



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

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA CARACTERIZAÇÃO DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO DE FOLHAS DE *Mikania lindleyana* DC. POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).**

ALEX OSELU OWITI

Belém-PA

2011



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

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATO
HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Mikania lindleyana* DC. POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aluno: Alex Oselu Owiti

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa

Belém-PA
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Owiti, Alex Oselu.

Desenvolvimento de um método para caracterização do Extrato Hidroetanólico das Folhas de *Mikania Lindleyana* DC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) / Alex Oselu Owiti

Belém, 2011. 72p.; il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos), Instituto de ciências da saúde/ Universidade Federal do Pará.

Orientador: Barbosa, Wagner Luiz Ramos.

1. *Mikania lindleyana* DC, 2. cumarina, 3.cromatografia, 4.extrato hidroetanólico.

CDD. 615.321

ALEX OSELU OWITI

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA CARACTERIZAÇÃO DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO DE FOLHAS DE *Mikania lindleyana* DC. POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).**

Banca examinadora

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa
Faculdade de Farmácia – UFPA

Prof.Dr. Jose Otávio Carrera Silva Jr.
Faculdade de Farmácia – UFPA

Prof. Dr. Carlos Emerson
Faculdade de Química – UFPA

Aprovado em: ____/____/____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, acima de tudo, por ter me trazido para o Brasil e ter me coberto com suas asas, por ter me mostrado outra parte do mundo com pessoas e culturas diferentes, ter me direcionado para a Farmácia, ter me conduzido com seu Espírito Santo e me dado a Sabedoria necessária para escolher o caminho certo.

Jesus Cristo por sua intercessão constante.

Aos meus amigos por estarem sempre ao meu lado nas horas felizes e difíceis, em especial, aos meus irmãos Peter Owiti e Frank Otieno Owiti por ter tido a coragem de abrir mão de seus sonhos para que os meus se realizassem.

Ao meu amigo, Lailson Aguiar por seu apoio, incentivo e oração.

Ao pessoal da Igreja Batista Memorial em Curado II Pernambuco.

Pr. Edmilson Lopez Paes pelas orações constantes.

Aos amigos do Quênia: Shailen J. Visaria Mrs. Savji, Mr. e Mrs. Kuguru, Mrs. Okoth.

À minha família lá no Quênia.

Aos colegas que me acompanharam nesses oito anos desde o meu curso de Graduação em Farmácia, Bioquímica até o mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica que me deram ajuda durante a execução desse projeto.

Ao governo Brasileiro que através da CAPES, me concedeu a ajuda financeira em forma de bolsa durante o período da realização deste projeto.

À minha colega Andressa Santa Brígida que me ajudou grandemente na formatação deste trabalho.

À minha amiga Sonia Vieira e os amigos do seminário T. B. Equatorial pelo apoio.

Ao Professor Wagner Barbosa pela orientação.

À Dra. Fernanda Ilkiu do Laboratório de Botânica da EMBRAPA-Amazônia oriental, pela ajuda na anatomia foliar da planta em estudo.

RESUMO

Mikania lindleyana DC (Asteraceae) é uma trepadeira arbustiva, perene, lenhosa e sem gavinhas, com caule volúvel, cilíndrico estriado, verde e ramoso. É utilizada na Amazônia como diurético, antiinflamatório, analgésico, anti-hipertensivo, antiulceroso. Este trabalho teve por objetivo desenvolver um método para caracterização do extrato hidroetanólico das folhas de *M. lindleyana* DC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O extrato hidroetanólico (tintura) preparado conforme a FARMACOPÉIA BRASILEIRA V, 2010 foi submetido, após secagem, a análise fitoquímica, por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e por CLAE. Na prospecção química, observou-se a presença de cumarinas, alcalóides, aminoácidos, açúcares redutores, fenóis, taninos, esteróides, terpenos, saponinas e ácidos orgânicos. Na análise das frações (hexânica, clorofórmica e acetato de etila), do extrato hidroetanólico bruto e da cumarina (1mg/mL) por CCD, utilizando como eluente tolueno/diclorometano/acetona (45:25:30) observou-se no UV (365nm) bandas fluorescentes de cor verde clara (R_f 0.61) características de cumarina. Na análise do extrato bruto e da fração clorofórmica por CLAE e uma solução metanólica de cumarina pura a 0,1 mg/mL, utilizando como eluente metanol/água (47:53), picos no R_t de cerca de 6.00 minutos foram observados correspondentes a espectro característico com máximos de absorção entre 270 nm e 300 nm. Os resultados demonstram a presença de cumarina em EHEB e FC. nas respectivas quantidades de 0,014 no EHEB e 0,209 na FC.

Palavras chaves: CCD, cumarina, LC-DAD, Sucurijú, marcador.

ABSTRACT

Mikania lindleyana DC (Asteraceae), vernacular “Sucuriju”, is a creeping, shrubby, perennial, evergreen plant, growing in the Amazon region where it is used as diuretic, anti-hypertensive, anti-inflammatory and anti-ulcerous medicine. The main aim of this study was to develop a method for characterization of hydro-ethanolic extract (tincture) from the leaves of *M. lindleyana* DC, using UV and High performance Liquid Chromatography (HPLC). The hydro-ethanolic extract (tincture) was prepared based on Brazilian Pharmacopeia V, 2010 and its dry residue was submitted to phytochemical analyses, Thin Layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid chromatography (HPLC). Among the substances observed in the phytochemical analysis was coumarin, alkaloids, amino acids, reducing sugars, phenols, tannins, steroids, terpenes, saponins and organic acids. TLC test was done by applying hexanic, chloroformic and ethyl acetate Fractions together with Crude hydro-ethanolic extract and aqueous solution of coumarin Aldrich® 0,1mg/ml on the same plate using toluene/dichloromethane/acetone (45:25:30) as the eluent system. The chromatogram was then sprayed with an alcoholic solution of KOH 5%, and then observed under UV light at 254nm and 365 nm, revealing a light green band at an R_F -0.61 for chloroformic fraction, crude hydro-ethanolic extract and for coumarin samples. The HPLC analysis was conducted using methanol/water 53:47 as the eluent system. The chloroformic fraction (CL), coumarin and the crude hydro-ethanolic extract (CHE) showed peaks at Retention time around 6.00minutes and spectra with maximum absorptions between 270nm and 300nm. This clearly demonstrate the presence of coumarins in the samples (CL= 0.209mg/mL and CHE= 0.014mg/mL).

