicol-4000 5% (PEG)- VETEC[®] e tricloreto de antimônio.

6.1.3. Equipamentos:

Estufa BIOMATIC[®]; balança GEHAKA BK500; Mufla ENGRO[®] mod. 355I; alcoômetro de Gay Lussac; mufla SHIONARA[®] eletric; cromatógrafo a líquido LaChrom MERCK-HITACHI D-7000; cromatógrafo preparativo a liquido GILSON 305; Potenciômetro HANNA mod. Ph21.

6.2. MÉTODOS

6.2.1. Processamento da Amostra

Cerca de 8 kg da planta fresca foram adequadamente processados no laboratório de fitoquímica, faculdade de Farmácia - UFPA. Primeiro foram selecionadas as folhas que se encontravam intactas, sem resquício de contaminação, estas então foram lavadas com água para a retirada das sujidades, depois mergulhadas em álcool etílico para que seja estabilizado seu metabolismo e então dispostas em bancada sobre papel absorvente até que evaporasse toda a água e álcool da lavagem. Após esta etapa a planta foi seca em estufa de ar circulante a 40°C com monitoramento diário de uma alíquota da amostra, até peso constante. A secagem total do material vegetal ocorreu em oito dias, o qual em seguida foi triturado em moinho de facas, obtendo se então um pó que foi avaliado quanto à granulometria.

6.2.3. Determinação da Granulometria do Pó

A determinação da distribuição granulométrica foi realizada de acordo com o que preconiza a Farmacopéia Brasileira IV Ed (2010), onde 3g do pó são colocados em uma seqüência de tamises, em ordem decrescente de tamanho da malha, respectivamente, 10 (2 mm), 24(840 µm), 42(355 µm), 60(250 µm), 80(180 µm), 115 mesh (149 µm), além do frasco coletor. O tamisador foi acionado automaticamente por 20 minutos e a percentagem de pó retido em cada tamis classificou o pó quanto a sua granulometria. O teste foi realizado em triplicata.

6.2.4. Determinação de Cinzas Totais

A quantificação do resíduo não volátil do pó *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) B. Verlot foi realizada pela determinação do teor de cinzas totais, de acordo com o que preconiza a Farmacopéia Brasileira V ed. (2010). Para o teste, 3 cadinhos são calcinados em mufla, resfriados, pesados e a eles é adicionado cerca de 1g do pó de *Arrabidaea chica*. Em seguida as amostras são incineradas, em mufla, a 450°C, por 2 horas. Após esse período os recipientes são levados a um dessecador para esfriar sob pressão reduzida e, em seguida, pesados. Repete-se a operação até peso constante.

6.2.5. Determinação de Perda por Dessecação

A determinação do teor de água presente no pó foi realizada de acordo com o que preconiza a Farmacopéia Brasileira V ed. (2010). Realizou-se o método gravimétrico onde em pesa-filtros previamente tarados são adicionados cerca de 2,5g do pó de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) B. Verlot. Em seguida, os pesa-filtros são levados para a estufa a 105°C, onde permanecerão por 5 horas e, após esse período, os pesa-filtros são resfriados e pesados, repetindo-se o processo até a obtenção de peso constante.

Os resultados das três determinações foram avaliados em termos de porcentagem ponderal sobre a quantidade das amostras, utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ da perda} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \quad \text{equação (1)}$$

Legenda:

Pa = peso da amostra (g)

Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação(g)

Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação(g)

6.2.6.Obtenção da Tintura de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) B. Verlot:

O método escolhido para a obtenção da tintura foi a maceração, segundo descrito na Farmacopéia Brasileira IV edição e o líquido extrator escolhido foi o álcool etílico a 70%. Foi utilizado 1kg da droga (pó) extraído por maceração na proporção de 1:10 (p/v), utilizando se, portanto 10L do líquido extrator. A mistura permaneceu em maceração sob agitação diária com bastão de vidro, por oito dias. Após este a mistura foi filtrada obtendo-se a tintura de *Arrabidaea chica*.

6.2.7. Determinação do pH da Tintura

O pH da tintura foi aferido em potenciômetro de bancada após calibração com soluções tampões de pH 4 e 7 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

6.2.8. Concentração e Secagem da Tintura

Para a concentração da tintura foi utilizado um evaporador rotativo a baixa pressão, até a total evaporação do álcool. Para a retirada da água restante, uma parte foi concentrada com a adição de butanol, e a outra parte levada para liofilização. O resíduo do balão e o produto da liofilização, foram denominados de extrato etanólico bruto (EEB) e extrato etanólico bruto liofilizado respectivamente (EEB_L) de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) B. Verl.

6.2.8. Obtenção do Extrato Aquoso

Para a obtenção do extrato aquoso foi escolhido o método de decocção, devido o uso popular preconizar essa forma. A extração foi realizada segundo a Farmacopéia Brasileira I ed. (1929). Em um becker de vidro foram colocados 50g do pó da *A. chica* e água destilada q.s.p 1L (litro) em seguida levando-se a mistura a fervura em placa aquecedora por 15 min., apos o que a mistura foi filtrada a baixa pressão e depois congelada e liofilizada. O produto obtido após a liofilização foi denominado de extrato aquoso bruto (EAB) de *Arrabidaea chica* (H.B.K) Verlot.

6.2.9. Abordagem Fitoquímica:

Nesta etapa foram identificados metabólitos secundários presentes no extrato e nas frações de *A. chica* (Humb. & Bompl.) B. Verlot, por meio de testes químicos baseados em reações características (BARBOSA, 2001) para saponinas, açúcares redutores, polissacarídeos, proteínas e aminoácidos, fenóis e taninos, flavonoides, alcalóides, glicosídeos cardíacos, catequinas, derivados benzoquinonas, naftoquinonas, fenantraquinonas, sesquiterpenolactonas e outras lactonas, esteroides, triterpenoides e azulenos.

6.2.10. Fracionamento do extrato seco:

O fracionamento foi realizado por partição liquido-liquido onde, em um funil de decantação, o EEB_L (43g) foi suspenso em MeOH:H₂O (8:2) e submetido a partição

com solventes de polaridade crescente; hexano, clorofórmio e acetato de etila, respectivamente. Os solventes foram adicionados ao extrato em alíquotas de 200mL, cerca de 4 alíquotas para cada solvente . Após a evaporação dos solventes de cada fração obtiveram-se frações denominadas hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE), metanólica (FM) e residual (FR).

6.2.13. Análises Cromatográficas

6.2.13.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

Os extratos e as frações foram analisados por CCD sobre cromatoplasmas padronizadas (Merck®) com dimensões de 10 cm x 10 cm, tendo como fase estacionária gel de sílica de fase normal, ativadas a 105°C por 30 minutos ou sílica de fase reversa (RP). As amostras foram preparadas na concentração de 5 mg/mL para as frações e 10mg/mL para extrato bruto, dissolvido em MeOH/H₂O (9:1) e as frações em seus respectivos solventes. Estes foram aplicados sobre as placas com auxílio de um capilar, e em seguida eluídos com diversas combinações de solventes.

Foram utilizados acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/H₂O (100:11:11:26), butanol; ác. acético/H₂O (4:1:5) (WAGNER, 2001), hexano/acetona (75:25); hexano/acetato de etila (90:10); clorofórmio/acetona (97:3) entre outros.

6.2.13.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para esta análise, o EEB foi preparado na concentração de 10 mg/mL e as frações na concentração de 5 mg/mL, dissolvidos em metanol grau HPLC e posteriormente filtradas em filtro Millipore® 0,45 µm. Alíquotas de 20 µL do EEB e das frações foram injetadas no cromatógrafo, em análises distintas, a fim de definir os perfis da composição de cada amostra. Foi usada uma coluna LiChrospher® 100 HPLC Cartridge 250-3 com gel de sílica RP-18, como eluente H₂O (a pH 3 por adição de TFA)/ACN a 82:18 em t=0 min); 55:45 (em t=20 min); 0:100 (em t=50 min) e 82:18 (em t=60 min); a uma temperatura de forno de 26° (± 1°C) e com detecção a 254nm, 330nm; 400nm e 450nm, com monitoramento em 254nm.

6.2.13.3. Análise por LC-MS

Para injeção foi utilizada a amostra de EEB dissolvido em MeOH grau HPLC (J. T. BAKER.) na concentração de 5mg/mL. A análise foi realizada em aparelho Shimadzu HPLC LC-20A com detector de arranjo de diodos (CBM20A; Shimadzu), controlado pelo software CLASS-VP 6.14. Coluna ODS (C18) SHIMADZU - 4,6x250mm e fluxo de 1ml/min. Acoplado a um espectrômetro ultratof ESI-TOF Mass Spectrometer Burkert daltonics, para calibração interna uma solução de NA-TFA a 10mg/ml (TOF), modo de detecção positivo. Foi utilizado o gás Nitrogênio, a temperatura foi de 180°C, fluxo de 7 L/min e pressão 3 Bar. Os comprimentos de ondas foram de 250, 270, 330, 400 e 450.

A fase móvel constituiu de A: Solução aquosa de Ácido Acético 2% e B: MeCN, 88%-MeOH, 10%- Ácido Acético 2%. Com perfil de eluição A:B - 82:18 em t: 0min; 70:30 em t:20min; 55:45 em t:40min e 0:100 em 60min.

6.2.13.4. Cromatografia Líquida A Vácuo (CLV)

Para a CLV foi escolhida a fração acetato de étila (FAE), pois foi a fração que apresentou melhor perfil na CCD. Cerca de 3,217g da fração adsorvido em sílica gel 60 e submetida a cromatografia líquida à vácuo em coluna preenchida com sílica gel 60 para cromatografia em coluna (230-400mesh) com gradiente de polaridade crescente utilizando os solventes hexano/acetato de étila/ metanol (Hex: AcOEt:MeOH) nas seguintes proporções: 80:20:00; 75:35:00; 70:30:00; 55:35:10; 60:40:00; 55:45:00; 50:50:00; 50:45:5; 50:40:10; 50:25:25; 50:15:35; 50:5:45; 50:00:50; 40:00:60 e 00:20:80. As frações foram recolhidas em tubos de ensaios e as proporções de eluentes foram modificadas a cada observação de Constancia na cor das frações. Conforme tabela 1:

Tabela 1: CLV da fração Acetato de étila de *A.chica* usando Hexano(Hex)/Acetato de Etila (AcOEt) e Metanol(MeOH)

Hex: AcOEt:MeOH	Volume(mL)	Frações coletadas
80:20:0	300ml	1-14
75:35:0	800ml	15-61
70:30:0	500ml	62-73
55:35:10	200ml	74-84
60:40:00	800ml	85-109
55:45:00	200ml	110-124
50:50:0	100ml	125-137
50:45:5	800ml	138-169
50:40:10	200ml	170-189
50:25:25	200ml	181-191
50:15:35	1100ml	192-270
50:5:45	200ml	271-281
50:0:50	200ml	282-286
40:0:60	400ml	287-317
0:20:80	400ml	318-332

Legenda: Hex: hexano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol

As Frações foram analisadas por CCD utilizando com o eluente hexano: acetona: metanol (67,5:27,5:5) e observadas no UV e/ou reveladas com Anisaldeído. As frações que apresentaram perfis semelhantes foram reunidas, concentradas e pesadas. Em seguida foram analisadas por HPLC-DAD.