Key words: Coumarins, TLC, LC-DAD, Sucurijú, Asteraceae, Marker

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Folha de <i>M. lindleyana</i> DC.....	18
Figura 2	Estrutura da cumarina.....	24
Figura 3	Biossíntese da cumarina.....	25
Figura 4	Derivados da cumarina.....	26
Figura 5	Metabolismo da cumarina.....	27
Figura 6	Vista frontal de folha de <i>M. lindleyana</i> DC Face abaxial; es:estômatos ; tg: tricoma glandular, ds:ducto secretor.....	39
Figura7	Vista frontal de epiderme; Face adaxial tt:tricoma tector.....	39
Figura 8	Epiderme abaxial da folha de <i>M. lindleyana</i> DC mostrando tricoma glandular.....	40
Figura 9	Esquema da anatomia básica de corte transversal do limbo da folha de <i>M. lindleyana</i> DC mostrando; A) epiderme, B) parênquima paliçádica C) parênquima lacunoso D) nervura lateral observada em objetiva de 10 x sem imersão.....	40
Figura 10	Nervura central da folha de <i>M. lindleyana</i> mostrando A) canal secretor B) Floema C) xilema observada em objetivo de 10x sem imersão.....	41
Figura 11	Nervura central e limbo da folha de <i>M. lindleyana</i> DC mostrando A) canal secretor B) Floema C) xilema D) parênquima paliçádico E) parênquima lacunoso F) epiderme G) nervura lateral, H) colênquima, observada em objetivo de 4 x sem imersão.....	41
Figura 12	Distribuição granulométrica de pó de <i>M. lindleyana</i> DC.....	42
Figura 13	Curva TG em ar de pó das folhas de <i>M. lindleyana</i> DC,mostrando os picos TGA que correspondem a perda de água (A) e perda de massa decorrente á degradação de matéria orgânica (B e C).....	48
Figura 14	Curva DTG de pó das folhas de <i>M. lindleyana</i> DC, mostrando os picos que correspondem a perda de água (A) e perda de massa decorrente da degradação de matéria orgânica (B e C).....	48
Figura 15	Curva termogravimetrica diferencial (DTA) de cumarina Aldrich® mostrando pico para ponto de fusão.....	49
Figura 16	TGA de cumarina Aldrich® em ar mostrando pico correspondente á perda de massa.	49

Figura 17	Curva DTG de cumarina Aldrich® em ar mostrando pico correspondente á perda de massa.	50
Figura 18	Curva TG de extrato hidroetanólico seco de <i>M. lindleyana</i> DC em ar, mostrando os picos TGA que correspondem a; perda de água (A) e perda de massa decorrente á degradação de matéria orgânica (B e C).....	50
Figura 19	Cromatograma por CCD da fração hexânica (FH), fração clorofórmica FC), fração de acetato de etila (FAET). extrato hidroetanólico bruto (EHEB) e cumarina Aldrich® (CUM).....	54
Figura 20	Cromatograma de CLAE do extrato hidroetanólico registrado a 270nm usando como eluente metanol/ água 53:47.....	55
Figura 21	Cromatograma de cumarina Aldrich® a 1mg/mL dissolvido em água eluido em metanol/ água a 53:47.....	55
Figura 22	Diagrama do pico da cumarina mostrando contorno do espectro no UV.....	56
Figura 23	Co-injeção no CLAE de extrato hidroetanólico e cumarina injetada com eluente de metanol/ água a 53:47.....	56
Figura 24	Cromatograma de CLAE da fração clorofórmica do extrato hidroetanólico em metanol/Água 43:57, detectado a 270 nm.....	56
Figura 25	Co-injeção da fração clorofórmica (FC) e registrado a 270nm.....	57
Figura 26	Curva de calibração preparada apartir de resultados obtidos pela análise da cumarina por CLAE.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variação de pesos durante o processo da determinação de teor de cinzas das folhas da <i>M. lindleyana</i> DC.....	40
Tabela 2	Resultados da abordagem fitoquímica do extrato hidroetanólico seco das folhas da <i>M. lindleyana</i> DC (sucurijú).....	45
Tabela 3	Dados termogravimétricos (TG) e termodiferenciais (DTA) em ar do pó de folhas de <i>M. lindleyana</i> DC, extrato hidroetanólico seco e de cumarina.....	52
Tabela 4	Dados de RMN ¹³ C, de cumarina obtido em CDCl ₃	54
Tabela 5	Concentrações de soluções da cumarina e as suas respectivas médias das áreas correspondentes.....	58
Tabela 6	Teor de cumarina total em extrato hidroetanólico bruto de <i>M. lindleyana</i> DC e sua fração clorofórmica.....	58

LISTA DE FLUXOGRAMAS

01	Prospecção de cumarina no extrato hidroetanólico da <i>M. lindleyana</i> DC suas Frações.....	36
----	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CLAE: Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

FR: Fator de retenção (Retention Factor- Inglês)

TR: Tempo de retenção (Retention Time- Inglês)

UV: Ultravioleta

EHEB: Extrato Hidroetanólico Bruto

Fc: Fração Clorofórmica

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CLAE/DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/ com detector de arranjo de diodos

DTA: Differential Thermogravimetric Analysis

DTG: Derivative Thermogravimetry

FDA: Food and Drug Administration

OMS: Organização Mundial de Saúde

TG: Termogravimetria

SUS: Sistema Único de Saúde

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Classificação Botânica de <i>M. lindleyana</i> D.C.....	17
2.2 Gênero <i>Mikania</i>.....	17
2.3 <i>Mikania lindleyana</i> DC.....	18
2.4 Principais Técnicas Analíticas utilizadas no Desenvolvimento, Avaliação e Controle de Qualidade de Fitoterápicos.....	19
2.4.1 Cromatografia.....	19
2.4.2 Análise térmica.....	21
2.5 Cumarina.....	24
2.5.1 Biossíntese das cumarinas.....	25
2.5.2 Derivados da cumarina.....	26
2.5.3 Metabolismo de cumarina.....	26
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
4 MATÉRIA E MÉTODOS.....	29
4.1 Equipamentos.....	29
4.2 Reagentes e soluções.....	29
4.3 Matéria Vegetal e Preparo da Droga.....	30
4.4 Análise anatômica das folhas de <i>M. lindleyana</i> DC.....	30
4.5 Determinação da distribuição granulométrica do pó das folhas de <i>Mikania lindleyana</i> DC.....	31
4.6 Análise térmica de pó de <i>M. lindleyana</i> DC.....	32
4.6.1 Determinação de perda por dissecação da tintura de <i>m. lindleyana</i> DC.....	31
4.6.2 Determinação do teor de cinzas totais do pó das folhas de <i>Mikania lindleyana</i> DC.....	32
4.7 Obtenção da tintura das folhas de <i>M. lindleyana</i> DC.....	32
4.7.1 Determinação da densidade aparente da tintura das folhas de <i>M. lindleyana</i> DC.....	32