6.2.14. Avaliação microbiológica:

6.3.14.1. Meios de cultura

O meio Agar Mueller - Hinton (HIMEDIA M173) foi preparado conforme as instruções do fabricante. Em cada 38g do meio adicionou-se 1L de água destilada, sendo em seguida agitado vigorosamente até a completa dissolução, então vedado o erlenmeyer e levado para autoclave por 15min. Após a esterilização resfriou-se o meio que foi distribuído morno em placas de Petri descartáveis, na quantidade de 20mL por placa. Estas foram então armazenadas em geladeira até o momento do uso.

6.3.14.2. Microorganismos

Os microorganismos utilizados para as avaliações antimicrobianas foram das seguintes cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC) do estoque do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Bactérias Gram-Positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Streptococcus mitis* (ATCC 903), *Streptococcus sanguis* (ATCC 10557), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Enterococcus hirae* (ATCC 10541) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

Bactérias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Escherichia coli* (ATCC 25922)

Fungos leveduriformes: *Candida albicans* (ATCC 40175), *Candida krusei* (ATCC 40147) e *Candida parapsilosis* (ATCC 40038),

6.3.14.3. Preparação dos extratos e frações para os testes microbiológicos

Os extratos e as frações para a avaliação antimicrobiana foram dissolvidos em DMSO/H₂O (8:2), nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5 e 31,25mg/mL. Em discos de papel filtro, Qualy 12,50 com poros de 14µm (J.Prolab®), foram aplicados

10µL de cada amostra para posterior aplicação na placa com o meio adequado e, semeada com o microorganismo.

6.3.14.4. Controles

Como controle negativo utilizou-se DMSO: H₂O (8:2) e como controle positivo o Cloranfenicol (*E.coli*; *P. aeruginosas* e *S. aureus*) e Miconazol (*C. albicans*; *A. Níger*). Para a avaliação microbiológica 10µL dos controles foram aplicados em discos de papel filtro.

6.3.14.5. Ensaios antimicrobianos *in vitro*

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana foram realizados pelo método de difusão em agar em disco (BAUER *et al* 1966; CLSI, 2002; KARTAL *et al* 2003) com o seguinte procedimento: foram preparados inóculos do microorganismo a testar, tomando-se 4 colônias do isolado, mantidos em meio agar Muller-Hinton, Agar Sabouraud ou Agar Mueller-Hinton e diluídas em solução salina a 0,85 % até atingir a turbidez correspondente a 0,5 na escala de Mac-Farland (CLSI, 2003).

As placas contendo o meio Agar Mueller-Hinton foram semeadas com o suab estéril embebido com a suspensão de microorganismos. Em seguida foram aplicados os discos contendo os extratos e frações em suas concentrações previamente preparadas.

Cada placa semeada recebeu, então, um disco contendo o controle negativo, DMSO/H₂O 8:2, o controle positivo cloranfenicol e cinco concentrações diferente, dos extratos aquoso ou etanólico (500, 225, 62,5 e 31,25mg/mL), para todos os microorganismos. As frações foram testadas para os fungos, *Trichophyton rubrum*; *Malassezia sp*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureu*; *Streptococcus mitis*; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus sanguis*; *Enterococcus faecalis*; *Enterococcus hirae*; *Bacillus subtilis*; *Candida albicans*; *Candida krusei*; *Candida parapsilosis*. A semeadura dos fungos foi semelhante à dos microorganismos anteriores, porém em cada placa foi adicionado controle negativo (DMSO/H₂O 8:2), controle positivo (cloranfenicol) e todas as frações (FH; FAE; FC e

FM) na mesma placa na única concentração de 500mg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Processamento da Amostra

Oito quilogramas de folhas frescas de *A. chica*, após lavagem, secagem e trituração resultaram em 1.250g de pó, representando um rendimento de 15,63% do pó em relação à planta fresca.

7.2. Determinação da Distribuição Granulométrica do Pó:

De acordo com o que preconiza a Farmacopéia Brasileira IV ed.(1988), o pó da *A. chica* foi classificado como pó grosso, pois com o cálculo do percentual médio retido em cada tamis após as três determinações, observa-se que o pó passou em sua totalidade pelo tamis de abertura nominal de 1,70mm (10 mesh), e ficou retido menos de 40% no tamis de 355nm (42 mesh), conforme ilustrado no gráfico abaixo (Figura 3).

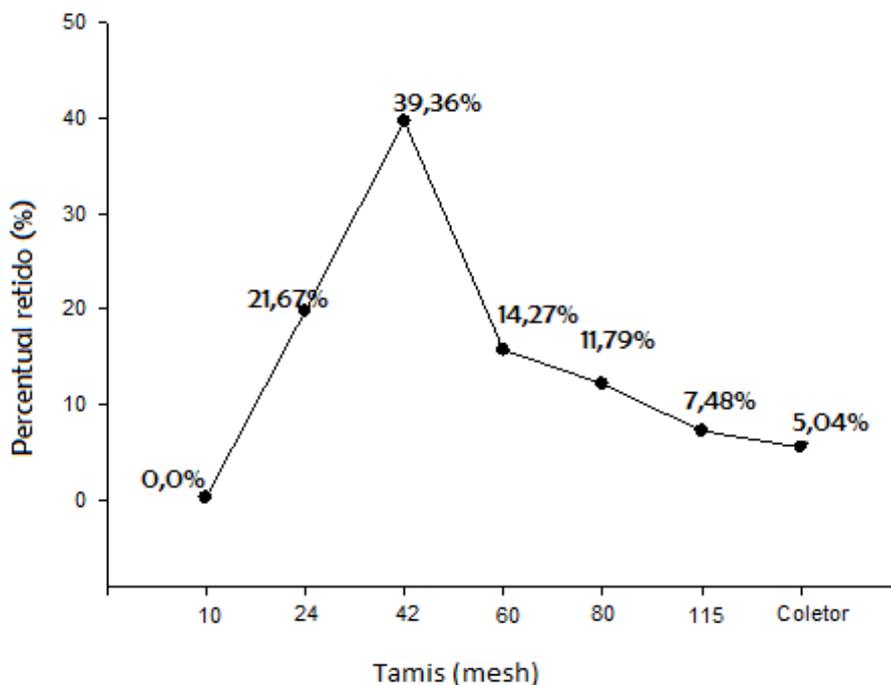


Figura 3: Determinação da distribuição granulométrica do pó de *A. chica*

A pulverização da matéria prima é uma importante etapa na produção de medicamentos fitoterápicos, uma vez que o produto pulverizado representa na maioria das vezes o insumo indispensável para obtenção de preparações

intermediárias. A determinação granulométrica é um importante parâmetro para a caracterização e controle de qualidade da droga. O grau de pulverização da droga determina o rendimento do processo extrativo, quanto aos constituintes químicos de interesse na droga (SILVA JÚNIOR, 2006).

A determinação granulométrica mostra-se ainda como um importante método para a determinação do tamanho de partículas, onde o tamanho médio das partículas é definido aproximadamente ao tamanho do orifício do tamis em que ficou retida a maior parte do material (FOUST, 2000 E LACHMAN et al,2001). Influencia diretamente na eficiência da extração, haja vista que a estrutura tecidual das diversas partes de uma planta é heterogênea. Órgãos como as raízes e os caules possuem tecidos mais densos, enquanto que em folhas e flores os tecidos apresentam uma densidade menor. Assim, é desejável que a granulometria seja homogênea para que a penetração de solventes no material seja facilitada e consistente(Mello, 2000). Na droga em estudo o tamanho médio das partiuclus foi definido como sendo 355µm, uma vez que a maior parte do pó ficou retido no tamis de 42mesh.

7.4. Determinação de Perda por Dessecação

Os resultados das três determinações foram avaliados em termos de porcentagem ponderal sobre a quantidade da amostra utilizada, de acordo com a equação 1. Obtendo-se a média das três determinações o teor de água no pó da *A. chica* no valor de 11% (Tabela 2), que está de acordo com a especificação da Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988), onde este resultado pode variar de 8 a 14%.

Esta determinação é importante para a conservação da droga e conseqüentemente para o seu controle microbiológico, pois, um excesso de água na droga vegetal favorece o crescimento de agentes deletério tais como: enzimas, fungos e bactérias, podendo também levar à hidrólise de seus constituintes (OLIVEIRA, 1991 e SHARAPIN, 2000).

Tabela 2: Resultado da perda por dessecação e teor de cinzas totais

Teste	N	Determinações (%)
Perda por dessecação	3	11%

Teor de cinzas totais	3	7,63%
-----------------------	---	-------

7.5. Obtenção da Tintura de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) Verl

Após a maceração de 1kg da droga por oito dias em 10L de álcool 70% , a mistura foi filtrada resultando em 8L de tintura de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) Verl.

7.4. Determinação de Cinzas Totais

A determinação de cinzas totais destina-se a estabelecer a quantidade de substâncias residuais não voláteis no processo de incineração especificado. As cinzas totais incluem as derivadas de tecido vegetal (cinzas fisiológicas) e de material estranho especialmente areia e terra aderente à superfície da droga (cinzas não fisiológicas). O valor obtido a partir da média das três determinações do pó de *A. chica* foi de 7,63% (Tabela 3). Não há monografia da planta para a preconização de valor aceitável.

7.6. Obtenção do Extrato Etanólico Seco - EEB:

Partindo-se de 8L da tintura para a concentração em evaporador rotativo a baixa pressão, seguido de liofilização, foram obtidos 177, 871g de extrato bruto. Um rendimento de 17,79% em relação droga vegetal seca (pó) e 2,22% em relação à planta fresca.

7.7. Obtenção do Extrato Aquoso Bruto - EAB:

Após a concentração e liofilização de 800 mL do decocto obteve-se 10,930g de EAB. Um rendimento de 21,86% em relação à droga (pó).

7.8. Abordagem Fitoquímica de EEB; EAB e frações:

Na abordagem fitoquímica do EEB e EAB revelou-se a presença semelhante de metabolitos secundários com destaque para a *presença proteínas e aminoácidos no decocto, pois estes não haviam sido encontrados no extrato etanólico bruto*, conforme tabela 3.

Tabela 3: Resultado da abordagem Fitoquímica.