4.7.2 Determinação do pH de tintura das folhas de <i>M. lindleyana</i> DC.....	32
4.7.3 Determinação do resíduo seco da tintura de <i>m. lindleyana</i> DC.....	33
4.7.4 Obtenção do extrato seco da tintura de <i>M. lindleyana</i> DC.....	33
4.8 Abordagem Fitoquímica do extrato hidroetanólico de <i>M. lindleyana</i> DC.....	33
4.9 Análise termogravimétrica (TG) do pó, do extrato hidroetanólico seco das folhas de <i>M. lindleyana</i> DC, e da cumarina Aldrich®.....	34
4.10 Análise da cumarina por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	35
4.11 Determinação do perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico das folhas de <i>M. lindleyana</i> DC por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	35
4.12 Fracionamento do extrato hidroetanólico seco de <i>M. lindleyana</i> DC.....	36
4.13 Análise quantitativa da cumarina no extrato hidroetanólico de <i>M. lindleyana</i> DC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de Diodos (CLAE/DAD).....	36
4.14 Preparação das soluções padrões de cumarina Aldrich®.....	36
4.15 Curva de calibração.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Descrição anatômica das folhas da <i>M. lindleyana</i> DC.....	38
5.2 Determinação da distribuição Granulométrica do pó das folhas de <i>M. lindleyana</i> DC.....	42
5.3 Perda por Dissecção do extrato hidroetanólico (tintura) de <i>M. lindleyana</i> DC.....	43
5.4 Determinação de Cinzas Totais do pó das folhas de <i>M. lindleyana</i> DC.....	43
5.5 Densidade Aparente do extrato hidroetanólico (tintura) das folhas <i>M. lindleyana</i> DC.....	44
5.6 Cálculo do pH do extrato hidroetanólico (tintura) de <i>M. lindleyana</i> DC.....	44
5.7 Resíduo Seco do extrato hidroetanólico (tintura) de <i>M. lindleyana</i> DC.....	45

5.8 Rendimento do extrato e frações do extrato hidroetanólico de <i>M. lindleyana</i> DC.....	45
5.9 Resultado de Análise Fitoquímica do extrato das frações de <i>M. lindleyana</i> DC.....	45
5.10 Resultados da análise termogravimétrica do pó, extrato hidroetanólico da <i>M. lindleyana</i> DC e da cumarina Aldrich®.....	46
5.11 Resultados de análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de cumarina Aldrich®.....	51
5.12 Resultado de Cromatografias em camada delgada (CCD) de extrato hidroetanólico de <i>M. lindleyana</i> DC e das suas frações.....	52
5.13 Análises de extrato hidroetanólico da <i>M. lindleyana</i> DC e da sua fração clorofórmica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	54
5.13.1 Quantificação de cumarina no extrato e na fração clorofórmica de <i>M. lindleyana</i> DC.....	57
6 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais da Amazônia correspondem a uma grande parcela da biodiversidade do mundo e são amplamente utilizadas pela população local como remédios caseiros e também como matéria-prima para fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos industrializados. (JARDIM *et al* 2007)

No Brasil, o mercado de fitoterápicos correspondia, em 1994, a um valor estimado em US\$ 355 milhões, o que representava 0,5% do valor total das vendas de medicamentos (OMS, 2002), não se considerando a associação de princípios ativos de origem vegetal com aqueles de outra natureza. Em 1998, este mesmo mercado foi estimado em US\$ 566 milhões (OMS, 2002)

É importante ressaltar a dificuldade na obtenção de informações sobre o volume real movimentado num país como o Brasil, devido ao mercado informal interno forte, onde sementes, raízes e folhas são vendidas nas ruas e feiras de muitas cidades (RITTER *et al*, 2004). O crescimento do mercado de fitoterápicos, no Brasil, é da ordem de 15% ao ano, enquanto o mercado de medicamentos sintéticos cresce em torno de 3 a 4% (JARDIM *et al*, 2007).

O aumento do uso de fitoterápicos pela população mundial também tem se traduzido na preocupação com a qualidade destes produtos, devido aos problemas comumente encontrados referentes a autenticidade, pureza e composição química das matérias-primas vegetais o que contribui para um fitoterápico de má qualidade (CARVALHO *et al.*, 2007). No mercado brasileiro, estes problemas são freqüentemente encontrados em várias regiões do país (RITTER *et al.*, 2004).

O estudo do uso de plantas para vários fins nas comunidades tradicionais está se tornando uma necessidade importante, especialmente na região dos trópicos. Tais comunidades vêm sofrendo crescentes pressões econômicas e culturais da sociedade com conseqüências drásticas para as suas culturas tradicionais (JARDIM *et al*, 2007).

O conhecimento acumulado por estas populações é devido aos séculos de contato direto com o meio ambiente, e, várias pesquisas vêm demonstrando a presença de um amplo conhecimento sobre os recursos naturais nas comunidades tradicionais, as quais além de indicar o uso de espécies em potencial, podem vir a ensinar novos modelos para seu uso e manejo (AMOROZO, 2002).

No mundo moderno, a utilização de plantas medicinais para cura de moléstias está condicionada a um processo de experimentação que vem se desenvolvendo desde os tempos mais remotos, constituindo assim a base da fitoterapia, a qual vem sendo retomada pela medicina ocidental, que procura aproveitar suas práticas, dando-lhes respaldo científico e integrando-as num conjunto de princípios que visam mais do que curar algumas doenças, restituir o homem à vida natural (BUCHILLET, 1991).