TESTES	EEB	EAB
Saponina Espumídica	Positivo	Positivo
Ácidos Orgânicos	Positivo	Positivo
Açúcares Redutores	Positivo	Positivo
Polissacarídeos	Negativo	Negativo
Proteínas e aminoácidos	Negativo	Positivo
Fenóis e Taninos	Positivo	Positivo-fenóis e taninos catéquicos
Flavonoides	Positivo	Positivo
Glicosídeos Cardíacos		
Catequinas	Negativo	Negativo
Derivados Benzoquinonas; Naftoquinonas e Fenantroquinonas	Positivo	Positivo
Serquirterpenolactonas e outras lactonas	Negativo	-
Esteroides e Triterpenoides	Positivo	-
Azulenos	-	-
Carotenoides	Negativo	Negativo
Alcaloides	Positivo	Positivo
Purinas	positivo	
Depsídeos e depisidonas	Positivo	-
Derivados da cumarina	Positivo	Positivo
Antraquinonas	Negativo	Negativo

Nas frações foram realizados testes para flavonóides e quinonas, e os resultados quantificados, de acordo com a intensidade da coloração obtida no teste, conforme tabela abaixo (tabela 2):

A fração clorofórmica (FC) mostra uma maior concentração de quinonas assim como a fração metanólica uma maior concentração de flavonoides. Demonstrando, uma possível, presença em maior quantidade de flavonoides glicosilados, por estes terem uma maior afinidade por solventes mais polares como MeOH (BRUENETON, 2001).

Tabela 3: Abordagem fitoquímica das frações para flavonóides e quinonas

	Flavonóides	Quinonas
FH	-	+
FC	+	++
FAE	+	+
FM	++	++
FR	+	-

7.9. Fracionamento do Extrato Etanólico Bruto

A partir de 43,010g de EEB, obtivemos um rendimento de 7,914g para FH; 5,909 para FC; 3,607 para FAE; 12,005 para FM e 11,345 de FR.

7.10. Determinação do Perfil Cromatográfico

7.10.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O eluente que apresentou melhor resolução de Rf em placa de CCD foi o hexano/acetona/MeOH (67,5:27,5:5), revelado com o reativo NP/PEG, que na presença de quinonas reage formando zonas de coloração amarelo fluorescente intensa no UV-365nm. Essa característica foi observada na cromatoplaça em uma banda com Rf de 0,17 em FH e FAE.

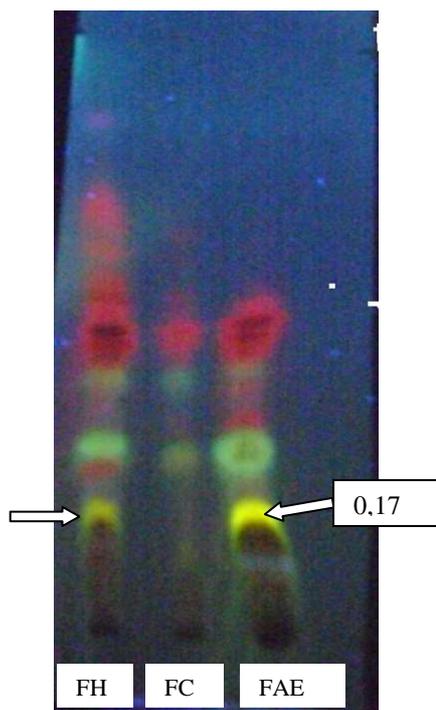


Figura 4: Perfil de CCD FH, FC e FAE de *A. chica*.
Eluente: hexano\acetona\MeOH (67,5:27,5:5)

O presente resultado direciona para o fracionamento, onde a FAE, por ter apresentado maior intensidade na fluorescência na banda melhor definida e com R_f 0,17, será fracionada afim para fins de identificação dos compostos presente nessa fração.

7.10.2. Cromatografia Líquida de Alta Pressão - CLAE

O melhor perfil de CLAE foi obtido a partir da programação em que se utilizou coluna Lichrospher 100 RP18 e como fase móvel (A) ACN (A) e $H_2O.pH_3(TFA)(B)$. A eluição foi realizada em gradiente, durante 60min: onde A:B em $t=0min$ é 82:12; $t=20min$, 55:45; $t=50min$, 0:100 e $t=60min$ 82:18, a uma temperatura de $26^\circ C (\pm 1^\circ)$ com detecção nos comprimentos de onda 254, 330, 400, 450nm e monitoramento em 254nm. Os cromatogramas registrados em 330 e 400nm fornecem picos com características das duas principais classes de metabolitos secundários que são quinonas e flavonoides.

No cromatograma de 330nm, no intervalo de tempo de 4 a 24 minutos foi possível observar o aparecimento de picos significativos, característicos de flavonoides (Figura 7), com destaque para os picos localizados nos tempos de

retenção (Rt) de 8,67min, com pureza de 0,9914 e máximos de absorvância em 275nm e outro em 324nm (Figura 6), o de 11,49min, com máximos em 268nm e 333nm (Figura 6a) e o de 15,07min, com máximos em 266nm e 331nm (Figura 6b). Segundo Harborne (1998), essas combinações de máximos de absorvância são característicos da classe dos flavonóis, que se caracterizam pela presença de uma hidroxila na posição C3.

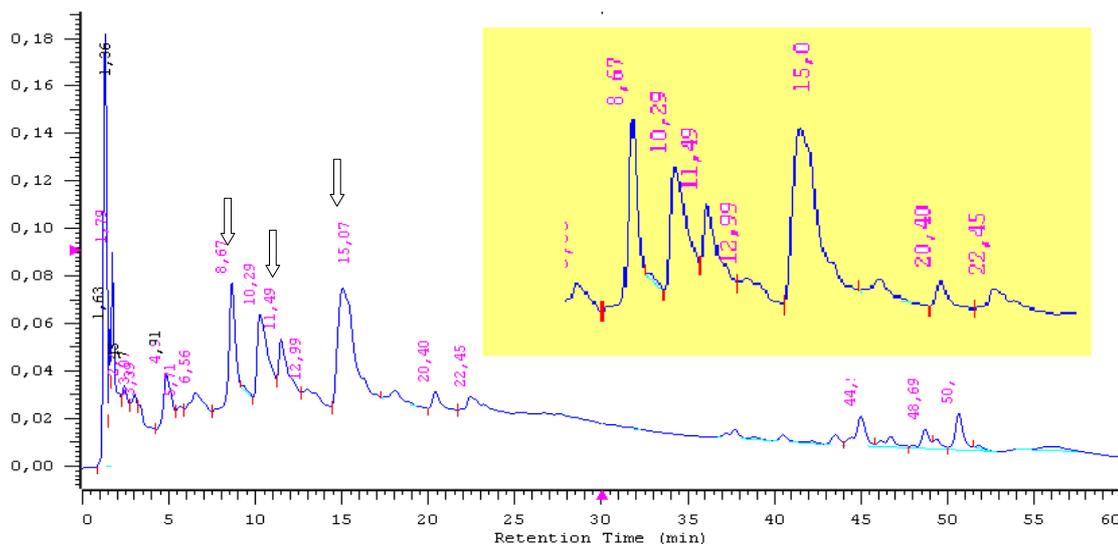


Figura 5: Cromatograma obtido por CLAE-DAD do EEB de *A. chica* no comprimento de onda de 330nm. Com destaque para os picos registrado entre os tempos de 4 a 24min, especialmente o com tempo de retenção de 8,67min. Com observação de picos de pouca intensidade no tempo de 37 a 54min.

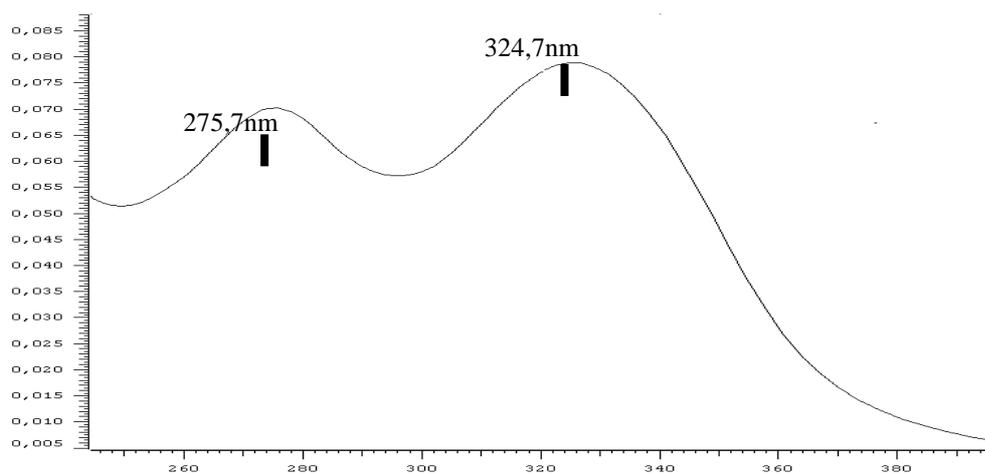


Figura 6: Espectro do pico registrado, por CLAE-DAD de *A. chica* a 330nm, com Rt de 8,67min e pureza de 0,9914., observa-se dois máximos de absorção um em 275,7 nm e outro em 324,7nm.

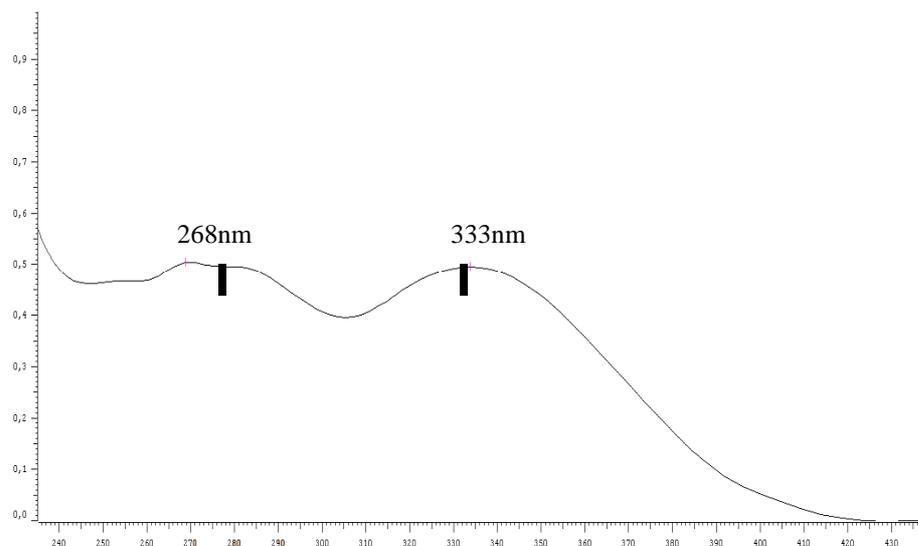


Figura 6a: Espectro do pico registrado, por CLAE-DAD deo *EEB* de *A. chica* a 330nm, com Rt de 11,49 min observa-se dois máximos de absorção um em 268 nm e outro em 324.