A medicina tradicional, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é o conjunto de todos os conhecimentos teóricos e práticos, utilizados para explicar, prevenir e suprimir transtornos físicos, mentais ou sociais, baseados exclusivamente na experiência e na observação, transmitido oralmente ou por escrito de uma geração a geração (COELHO-FERREIRA, 2000). Deste modo, a realização de pesquisas com plantas medicinais pode contribuir para melhorar o uso dos recursos vegetais pela população local, bem como subsidiar indicadores para novas e eficazes drogas no combate a diversas patologias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação Botânica de *M. lindleyana* D.C

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Tribo: Eupatorieae

Família: Asteraceae

Gênero: Mikania

Espécie: *Mikania lindleyana*

2.2 Gênero *Mikania*

O gênero *Mikania* apresenta cerca de 450 espécies (Holmes 1996). com distribuição tropical, mas com presença também nas áreas temperadas da América e sudeste da África. Para o Brasil são citadas cerca de 170 espécies (KING e ROBINSON, 1987).

No Rio Grande do Sul, ocorrem 39 espécies. Há dois grandes centros de diversidade do gênero na América do Sul. O primeiro, com aproximadamente 170 espécies (cerca de 150 endêmicas), localiza-se desde Minas Gerais e Rio de Janeiro até o Paraná e Santa Catarina, com muitas espécies estendendo-se até o Paraguai, Uruguai e Argentina. O segundo, com aproximadamente 150 espécies (cerca de 130 endêmicas), que se localiza da Colômbia até a Bolívia (HOLMES, 1995).

2.3 *Mikania lindleyana* DC

Mikania lindleyana D.C (sucurijú) só floresce quando cultivada em locais onde possa receber luz solar direta, sendo conhecida popularmente como sucurijuzinho, erva-das-serpentes, cipó-sucuriju entre outros nomes. É uma planta muito usada na medicina popular, na região amazônica, ela é popularmente conhecida como sucurijú e tem as seguintes alegações de uso: antiinflamatório, analgésico, anti-hipertensivo, antiulceroso, além de ser usado nos casos de picadas de cobras e insetos (SARTÓRIO et al., 2000).

Esta espécie é uma trepadeira arbustiva, perene, lenhosa e sem gavinhas (garras para se prender), com caule volúvel, cilíndrico estriado, verde e ramoso, pertencente à família Asteraceae (Compositae) e ao gênero *Mikania*, originária da América do Sul e do Brasil (PANIZZA, 1997).

Apresenta folhas opostas, de cor verde-brilhante, pecioladas, cordiformes, de consistência lisa, quase coriácea e triangular, de bordo inteiro e com três nervuras na base. Suas inflorescências são verdes e alcançando até 30 cm de comprimento. (PANIZZA, 1997).

Muitas pessoas no estado do Pará utilizam as folhas da *Mikania lindleyana* DC na forma de chá das folhas frescas com fins terapêuticos sem conhecer as qualidades de matéria vegetal sendo usado, além disso, não se costuma fazer o uso dessa planta em forma de tintura ou de outras formas.



Figura 1: folhas da *M. lindleyana* DC

Cumarina simples (1,2-benzopirona) é um dos principais constituintes da *Mikania sp* (OSÓRIO et al,2008). É definida como o marcador químico para controle de qualidade de formulações a base das *Mikania sp*, conforme a Lista de registros simplificada de fitoterápicos da ANVISA, instrução normativa 05, de 2010.

As principais técnicas para padronização de derivados de *Mikania* baseadas na cumarina e seus derivados são a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por cromatografia gasosa (VILEGAS et al.,2007). Entretanto, as cumarinas apresentam espectro ultravioleta característico, devido à natureza e posição dos substituintes químicos, favorecendo sua identificação e o desenvolvimento de métodos espectrofotométricos para a sua análise (BRUNETON, 1991).

A forma mais utilizada para administração de *M. lindleyana* DC é o decocto (extrato aquoso). A complexidade da composição do extrato da *M. lindleyana* DC pode interferir no doseamento espectrofotométrico das cumarinas, já que alguns metabólitos nele presentes podem absorver na mesma faixa de comprimento de onda próxima àquela da cumarina (SHAKEEL-U-REHMAN et al, 2010).

2.4 Principais Técnicas Analíticas utilizadas no Desenvolvimento, Avaliação e Controle de Qualidade de Fitoterápicos

2.4.1 CROMATOGRAFIA

Quando alguns dos constituintes químicos de uma preparação vegetal são conhecidos, é realizada a caracterização destes compostos usando-se a cromatografia analítica qualitativa como a CCD, é complementada com a determinação quantitativa das substâncias presentes nessas preparações por meio da CLAE ou da Cromatografia Gasosa analítica, obtendo-se, assim, uma correlação entre quantidade dos compostos presentes e sua eficácia terapêutica e farmacológica.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permite a realização de análises qualitativas e quantitativas de modo eficaz, uma vez definidas as condições

de análise, o cromatograma forma uma espécie de gráfico característico (perfil cromatográfico) devido aos diferentes tempos de retenção e intensidades de absorção de seus constituintes, em que a proporção entre os seus componentes deve ser constante (SHARAPIN, 2000).

Com o auxílio de detectores espectrofotométricos, obtém-se o espectro de absorção correspondente a cada pico do “fingerprint” que pode ser comparado com espectros presentes em bancos de dados para auxiliar a identificação. Devem ser utilizados padrões para comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção característicos para cada composto. Em preparações que não se conhece a totalidade dos constituintes químicos, compostos dominantes ou marcadores químicos podem ser utilizados para a sua caracterização, mesmo não estando relacionados com a atividade do extrato (VOLPATO, 2005).

Para análises qualitativas e quantitativas do perfil químico de extratos de plantas e ou fitoterápicos, é necessário o uso de várias técnicas analíticas acopladas ou hifenadas que permitam a separação, identificação e mesmo a quantificação e padronização dos vários metabólitos e ou marcadores químicos presentes na planta ou espécie vegetal envolvida (ROCHA, 2000).

O termo técnicas hifenadas refere-se ao acoplamento de duas ou mais técnicas analíticas com o objetivo de obter uma ferramenta analítica mais eficiente e rápida do que as técnicas convencionais. As técnicas analíticas químicas mais empregadas na análise de produtos a base de plantas medicinais são a cromatografia e a espectroscopia.

As técnicas a serem acopladas deverão gerar informações diferentes, ou seja, serem ortogonais. Um exemplo típico é o acoplamento de métodos eficientes de separação como a CL e CG, com técnicas espectrométricas como espectrometria no UV-Vis , espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN), que fornecem informações adicionais sobre a estrutura química dos componentes da amostra, funcionando como detectores.

Desta forma, a escolha do detector torna-se fundamental quando o analito se encontra em nível de traços, necessitando de baixos limites de detecção (RODRIGUES et al., 2005).

Detectores baseados em absorção de luz ultravioleta (UV), fluorescência, índice de refração, difração de luz e eletroquímica proporcionam uma boa detecção e sensibilidade, porém pouco ou nenhuma informação estrutural. A introdução das

técnicas acopladas tais como CLAE/UV equipada com um arranjo de diodos (CLAE/UV-DAD) e o acoplamento com a espectrometria de massa (CLAE/EM), proporcionou um real avanço na identificação estrutural de produtos naturais (LINDON et al., 1997; RODRIGUES et al, 2005).

Dentre as técnicas analíticas utilizadas para a caracterização e controle de qualidade do derivado da droga vegetal (tintura), destaca-se a CLAE equipada com um arranjo de diodos – CLAE-DAD que é uma técnica amplamente utilizada na análise de produtos naturais desde que o analito apresente grupos cromóforos que causem a absorção de luz na região de UV-visível, caracterizando compostos conhecidos, através da comparação do tempo de retenção e espectro UV com o padrão analítico fornecido por um banco de dados (ROCHA, 2000).

2.4.2 ANÁLISE TÉRMICA

A análise térmica é definida como grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus derivados é medida em função da temperatura e/ou tempo, enquanto essa amostra é submetida a um programa controlado de temperatura.

Os resultados são fornecidos na forma de curvas, as quais contêm as informações a respeito da variação do parâmetro (DTA, TG, DTG) medido (GIRON, 2002; SILVA *et al.*, 2007).

As potenciais aplicações da análise térmica na indústria farmacêutica são inúmeras e giram em torno da investigação físico-química de produtos farmacêuticos e uso de ponto de fusão como indicador de pureza e reatividade dos constituintes dos produtos finais.

Por isso, tem sido extensivamente utilizada como ferramenta analítica confiável e essencial para o controle de qualidade e desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, tendo em vista o teor de umidade como um dos parâmetros importantes para controle de qualidade dos medicamentos e alimentos (ANDRADE et al,2005), bem como para o estudo da estabilidade, compatibilidade e

das possíveis interações entre fármacos e excipientes e suas misturas, contribuindo dessa forma para estudos de pré-formulação (SANTOS *et al.*, 2008).

No desenvolvimento de diversos estudos, é possível a associação de duas ou mais técnicas termoanalíticas, como por exemplo, a Análise Térmica Diferencial (DTA) ou a (Calorimetria Exploratória Diferencial) DSC com a Termogravimetria (TG).

Em muitas situações, para a solução de problemas, é necessário associar os resultados de análise térmica a resultados obtidos por outras técnicas convencionais físico-químicas e analíticas (MATOS; MACHADO, 2004; SILVA *et al.*, 2007).

Dentre as técnicas termoanalíticas empregadas com maior frequência na indústria farmacêutica estão: a Termogravimetria (TG); Análise Térmica Diferencial (DTA); Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) (ARAÚJO *et al.*, 2006). Na Termogravimetria (TG) o parâmetro a ser medido é a massa, por meio da utilização de uma termobalança que permite medir o ganho ou perda de massa que ocorre na amostra em função de uma variação controlada de temperatura.

O transdutor ou sensor utilizado na termogravimetria é uma balança registradora (LUCAS *et al.*, 2001). As curvas obtidas fornecem informações relativas à composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado.

Dada a natureza dinâmica da variação de temperatura da amostra para originar curvas TG, fatores instrumentais; razão de aquecimento, atmosfera (N₂, ar ou outros), vazão de gás, geometria da porta- amostra e tamanho e forma do forno e relacionados às características da amostra, ou seja; quantidade, Granulométrica, forma cristalina, empacotamento, condutividade térmica, solubilidade dos gases liberados da amostra e calor de reação envolvido que podem influenciar a natureza, a precisão e a exatidão dos resultados experimentais (WENDLANDT, 1986; SILVA *et al.*, 2007).

Análise Térmica Diferencial é a técnica pela qual a diferença de temperatura (ΔT) entre a substância e a matéria de referência (termicamente estável) é medida em função da temperatura, enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura.

A temperatura é medida por termopares conectados aos suportes metálicos das cápsulas de amostra e da matéria de referência, ambos contidos no mesmo

forno. As variações de temperatura na amostra são devido às transições entálpicas ou reações endotérmicas ou exotérmicas.

As curvas DTA representam os registros de Δ em função da temperatura (T) ou do tempo (t), de modo que os eventos são apresentados na forma de picos. Os picos ascendentes caracterizam os eventos exotérmicos e os descendentes os endotérmicos (WENDLANDT, 1986; SILVA et al., 2007).

A DTA, a DSC e a TG podem ser utilizadas, por exemplo, na compreensão dos mecanismos físico-químicos relativos a processos de decomposição térmica ou no estudo e desenvolvimento de novos compostos, entre outros (ANDRADE et al., 2007).

As curvas TG e DSC fornecem informações importantes sobre a propriedade física das substâncias como estabilidade, compatibilidade, cinética, decomposição térmica, fase de transição e polimorfismo (GIRON, 2002; RODRIGUES et al., 2005; SANTOS et al., 2008).

A DSC é a técnica, na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e uma matéria de referência (termicamente estável), em função da temperatura, enquanto a substância e matéria de referência são submetidas a uma programação controlada de temperatura (SILVA et al., 2007).