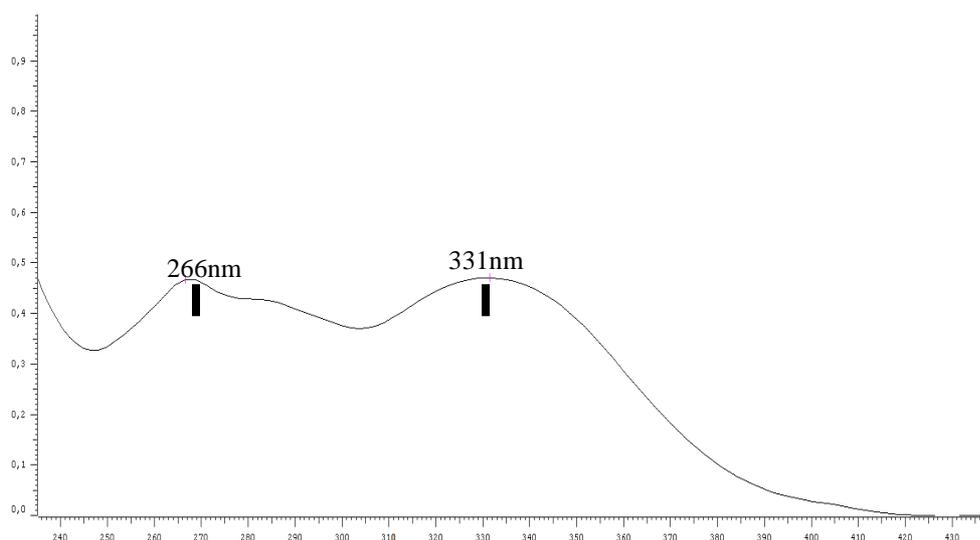


Figura 6b: Espectro do pico registrado, por CLAE-DAD do *EEB* de *A. chica* a 330nm, com Rt de 15,07 min , observa-se dois máximos de absorção um em 266 nm e outro em 331nm.

No cromatograma registrado em 400nm, no intervalo de tempo de 37 a 54min, observa-se a presença de picos referentes a espectros característicos de quinonas, sendo que os mesmos já tinham sido observados em 330nm, porém apresentavam-se menos intensos neste comprimento de onda (Figura 9). Em destaque tem-se o pico apresentado no tempo de retenção (Rt) de 50,64min, que corresponde a um espectro com 4 máximos de absorbância: 222; 278; 324 e 404nm, com pureza de 0,9989 (Figura 10). Harborne (1998) diz que as naftoquinonas têm de três a quatro máximos de absorbância em seu espectro, sendo um ou dois abaixo de 300nm, outro entre 320 e 340nm e outra acima de 400nm. Os máximos do espectro do pico

mencionado estão de acordo com esta citação e nos leva a mencionar uma possível presença de naftoquinonas neste extrato.

Em estudos anteriores realizados com o mesmo equipamento a quinona isoleuterina foi caracterizada através do espectro no ultravioleta, que mostra quatro máximos de absorbância (MALHEIROS, 2008), o mesmo padrão se observa no espectro da substância discutida nesse relatório. A comparação entre os dois espectros mostra que as bandas com máximo de absorção em torno de 400nm, relativa a transição das carbonilas quinônicas, estão presente em ambos os espectros. Tal fato permite inferir que existe um cromóforo quinônico em ambas as estruturas, reforçando a observação de *A. chica* apresentar ao menos uma quinona na amostra analisada, uma vez que é freqüente em outros trabalhos com Bignoniácea o isolamento de quinonas na família (STEIRNET, 1995; JACOME, 2001e OLIVEIRA, 1990).

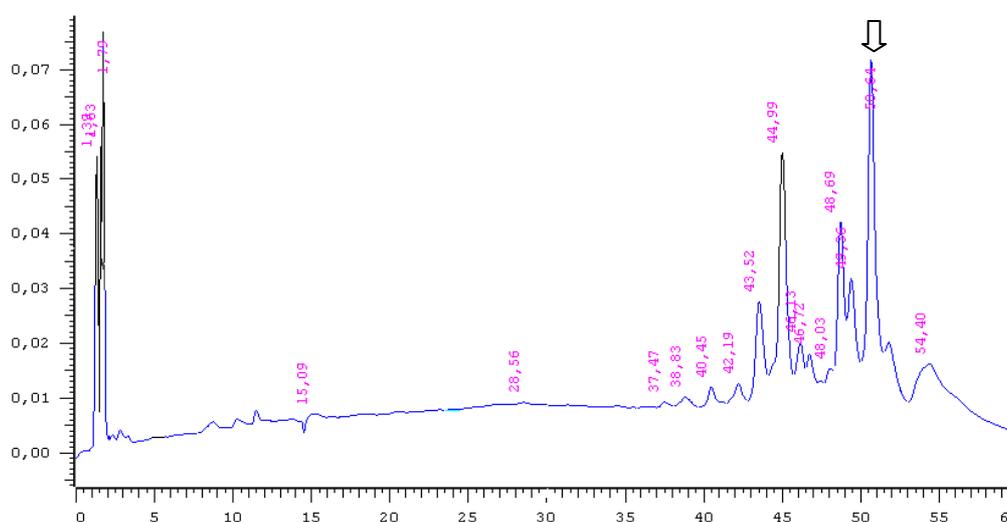


Figura 7: Cromatograma obtido por CLAE-DAD do EEB de *A. chica*, registrado no comprimento de onda de 400nm. Com destaque para os picos no tempo de 37 a 54min, especialmente o pico do tempo de retenção de 50,64 min, indicado pela seta.

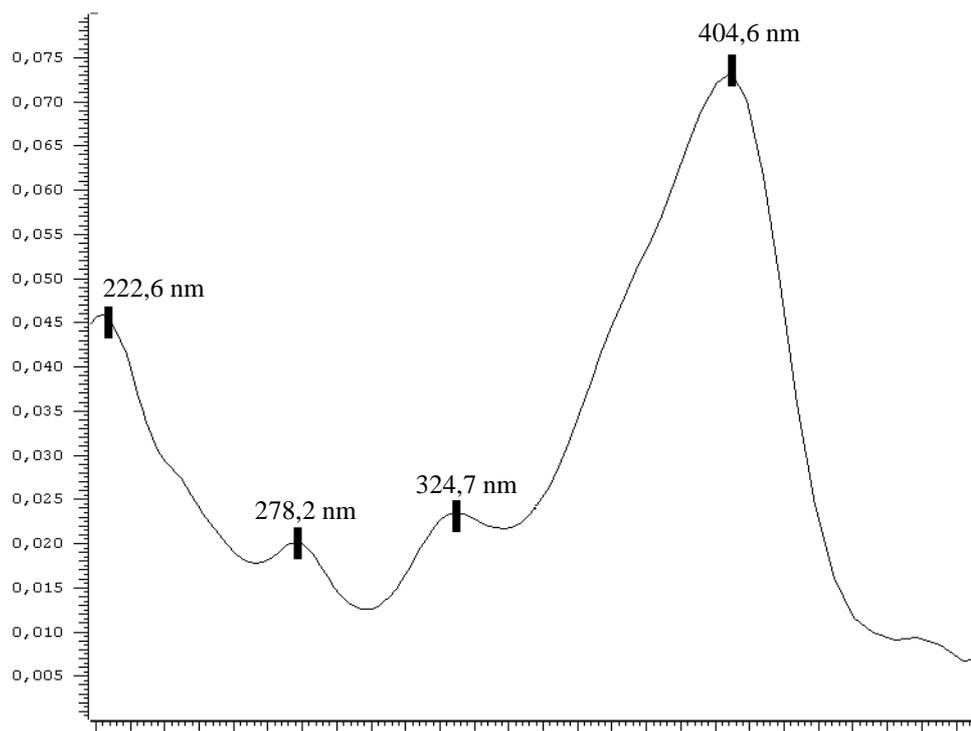


Figura 8: Espectro do pico observado por CLAE-DAD DO EEB de *A. chica* em 400nm com (Rt) de 50,64 min e pureza de 0,9989. Com quatro máximos de absorção: 222; 278; 324 e 404.

7.10.3. LC-MS

Na análise por LC-DAD-MS observou-se baixa absorbância nos espectros de absorção na região do Ultra Violeta, indicando a ausência de grupos cromóforos. Além disso, os espectros de massas mostram que estes compostos majoritários da fração possuem baixa massa molecular (conforme anexo A 1; 2 e 3).

7.10.4. CROMATOGRAFIA LIQUIDA A VÁCUO:

Para a CLV foi escolhida a fração acetato de étila (FAE), pois foi a fração que apresentou melhor perfil na CCD. Cerca de 3,217g da fração foram aplicados na coluna, preenchida com gel de sílica 60 (230-400mesh) para cromatografia em coluna. Como eluente foram utilizados Hexano:Acetato de étila: metanol nas seguintes proporções: 80:20:0; 70:30:0; 60:40:0; 60:30:10; 60:20:20; 60:10:30 e 60:0:40. As frações foram recolhidas em tubos de ensaios e as proporções de eluentes foram modificadas a cada observação de Constancia na cor das frações.

No total foram recolhidas 332 frações ao final da CLV, estas foram analisadas por CCD, utilizando como eluente hexano: acetona: MeOH (67,5:27,5:5) e observadas em UV 254 e 365nm e reveladas com anisaldeído. As frações com perfis semelhantes foram reunidas somando ao final 14 frações, numeradas de 1-14. Os rendimentos de cada fração foram: F1-0,050g; F2-0,0154; F3-0,0153; F4-0,0188; F5-0,1625; F6-0,0499; F7-0,075; F8-0,1252; F9-0,2509; F10-0,723; F11-0,6218; F12-0,3761; F13-0,474 e F14-0,3218.

Estas frações foram analisadas por CLAE-DAD. Para esta análise, as frações foram dissolvidas em metanol grau HPLC na concentração de 10 mg/mL e posteriormente filtradas em filtro Millipore 0,45 µm. Alíquotas de 20 µL foram injetadas no cromatógrafo, em análises distintas, a fim de definir os perfis da composição de cada fração. Foi usada uma coluna LiChrospher® 100 HPLC 125-4 RP-18 a 26°C e como eluentes A: Solução aquosa de ácido acético 2% e B: acetonitrila/metanol/ácido acético (88:10:2) em gradiente linear de 18 a 100% de A em 30 minutos, com fluxo de 1 mL/min, e detecção nos seguintes comprimentos de onda: 280, 330, 400 e 450.

No cromatograma da fração 8 (figura 11) observa-se o pico de 12,35 min., que apresenta espectro no UV com máximos de absorção em 266 e 336nm (figura 12) típicos de flavonóides, mais especificamente da classe dos flavonóis (MABRY et al.,1970).