A pequena quantidade de amostra utilizada, a rapidez de resultados, a nitidez da técnica e a possibilidade de visualização do seu perfil termoanalítico, fazem dessas técnicas poderosas ferramentas no estudo de padronização das matérias-primas vegetais e ensaios de pré-formulação para o desenvolvimento tecnológico de medicamentos fitoterápicos (ARAGÃO et al., 2002; ARAÚJO et al., 2006; SILVA JÚNIOR, 2006; ALVES, 2008).

2.5 Cumarina

A cumarina (Figura 2) é também chamada de 1,2-benzopirona; 2*H*-1-benzopiran-2-ona; lactona de ácido *cis*-o-cumárico; anidrido cumárico e cânfora de caroço de tonka e é uma substância cristalina branca com peso molecular de 146,15; ponto de fusão 68–70°C; e ponto de ebulição variando de 297°C a 299°C, e a sua estrutura consiste de um anel aromático condensado em um anel lactônico.

A cumarina é facilmente solúvel em etanol, clorofórmio, éter dietílico e em óleos, porém é levemente solúvel em água. A maior parte de cumarina encontrada comercialmente é sintetizada a partir de salicilaldeído, porém a cumarina de melhor qualidade é aquela extraída do caroço de tonka (LAKE, 1999).

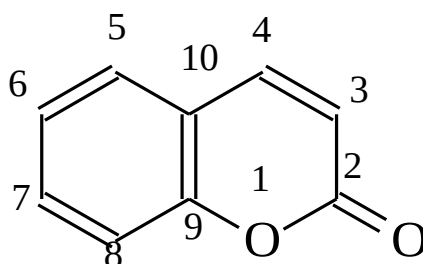


Figura 2: Estrutura da cumarina

2.5.1 BIOSÍNTESE DAS CUMARINAS

O principal precursor da cumarina é ácido cinâmico (Figura 3) que vem da fenilalanina derivada do ácido chiquímico oriundo da via de eritrose-4-fosfato e o ácido fosfoenolpirúvico.

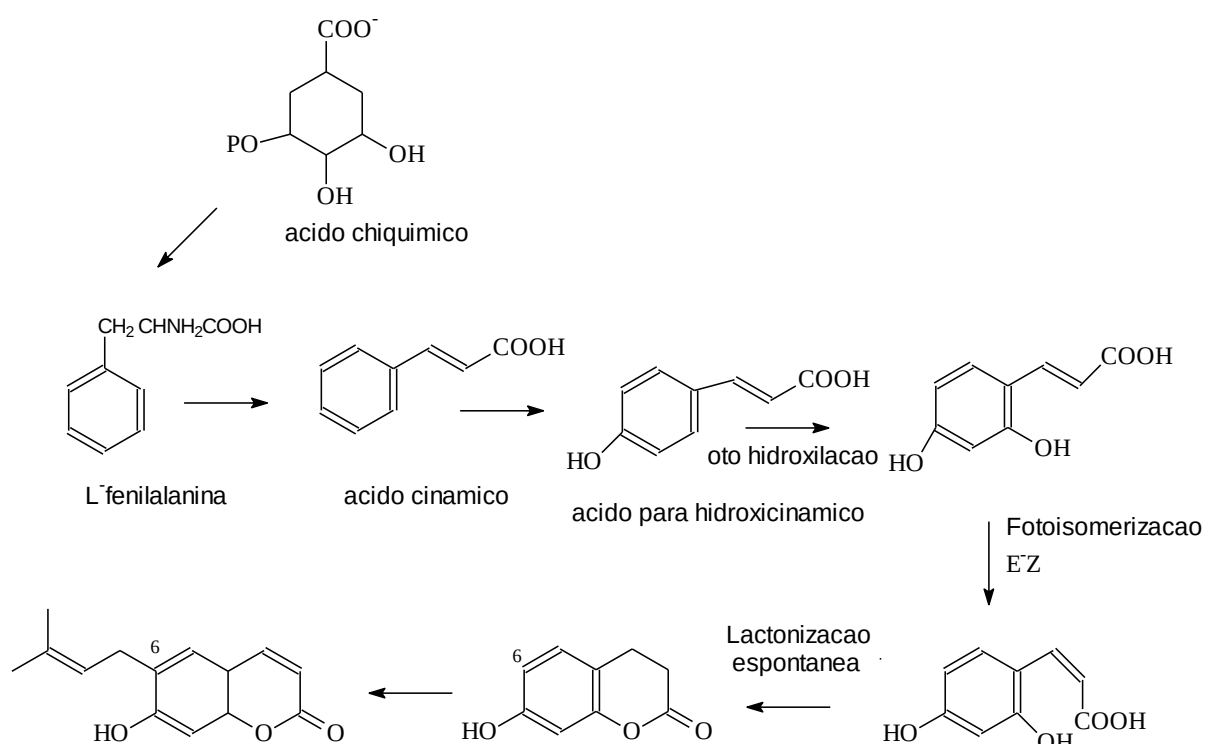


Figura 3: Biossíntese das cumarinas (LAKE,1999)

2.5.2 DERIVADOS DA CUMARINA

Os principais derivados da cumarina são do tipo piranocumarina e furano cumarina, que surgem durante o processo de biossíntese de cumarina segundo Lake (1999) como mostra a Figura 4.