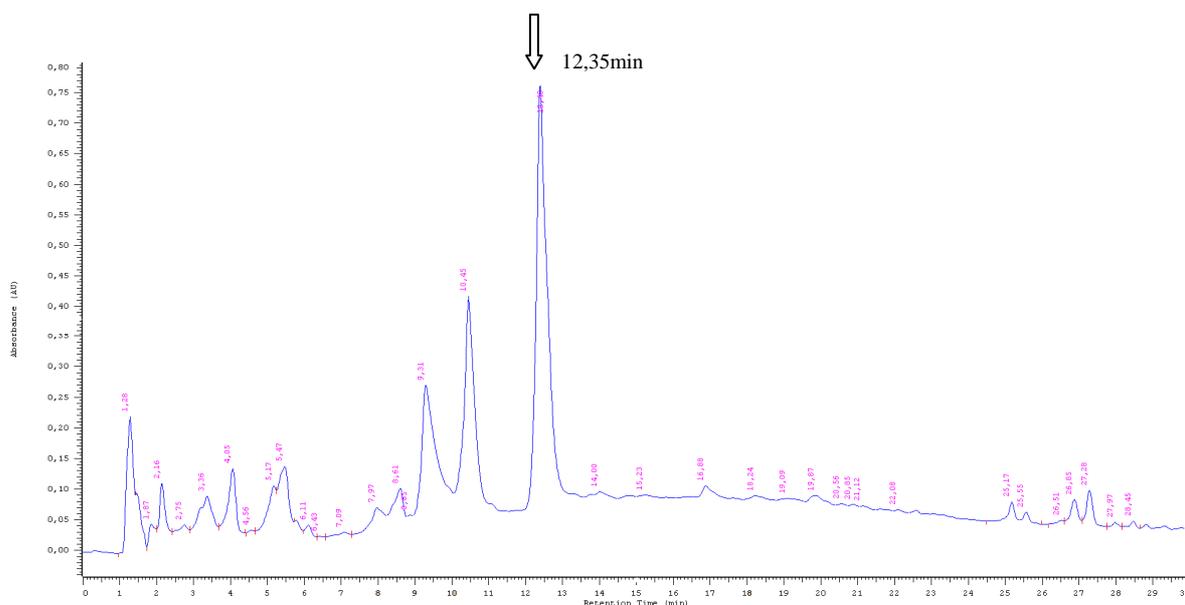


Figura 11: cromatograma da fração 8, onde se observa o pico de 12,35min.

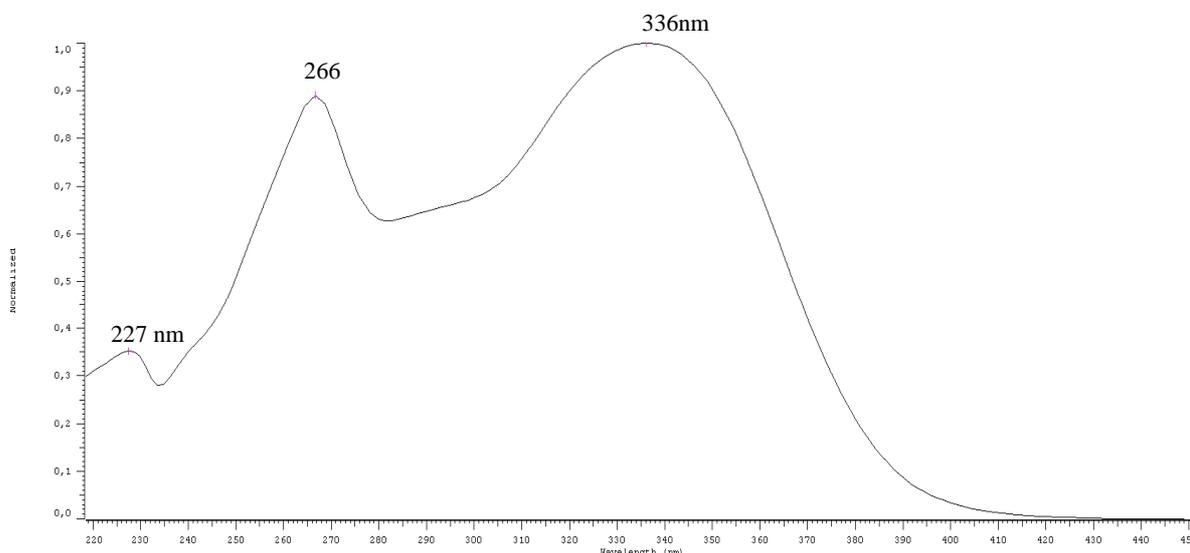


Figura 12: Pico de 12,35min da Fr8, com pureza de 0.9977 e máximos em 227, 266 e 336nm.

E ao comparar o espectro relativo ao pico de 10,45 da fração 8 com espectro no UV de padrões de disponíveis armazenados na biblioteca do aparelho, encontrou se uma correlação significativa com o espectro de apigenina, sugerindo assim que o núcleo flavonoídico seja derivado da flavona apigenina. A presença deste flavonóide já foi relatada em outra espécie da família Bignoniácea do gênero *Arrabidaea* (BLATT et al, 1998).

Uma solução de Padrão de apigenina (SIGMA-ALDRICH® CAS 520-36-5) na concentração de 0,5mg/mL em MeOH grau HPLC foi injetada nas mesmas condições da fração 8, e após a análise o pico da apigenina foi observado no tempo

de 12,24 no cromatograma (figura 13), com pureza de 0,9997 e espectro com máximos em 233; 266 e 333 (figura13.a).

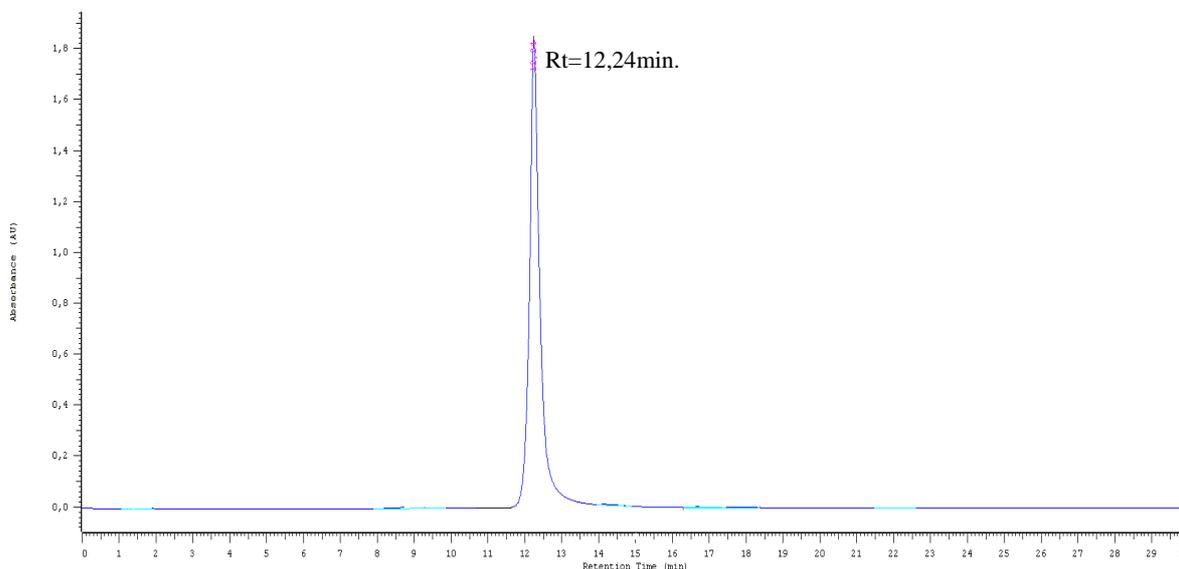


Figura 13: Cromatograma HPLC-DAD de apigenina pura a 0,5mg/mL.

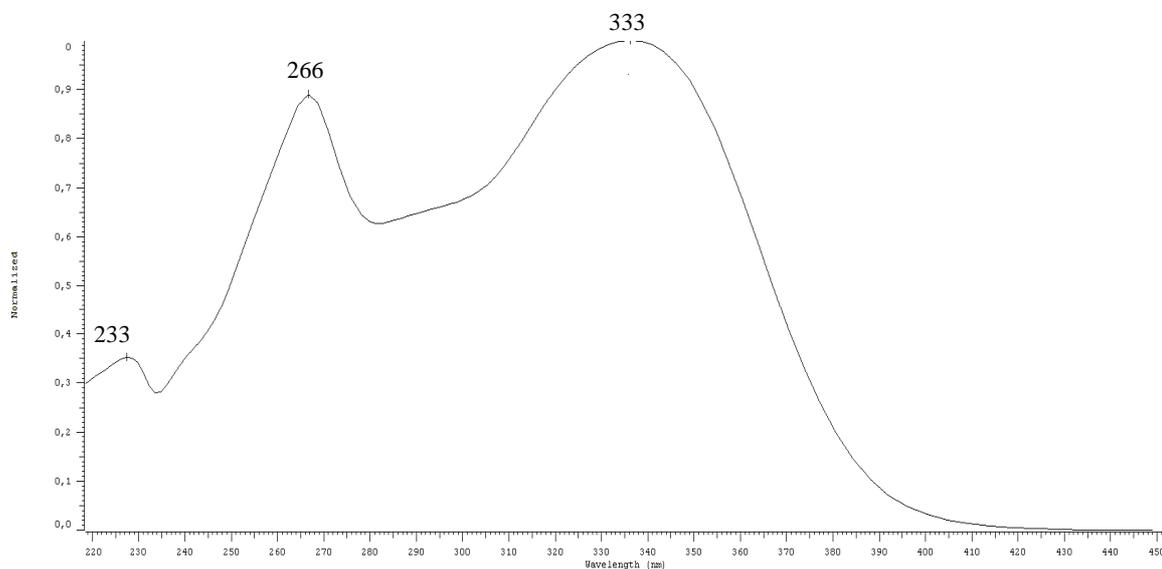


Figura13.a: Espectro da Apigenina pura.

Foi ainda realizada co-injeção da apigenina com a fração 8. Onde 0,05mg da substância de referência foram adicionado a 1mL da solução da Fração 8 a 15mg/mL. Observou-se então no perfil apresentado na co-injeção o aumento da absorção do pico de 12,35 min, que passou de 0,615AU para 1,585 AU, fato este

não observado nos demais picos. Conforme se observa na figura 14, em comparação com a figura 11.

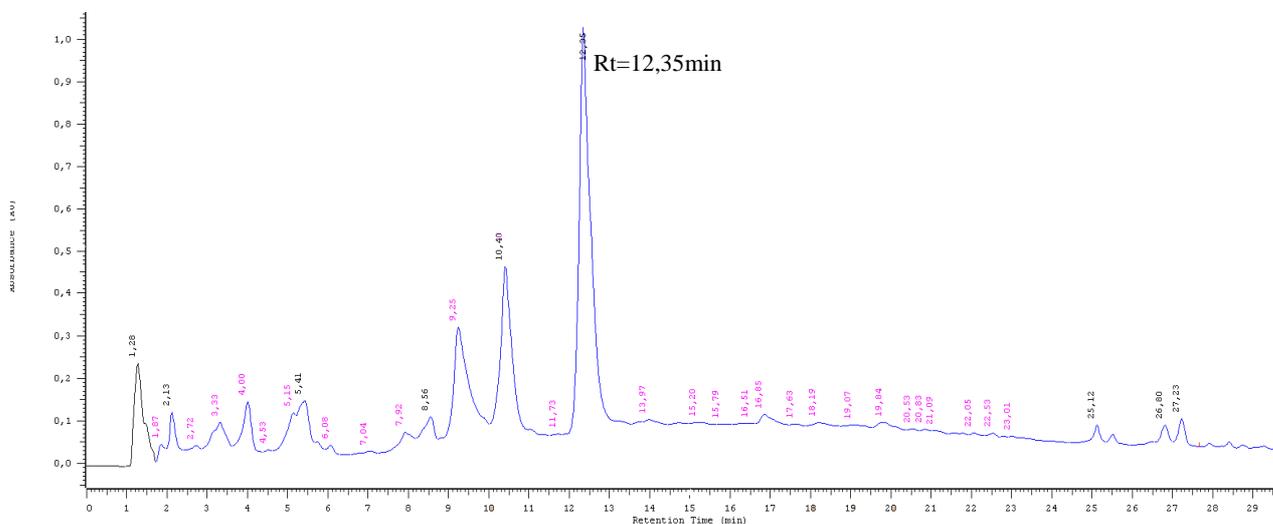


Figura 14: Perfil cromatográfico LC-DAD da Co-injeção Fração8 + apigenina.

Na química flavonóidica da família Bignoniácea predomina de flavonóides de esqueleto regular, não havendo ocorrência de tipos mais diferenciados tais como isoflavonóides e neoflavonóides (CIPRIANI, 2006). É relatado também que a família apresenta uma preferência na produção de flavonas o que segundo BATE-SMITH (1962) pode ser indicativo de posicionamento mais avançado para o táxon. A presença da apigenina confirma essa teoria reforçando a idéia de uma família mais desenvolvida dentro de seu reino.

7.10.5. Avaliação Microbiológica:

A avaliação de EEB e EAB por teste de difusão em disco frente a cepas de *Enterococcus hirae*; *Bacillus subtilis*; *Candida albicans*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus* nas concentrações testadas não mostraram qualquer halo de inibição em torno dos discos contendo o extrato da planta em nenhuma de suas concentrações. Os microorganismos que mostraram sensibilidade, através da formação do halo de inibição foram: *Pseudomonas aeruginosa* nas concentrações de 500 e 250; *Streptococcus mitis* a 500; *Streptococcus mutans* 500; *Streptococcus sanguis* 500; *Enterococcus faecalis* 500 e 250; *Candida krusei* 500 e 250; *Candida parapsilosis* 500, 250 e 125. Conforme tabela a seguir:

Tabela 5 – Atividade antimicrobiana *in vitro* do EEB de *Arrabidaea chica* pelo método de disco-difusão.

Micro-organismo	500	250	125	62,50	31,25	15,625	Cloranfenicol	Nistantina	DMSO
Bactérias Gram-negativas									
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12 mm*	9 mm	-	-	-	-	20 mm	NSA	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	18 mm	NSA	-
Bactérias Gram-positivas									
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	30 mm	NSA	-
<i>Streptococcus mitis</i>	11 mm	-	-	-	-	-	23 mm	NSA	-
<i>Streptococcus mutans</i>	10 mm	-	-	-	-	-	23 mm	NSA	-
<i>Streptococcus sanguis</i>	11 mm	-	-	-	-	-	23 mm	NSA	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	11 mm	9 mm	-	-	-	-	30 mm	NSA	-
<i>Enterococcus hirae</i>	-	-	-	-	-	-	32 mm	NSA	-
<i>Bacillus subtilis</i>									
Fungos leveduriformes									
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	NSA	20 mm	-
<i>Candida krusei</i>	12 mm	9 mm	-	-	-	-	NSA	20 mm	-
<i>Candida parapsilosis</i>	15 mm	12 mm	10 mm	-	-	-	NSA	20 mm	-

Estudos biológicos com espécies desta mesma família têm revelado atividade microbiana em alguns gêneros inclusive o *Arrabidaea* (LIMA, 2003). A atividade biológica apresentada pelo extrato pode sustentar seus usos tradicionais como antimicrobiana e antifúngica. E ainda a presença da apigenina que possui entre suas atividades, já comprovada a atividade antibacteriana vem reforçar esta possível atividade do extrato analisado (VERDI, 2005).

Alves (2008) testou a atividade antimicrobiana da *A. chica* para alguns dos mesmos microorganismos testados neste trabalho. Ele relata em seu estudo a atividade antimicrobiana positiva da mesma para o *S. aureus* nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5; para a *E. coli* nas concentrações de 500 e 250 mg/mL para a *C.albicans* somente na concentração de 500 mg/mL. Já Barbosa e Quinard (1998) não observaram atividade antimicrobiana contra estas cepas em extrato etanólico. Esse fato pode estar associado á sazonalidade da planta, pois esta foi coletada em diferentes estações do ano em cada um dos trabalhos descritos acima. Castro (2007) apresentou a influencia da sazonalidade na atividade antibacteriana e atribuiu à alteração na concentração de compostos bioativos que pode variar em função do período de coleta e da sazonalidade local.

8. CONCLUSÃO

No presente trabalho observou-se que o processamento da droga vegetal foi satisfatório, uma vez que os resultados das análises físico-químicas estavam dentro de parâmetros aceitáveis. O pó foi classificado como grosso, com 11% de teor de água e 7,63% de cinzas totais. O rendimento da tintura obtida pelo método de maceração foi de 17,79% em relação à droga vegetal (pó) e 2,22% em relação à planta fresca.

Na abordagem fitoquímica observou-se a presença de diversos metabólitos secundários entre eles saponinas; ácidos orgânicos; açúcares redutores; fenóis e taninos; alcalóides; derivados da cumarina; derivados de fenan-, benzo- e naftoquinonas e também flavonóides tão mencionados na literatura como sendo abundantes nesta família e na espécie *Arrabidaea chica* (H&B) Verl.este foi reforçado no perfil de CCD obtido com o eluente Hexano/Acetona/ MeOH (67,5:27,5:5) e revelado com NP/PEG, revelou uma banda com $R_f=0,17$ com fluorescência amarela característico de flavonóides

O indicativo da presença de um possível derivado flavonoidico da apigenina e a atividade microbiológicas apresentada contra os microorganismos *Pseudomonas aeruginosa*; *Streptococcus mitis*; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus sanguis*; *Enterococcus faecalis*; *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*, corroboram seu uso popular e contribuem para a padronização de uma forma de uso e direcionamento para a produção de fitoterápicos a partir desta planta e seus insumos.

9. REFERÊNCIAS

^aBRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 136 p.

ALVES, M. S. M. et al . Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 20, n. 2, maio 2010 Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid. Acesso em 3 jun. 2010.

ALVES, M. S. M.. **Caracterização farmacognóstica, química, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt.** 2008. 114f, dissertação de mestrado, PPGCF - Universidade Federal do Pará, Belem – PA. 2008.

AMARAL, R.R; MENEZES, F.S; ROCHA, L.M; RANNA, F e EMANOEL, T. S. **Estudo fitoquímico e Atividade Antioxidante em extratos de folhas de *Arrabidaea chica*)** 25a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ, MG, 2002.

AMELLA, M.; BRONNER, C.; BRIANCO, F.; HAAG, M.; ANTON, R.; LANDRY, Y. Inhibition of mast cell histamine release by flavonoids and biflavonoids. **Planta. Med.** V.52, p.16-20. 1985.

ANDRÁS, F; A., KOCSIS.B.; MATUS, Z. E BOTZ, L. A Sensitive Method for Thin-Layer Chromatographic Detection of Amphotericin B *Journal of Planar chromatography* 23 1, 18–22 2010.

ANGRA, M.F., Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**; 17: 114 140. 2007.

ARNOUS, A.H. Plantas Medicinais de Uso Caseiro – Conhecimento Popular e Interesse por Cultivo Cumunitário, **Revista Espaço para a Saúde**, Londrina; 6:1-6. 2005.

BARBOSA et al, ***Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities**, Brazilian Journal of Pharmacognosy, vol 18(4), pg. 544-548, 2008.

BARBOSA W.L.R, QUIGNARD, E. 1997-1998. **Projeto integrado- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Relatório final de atividades**. Belém-PA. 1998.

BARBOSA, W. L .R; PINTO, L. N; LOVATO, G. M; FERREIRA, D. A.. Semeando Saúde: Uma proposta de orientação para o uso adequado de plantas medicinais nas comunidades do entorno da Universidade Federal do Pará. In: Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 5.,2005, Recife, SBFGE, 2005.

BARBOSA, W. L. R et al, **Etnofarmácia: Fitoterapia Popular e Ciência Farmacêutica**. NUMA/ UFPA, Belém, PA, 2009.

BARBOSA, W. L. R. Aproveitamento farmacêutico da flora como instrumentos de preservação cultural e ambiental. Brasil: Poematropic. 1998. v.1: 1, jan/jun 1998.

BARBOSA, W. L. R., PINTO, L. N., BRAGA, F. C., Levantamento etnofarmacêutico de fitoterápicos tradicionais, uma contribuição para a inserção deles nas ações primárias de saúde. XVIII SIMPOSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, Manaus, 2004.

BARBOSA, W. L. R; Fiqueni, S. F.. Abordagem etnofarmacêutica de *Portulaca pilosa*, In: Encontro Internacional de Ciências Farmacêuticas, 1., 1997. Recife. Anais..., Recife: UFPE.1997.

BARBOSA, W. L. R; Pinto, L. N.. Levantamento etnofarmacêutico de fitoterápicos tradicionais, uma contribuição para a inserção deles nas ações primárias em saúde.

In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 18., 2004, Manaus. Resumos...
Manaus: SPMB.2004.

BARUCH, J. Effet del'endotelon dans lês oedemès post-chirurgicaux. *Ann. Chir.Plast. Esthét.*, vol.29, p.393-395, 1984.

BATE-SMITH, E. CThe phenolic constituents of plants and their taxonomic significance I. Dicotyledons. **Botanical Journal of the Linnean Society** **58**: 95-173.1962.

BAUER, A.W.; KIRBY, W. M. M. SHERRIS, J. C. ; TURCK, M. Antibiotic susceptibilities testing by standard single disc diffusion method. *American Journal of Clinical Pathology*, v.45, p.493-496, 1966.

^bBRASIL, ministério da saúde, **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – RENISUS (2009)**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/>, acesso em 31.05.2010

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BINUTU, O.A; ADESOGAN, K.E; OKOGUN, J.I. Antibacterial and antifungal compounds from *kigelia pinnata*. **Planta Med.** V.62.p.352-353, 1996.

BLATT, C.T.T., SANTOS, M.S., SALATINO, A., Flavonoids of Bignoniaceae from the "cerrado" and their possible taxonomic significance. **Plant Systematics and Evolution.** 210, 289–292.1998.