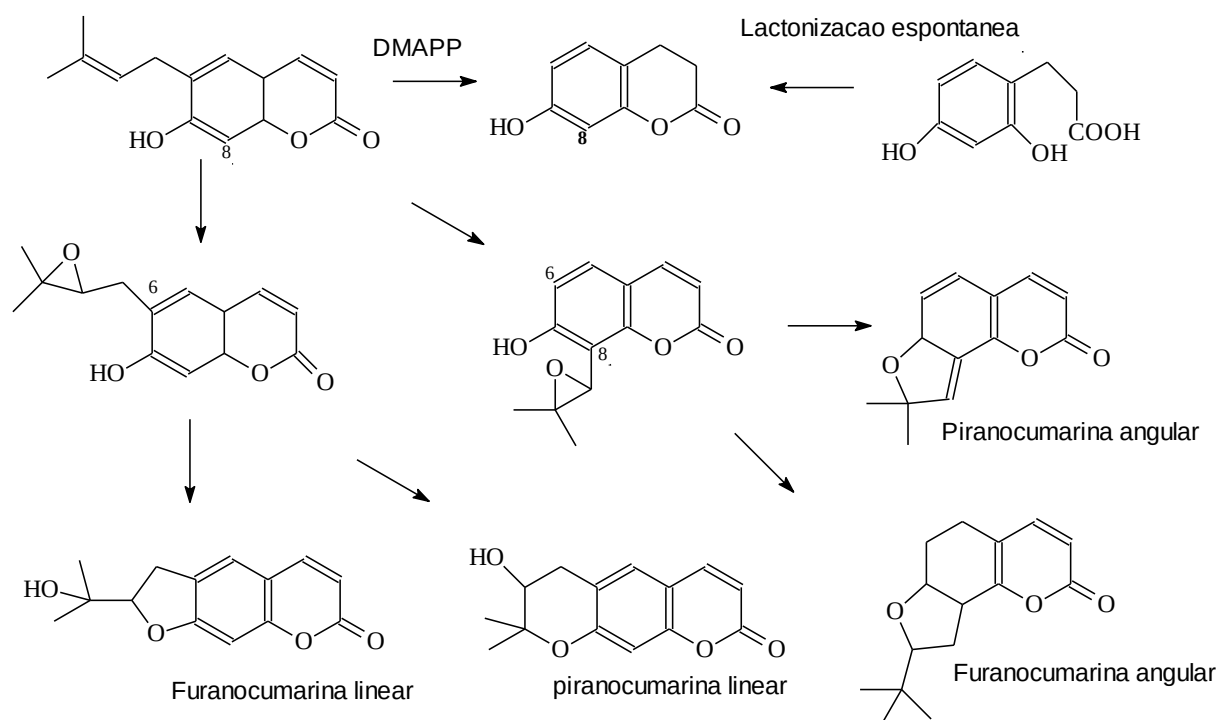


Figura 4: Derivados da cumarina (LAKE, 1999).

2.5.3 METABOLISMO DE CUMARINA

O metabolismo da cumarina ocorre no fígado catalizado pela enzima citocromo p-450, onde a cumarina é convertida em 7-hidroxycumarina.

A cumarina é metabolizada por hidroxilação em todas as seis posições (nos carbonos 3,4,5,6,7 e 8) gerando 3,4,5,6,7e 8-hidroxycumarinas (LAKE,1999) como mostra Figura 5 e também pela abertura do anel lactônico que dá origem aos produtos que incluem o-hidroxifenilacetaldeído; o-hidroxifeniletanol; ácido o-hidroxifenilacético e o ácido o-hidroxifenilático.

Os outros metabólitos resultantes são: 6,7-diidroxicumarina; ácido o-cumarico; ácido o-hidroxifenilpropionico e dihidrocumarina. As rotas metabólicas conhecidas da cumarina são a da 7-hidroxilação e aquela que envolve a abertura do anel lactônico onde o carbono dois é retirado para formar o dióxido de carbono 3-hidroxilação (LAKE, 1999)

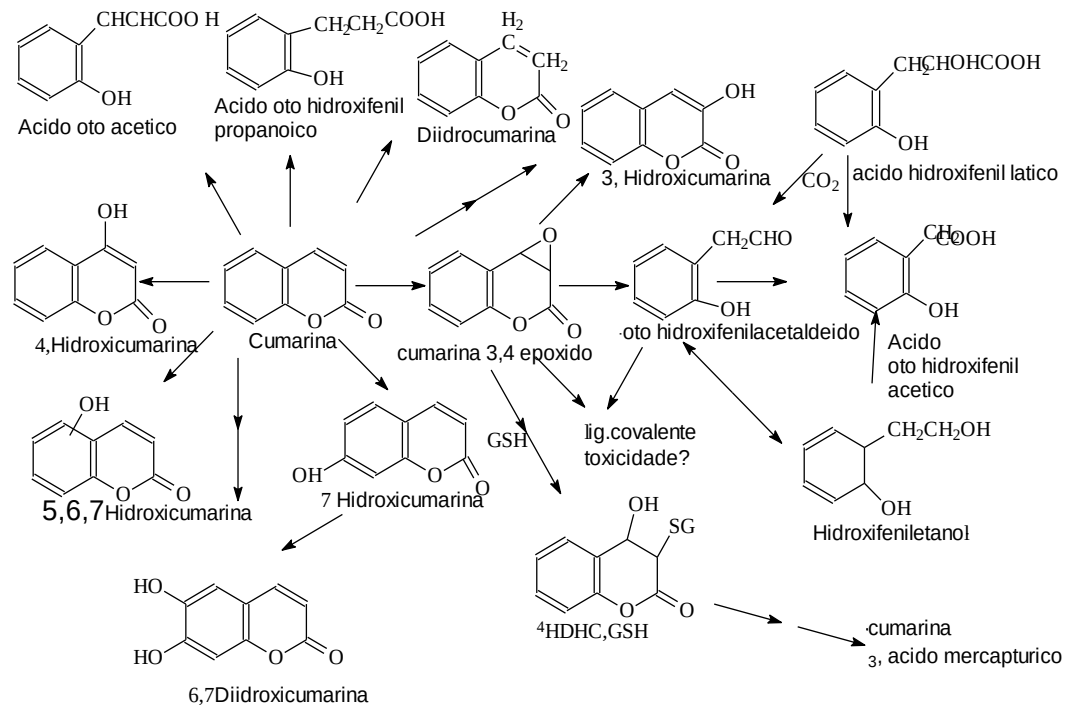


Figura 5: Metabolismo das cumarinas (LAKE,1999).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Contribuir para o desenvolvimento de um método para controle de qualidade dos fitoterápicos contendo *Mikania lindleyana* DC usando métodos cromatográficos e espectroscópicos.

3.2 Objetivos Específicos

- ◆ Descrever as características anatômicas das folhas da *Mikania lindleyana* DC
- ◆ Determinar o perfil fitoquímico do extrato hidroetanólico (tintura) das folhas de *Mikania lindleyana* DC.
- ◆ Determinar o teor de cinzas totais de pó das folhas de *Mikania lindleyana* DC.
- ◆ Caracterizar e quantificar a cumarina no extrato e nas frações obtidas de folhas de *Mikania lindleyana* DC, por CLAE e CCD.
- ◆ Determinar o perfil termoanalítico de pó e de extrato hidroetanólico seco de *Mikania lindleyana* DC por Termogravimetria (TG) e por Análise Térmica Diferencial (DTA)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

Balança analítica 2410 (Bioprecisa) Balança de precisão Mark 2200 (Bel Engineering), Aparelho de luz ultravioleta; UV V02 7101 (Vilber lourmat), PH-metro, Forno mufla; Agitador Eletromagnético para peneiras de marca Bertel; Balança analítica modelo BK 500;

Analizador térmico Shimadzu (DTG 60H); Potenciômetro Meter; Banho de ultra-som Maxiclen modelo1450; Câmara de luz ultravioleta (254 e 365nm); Cromatógrafo Líquido de alta eficiência Merck Hitachi LaChrom® D-7000).