BRASIL ^a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC N- 14, De 31 de Março de 2010**, DOU Nº 63, 5 de Abril de 2010, Dispõe Sobre o Registro de Medicamentos Fitoterápicos. 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde *Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos*. Brasília. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no**

SUS - PNPIC-SUS. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Atenção Básica – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** .Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em [http://Portal Saude.gov.br](http://PortalSaude.gov.br). Acessado em 31.05.2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=72&idMenu=2355>>. Acesso em: 20 de abril de 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Primeiro relatório nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica.** Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 1998.

BRASIL. Resolução CIPLAN Nº 8/88, de 8 mar. 1988. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, v. 126, n. 48, p. 3999-4000. 11 mar. 1988. Seção I.

BRITO, A. L. O et al, Principais Cuidados no Cultivo, Manipulação e Consumo de Plantas Medicinais. Erros e Problemas Mais Comuns, UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA INSTITUTO DE FARMÁCIA, 1999. Disponível em http://www.plantamed.com.br/DIV/CULTIVO_COLHEITA_MEDICINAL.htm, acesso em: 24 de janeiro de 2010.

BRUNETON, j. FARMACOGNOSIA-fitoquímica/plantas medicinales, 2^oed. ACRIBA, S.A. Zaragoza, 2001.1099p.

BRUNETON, J. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Zaragoza: Editorial Acribia, 1999.

CARVALHO, J.C.T *Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.* São Paulo: Tecmed. 2004.

CASTRO DA COSTA, P. R. AND ARAÚJO LIMA, E. **Brazilian-Sino Symposium on Chemistry and Pharmacology of Natural Products.** Rio de Janeiro, Brazil (1989).

CHAPMAN, E., PERKIN, A.G., ROBINSON, R.,. The colouring matters of Carajura. **Journal of the Chemical Society** (London), 3015–3041. 1927.

CHATTOPADHYAY D, NAIK TN. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure-activity relationship and scope. *Mini- Rev. Med Chem* 7: 275-301. 2007

CIPRIANI, F. A. **Aspectos quimiotaxonômicos da família Bignoniaceae**- Rio de Janeiro: UFRJ/ Museu Nacional, 2006. 73f. Dissertação (mestrado) –UFRJ/ Museu Nacional/Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas(Botânica), 2006.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M2-A8. CLSI. 2003.

COLLINS, C.H. Introdução a métodos cromatográficos. Editora da UNICAMP. 4ªEd. 1990.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

COLLINS, et al. **Introdução a métodos cromatográficos**. UNICAMP, 7ª ed., São Paulo, p.65,68,185,1997.

CORRÊA, M. P, Dicionário de plantas úteis no Brasil e das Exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura, IBDF, voll, 1931.

DEGANI, A. G.; CASS, Q. B E VIEIRA, P. C. Cromatografia, UM BREVE ENSAIO. **Química Nova Na Escola** N°7, MAIO 1998.

DEVIA, B; LLABRES, G; WOUTERS, J; DUPONT, L; BAILON, M.T.E, TERESA, S.P; ANGENOT, L e TIT, M, **New 3-Deoxyanthocyanidins from Leaves of *Arrabidaea chica***, *Phytochem. Anal.* **13**, 114–120, 2002.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, Tucson, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais**: arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996.

ESTRELA, E. **Tratado de cooperação Amazonica – secretaria Protempore, Plantas medicinales amazônicas: realidad e perspectivas**, Lima: TCA, 1995. 302p.

FALKENBERG, M. B. in: SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A E PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta a medicamento*. 6^oed. editora da UFSC. Florianópolis. 2007. Pg. 657-683.

FEBRAFARMA. **Fitoterápico atrai investimentos**, 2007. Disponível em: <http://www.febrafarma.org.br/areas.php?area=&secao=38&modulo=materias>. Acessada em.

FENNER, R; BETTI, A.H; MENTZ, L.A E RATES, S.M.K. Plantas Utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**. Vol. 42, 2006.

FIEAM. Pelo aproveitamento racional das plantas medicinais da Amazônia. In: **Anuário da Agricultura Brasileira – AGRIANUAL 2002**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio. 2002, p. 28-29

FISCHER, E.; THEISEN, I. & LOHMANN, G.L. (**Bignoniaceae. In: The families and Genera of Vascular Plants**. Vol VII. J. W. Kadereit (ed.). Springer-Verlag Heidelberg, Germany, 9-38pp. 2004)

GENTRY, A. H. *Ann. Mo. Bot. Gard*79, 53–64.. **1992**,

GENTRY, A.H., **Bignoniaceae*Part I (Crescentieae and Turretieae)**. Flora Neotropica. Monogr. 25. The New York Botanical Garden, New York. 1980.

GIBBONS S. An overview of plant extracts as potential therapeutics. *Exp Op Ther Pat* 13: 489-497. 2003

HARBONE, J.B, *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plants analysis*. 3^ªedição. Londom: Chapman & Hall, 1998.

He, X. On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 203-232, 2000.

HEINRICH M. *Ethnopharmazie und Ethnobotanik. Eine Einföhrung*. Stuttgart Germany.: **Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft**, 2001.

JFIRGEN STEINERT, J; KHALAF, H ERIMPLER, M. separation and determination of naphtho[2,3-b]furan- 4,9-diones and related compounds in extracts of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). **Journal of Chromatography A**,v. 693. Pg. 281-287. Germany. 1995

JORGE, M. P et al, Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract, **Journal of Ethnopharmacology** v.118: 361–366 . 2008.

JORGE, M. P. **Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract**, Journal of Ethnopharmacology 118 361–366, 2008.

KARTAL, M.; YILDIZ, S.; KAYA, S.; KURUCU, S.; TOPÇU, G. Antimicrobial activity of própolis simples from two different regions of Anatolia. **Journal of Ethnopharmacology**, v.86, p. 69-73, 2003.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.; MELLO, J.. **Fitoterápicos: um mercado promissor**. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, América do Norte, 30 9 06 2010.

LEVSEN, K.; PREISS, A.; GODEJOHANN, M. Application of high-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry to complex environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 27-48, 2000.

LOPES, J.L.C.; Cromatografia em Camada Delgada.In: COLLINS,C.H; BRAGA,G.L; BONATO, P.S; **Fundamentos de Cromatografia**; São Paulo, ed.UNICAMP, 2007, p. 67-85.

LORENZI, H e MATOS, F. J. A, **Plantas Mediciniais no Brasil – nativas e exóticas**, Instituto Plantarum de Estudos da flora LTDA, Nova Ondessa, SO, Brasil, 2002.

LOUGH, W.J. e WAINER, I.W. *High Performance liquid chromatography: fundamental principles and practice*. Blackie Academic and Professional, 1995.

MAGALHÃES, I. G. S et al, Determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in the Leaves and Tea of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) Verl.**Biol Trace Elem Res** 132:239–246. 2009.

MALHEIROS, L. C. S, **isoeleuterol e isoleuterina: potenciais marcadores químicos da tintura de *Eleutherine plicata* Herb.(iridaceaea) e atividade microbiológica e antioxidante.** 2008. 67F. Dissertação de mestrado. UFPA. BELÉM-PA. 2008.

Mello, J. C. P.; Petrovick, P. R.; *Acta Farm. Bonaerense* 2000, 19, 211.

NEWMAN DJ, CRAGG GM, Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod** 70: 461- 4772007.
OLIVEIRA, F; AKISUE, G E AKISUE, M. K, *Farmacognosia*, Ed. Atheneu. São Paulo-SP. 1991.pg 16-18.

OMS (Organização Mundial da Saúde). *Situação regulamentar dos medicamentos: uma análise mundial.* 2000.

PEARCE, F. L.; BEFFUS, A. D.; BIENENSTOCK, J. III. Effect of quercetin and others flavonoids on antigen-induce histamine secretion from rat intestinal mast cells. **J. Allergy clin. Immunol.**, vol 73.p. 819-823, 1984.

PEREIRA, A.S.; BICALHO, B.; LILLA S.; DE NUCCI, G. Desafios da Química Analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, n. S107-S111, 2005.

PETROVICK P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003

PIETTA P. G. Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod**; 63:1035-42. 2000.

PINHEIRO, K. Interesse por plantas medicinais é crescente no mundo.
Disponível em: <http://ciencia.funcap.ce.gov.br/?p=576>, acesso em 21.04.2011.

PUHL, M. C.M. N; SERRA, L. Z; GUTIERRE, M. A. M; CORTEZ, D. A.G. SIDRIM, J.J.C; DIOGENES, M.J.N e PAIXAO, G.C. **Dermatofitoses**. In: SIDRIM, J. J. C Fundamentos Clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 108-131, 1999.

PULH, M. C. M. N, SERRA, L. Z., GUTIERRE, M. A, M E CORTEZ, D. A. G. **Contribuição Ao Estudo Farmacognóstico Do Crajirú: *Arrabidaea Chica* (H&B) Verlot. (Bignoniaceae)** ,Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC - Florianópolis, SC - Julho/2006.

ROCHA, L.M.; Controle de qualidade de produtos fitoterápicos. In: SHARAPIN,N. **Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Cyted, Santafé de Bogotá, p. 159-179, 2000.

RODRIGUES MG, MENDONÇA MM, PAULA JAM. Análise do uso racional de *Hypericum perforatum* a partir do perfil das prescrições médicas aviadas em farmácias de Anápolis-GO. **Rev Eletr Farm** 3: 42-52; 2006.

RODRIGUES, M. V. N; REHDER,V. L.G.; SARTORATTO, A.; BOAVENTURA JÚNIOR, S.; SANTOS, A. S. O emprego de técnicas hifenadas no Estudo de plantas medicinais. **Multiciências**, v. 7, 2006.

SCHULZ PV, HÄNSEL R, TYLER VE. Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine. Berlin: **pringer-Verlag**, pp. 383. 2001

SCOGIN R. Anthocyanins fron bignoniceae. **Biochem system ecoli** 8: 273-276. 1980.

SEMPLE, S.J; PYKE, S.M; REYNOLDS, G. D.; FLOWER, R. L. *In Vitro* Antiviral Activity of the Anthraquinone Chrysophanic Acid Against Polivirus. **Antiviral res.**, v.49. 3: 168-178, 2001.

SILVA JÚNIOR JOC 2006. **Obtenção e avaliação de forma farmacêutica semi-sólida fitoterápica contendo extrato seco por nebulização de *Simphytum officinale* L. (confrei)**. São Paulo, Tese de doutorado, Programa de Pósgraduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo.

SILVA, M. M e QUEIROZ, L. G; A FAMÍLIA BIGNONIACEAE NA REGIÃO DE CATOLÉS, CHAPADA DIAMANTINA, BAHIA, BRASIL ,**Sitientibus série Ciências Biológicas** 3 (1/2): 3–21. 2003

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A E PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta a medicamento. 6^oed. editora da UFSC. Florianópolis. 2007. Pg. 578-614.

TOLEDO A.C.O, HIRATA L.L, BUFFON M.C.M, MIGUEL M.D, MIGUEL,O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Rev Lecta**, Bragança Paulista; 21(1/2):7-13. 2003

VAN DER BERG, A.J.J; LABADIE, R. P. QUINONES. In: HARBONE J. B. Methods in plant biochemistry. V.1. London: academic, 1989. Cap.13p. 451-191.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. and MACIEL, M. A. M.. Plantas medicinais: cura segura?. **Quím. Nova** [online]., vol.28, n.3, pp. 519-528. 2005.

Von Poser, G. L.; Schripsema, J.; Henriques, A.; Jensen, S. R. *Biochem. Syst. Ecol.* 2000, 28, 351–366.

WAGNER, H.; WIESENAUER, M. **Fitoterapia: Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas.** 2^a edição. São Paulo: Pharmabooks, p 1-4; 16. 2006.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of ethnopharmacology.** 51: 239-254, 1996.

WARASHINA T, NAGATANI Y, NORO T. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Chem Pharm Bull* 54: 2006.

WOLFENDER, J.L.; RODRIGUEZ, S.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. **Journal of Chromatography A**,v. 794, p. 299-316, 1998.

ZJHRA, M. L.; SYTSMA, K. J. & OLMSTEAD, R.G. Delimitation of Malagasy tribe Coleeae and implications for fruit evolution in Bignoniaceae inferred from a chloroplast DNA phylogeny. **Plant Systematics and Evolution** 245: 55-67. 2004.

ZORN B, GARCIA-PINERES AJ, CASTRO V, MURILLO R, MORA G, MERFORT,, 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry** 56: 831-835, 2001.

ZORN, B; GARCIA- PINERES, A.J.; CASTRO, V; MURILO, R.; MORA, G. e MERFORT, I. Desoxyanthocianidins from *Arrabidaea chica* (HBK) verlot. **Phytochemistry**. 56(8). Pg. 831-835. 2001.

JACOME, R.L.R. P. et al . Estudo químico de *Zeyheria montana* M. (bolsa-de-pastor).**Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 11, n. 1, 2001 .

OLIVEIRA, A.B; RASLAN, D.S; MIRAGLIA,M.C.M; MESQUITA, A.L, Estrutura Química E Atividade Biológica De Naftoquinonas De Bignoniaceas Brasileiras v13, n4, **Quimica nova**, 1990.

LIMA, C. S. A et al. Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanóide glycosides from *Arrabidaea herley* H. A. GENTRY (Bignoniaceae) **Rev. Bras. Cienc. Farm.** São Paulo, V.39, n.1, mar, 2003.

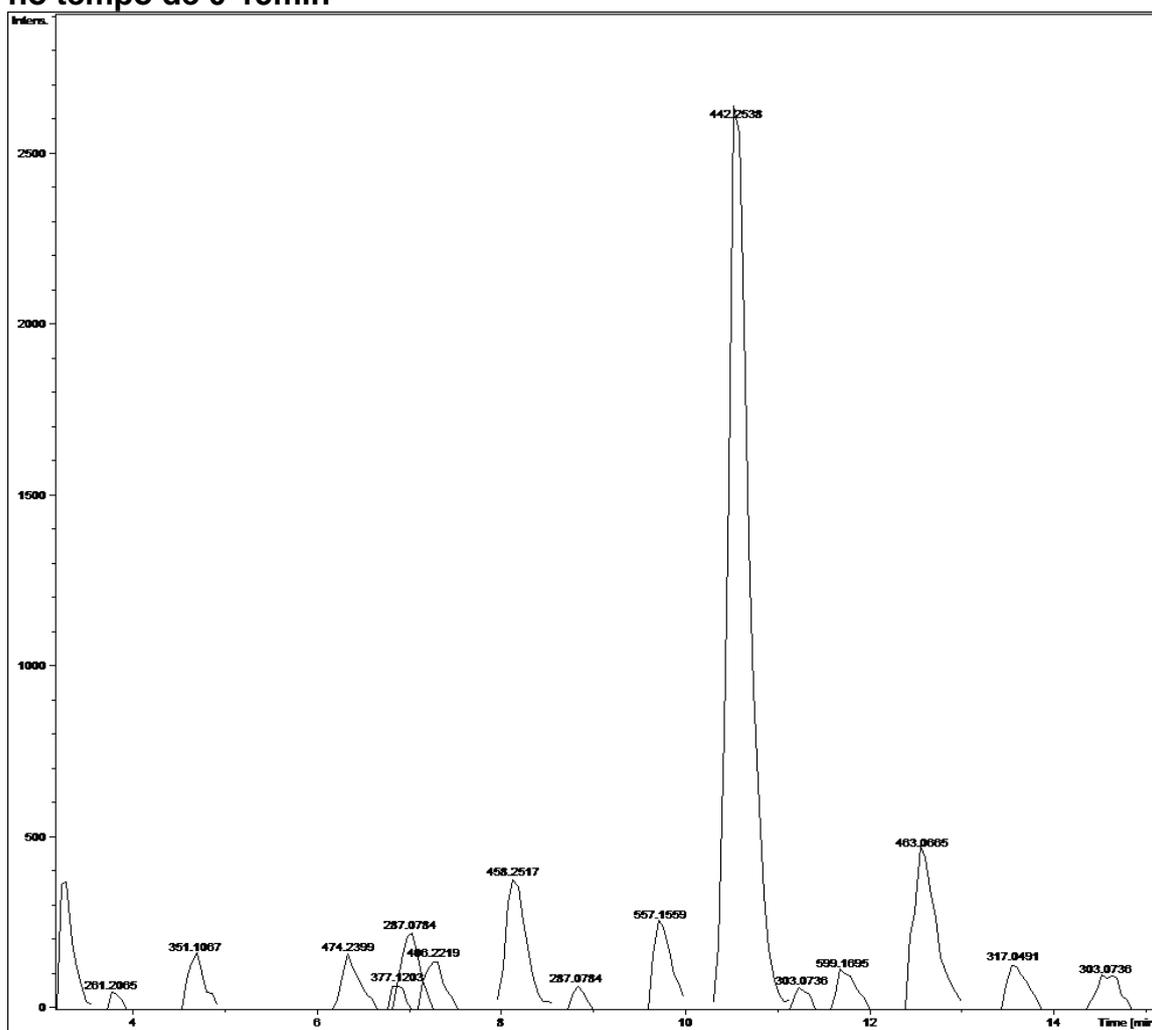
VERDI, L. G; BRIGHENTE , I. M. C e PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos, **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 1, 85-94, 2005

CASTRO, M. L et al, Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na Atividade Antibacteriana e Composição Fenólica. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 7, 1512-1516, 2007

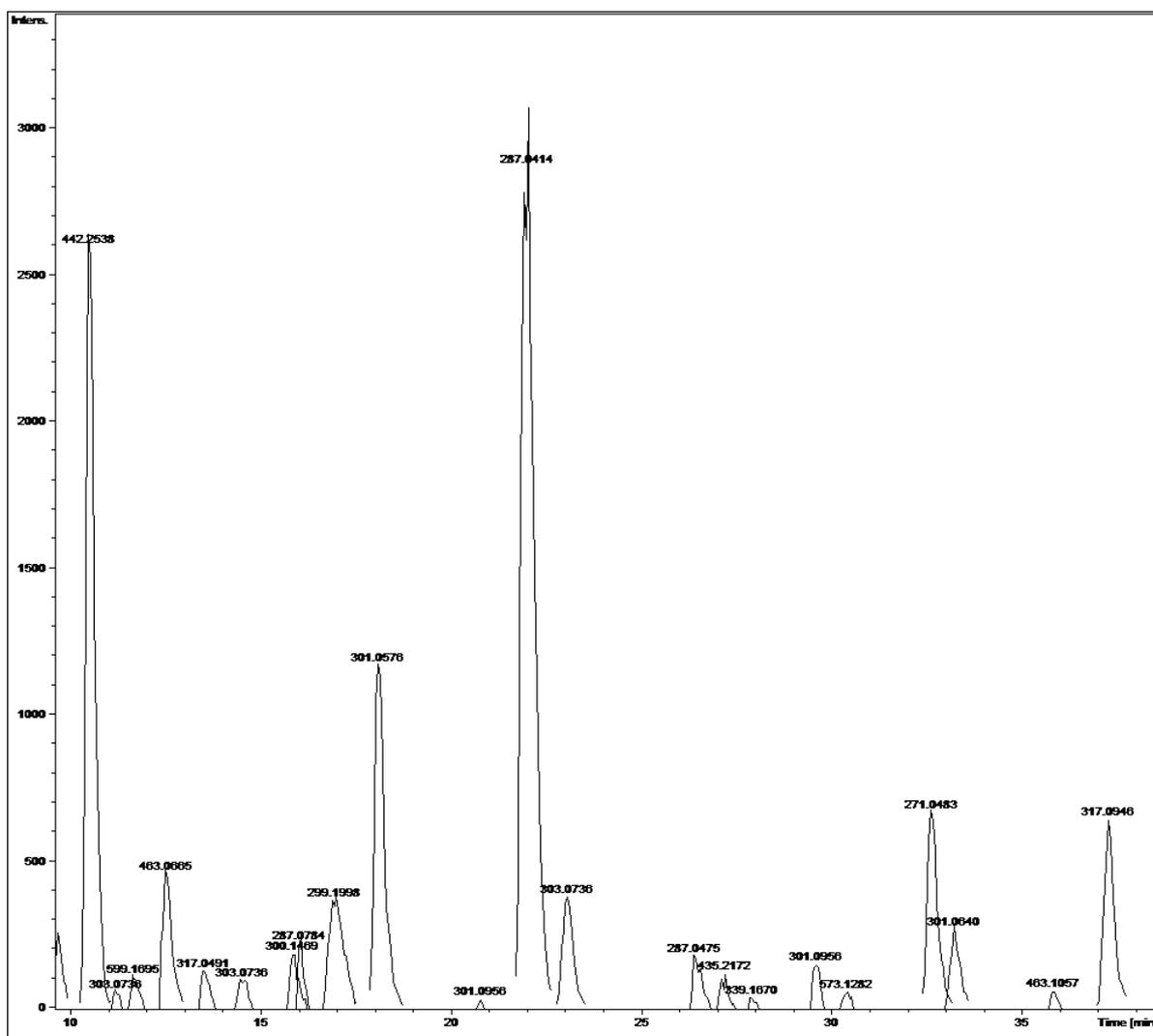
FOUST, A.S. et al. **Principios das Operacoes Unitarias**. 3ed. Rio de Janeiro:LTC, 2000.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, A. H.; KANING, L. K.. **Teoria e pratica naindústria farmacêutica**. Edição da Fundação Calouste Gulbenkian, 2001

ANEXO A – Cromatograma por LC-MS de EEB da *Arrabidaea chica* H.B.K verlot no tempo de 0-15min



ANEXO A2 -Cromatograma por LC-MS de EEB da Arrabidaea chica H.B.K verlot no tempo de 10 qa 40min



ANEXO A3 -Cromatograma por LC-MS de EEB da Arrabidaea chica H.B.K verlot no tempo de 30-70min