4.2 Reagentes e soluções

Ácido sulfúrico P.A., ácido clorídrico P.A., ácido fosfórico álcool etílico absoluto P.A., metanol P.A., éter etílico P.A., lugol, fucsina básica 1%, azul de Astra, glutaraldeído 2,5%, fosfato de sódio 0,1M, hidroxietilmetacrilato.

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) cloreto de ferro (FeCl₃) 1N e 2N, solução de hidróxido de amônio (NH₄OH) 10 %, solução alcoólica de cloreto férrico 1%. Solução de nitroprussianato de sódio, solução aquosa de niidrina a 1%, solução de ácido clorídrico (HCl) 5%, solução de HCl a 1N e 6N, solução de NH₄OH 6N, solução alcoólica de cloridrato de hidroxilamina 10%, solução alcoólica de hidróxido de potássio (KOH) 10 % e 5%, solução de anidrido acético, raspas de magnésio, água oxigenada (H₂O₂) concentrada.

Reativo de Pascová, reativo de Fehling A e B, 50 reativo de Bouchardat, reativo de Dragendorff, reativo de Mayer, reativo de Bertrand e reativo de Kedde.

4.3 Matéria Vegetal e Preparo da Droga

Foram adquiridos 8 quilogramas de folhas frescas de *Mikania lindleyana* DC (sucuriú) junto a associação Ver-as-ervas em Belém, Pará-Brasil, as quais foram identificadas no Museu Paraense Emilio Goeldi e comparado com uma exsicata já existente registrada sob o número MG16738.

As folhas foram selecionadas e primeiramente lavadas com água corrente e em seguida com etanol a 70% (FARMACOPEIA BRASILEIRA V, 2010)

Depois as folhas foram deixadas para secar sobre uma bancada coberta de papel absorvente a temperatura ambiente por cinco dias e freqüentemente as folhas foram revolvidas e o papel absorvente trocado a cada 24 horas para prevenir a formação de fungos (PEDROSO et al, 2008).

Após a secagem a temperatura ambiente, as folhas desidratadas (dois quilogramas) foram colocadas em estufa e deixadas por dois dias em temperatura de 40°C. As folhas secas resultantes foram moídas em moinho de facas até serem pó o qual foi pesado e acondicionado numa embalagem plástica a vácuo.

4.4 Análise anatômica das folhas de *M. lindleyana* DC

Na dissociação para a obtenção de lâminas semipermanentes das epidermes foliares, utilizaram-se as folhas secas inteiras de *Mikania lindleyana* DC previamente armazenadas em álcool etílico a 70% para análise e colocadas em água destilada por 30 minutos. As partes da folha foram cortadas em pedaços triangulares e deixadas em hipoclorito de sódio 10% até a separação das epidermes (adaxial do abaxial).

As lâminas semipermanentes foram preparadas por separação das epidermes adaxial e abaxial utilizando pincel de tamanho adequado.

Cortes histológicos do limbo e de nervura central foram preparados nos sentidos transversais a mão livre com auxílio de lâmina cortante metálico.

Os cortes transversais foram hidratados, e deixados em hipoclorito de sódio a 10% até a descoloração adequada.

A microscopia e a fotografia foram realizadas usando os cortes transversais e os fragmentos de epidermes adaxial e abaxial corados empregando-se azul de Astra e fucsina básica (ROESER, 1972). Após a coloração, aplicaram-se as técnicas convencionais para montagem das lâminas semipermanentes (BERLYN & MIKSHE, 1976).

Para a vedação das lâminas utilizou-se esmalte de unha incolor e depois as lâminas foram submetidas a observação sob microscópio de luz com objetivo de 4x e 10x respectivamente. As fotografias foram feitas com uma câmera o modelo *Motic Image Plus 2.0*. (TOLEDO et al, 2004)

4.5 Determinação da distribuição granulométrica do pó das folhas de *Mikania lindleyana* DC

Na determinação de perfil granulométrica de pó das folhas de *M. lindleyana* DC, utilizou-se um agitador eletromagnético acoplado a uma série de tamises de abertura de malha (1.700 µm, 710 µm, 355 µm, 250 µm, 125 µm) onde cerca de 3 g do pó foram agitados por 30 minutos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA V, 2010).

O processo foi repetido por três vezes sempre pesando o pó retido em cada tamiz. A média dos pesos do pó retido foi calculada e um gráfico de distribuição granulométrica foi traçado.

4.6 Análise térmica de pó de *M.lindleyana*

4.6.1 DETERMINAÇÃO DE PERDA POR DISSECAÇÃO

O teor de umidade baseou-se na perda por Dissecação, onde cerca de 2 g do pó de *Mikania lindleyana* DC foram pesados em pesa-filtros, previamente dessecados por 30 min. em estufa a 105°C, utilizando-se balança analítica.

As amostras foram submetidas a aquecimento em estufa a 105°C durante duas horas, seguidos de resfriamento em dissecador e pesagem.

A operação foi repedida até obtenção de pesos constantes. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA V,2010). Os resultados de três determinações foram avaliados em termos de porcentagem ponderal sobre a quantidade da amostra, utilizando a equação 1: $\% \text{ perda} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$

Onde:

P_a = peso da amostra (g)

P_u = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da Dissecação (g)

P_s = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a Dissecação (g)

4.6.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS DO PÓ DAS FOLHAS DE *MIKANIA LINDLEYANA* DC

Para se estabelecer a quantidade de substâncias residuais não voláteis realizou-se a determinação de cinzas totais. Cerca de 2 g do pó de *M. lindleyana* DC, foram pesados em cadinhos de porcelana, previamente calcinados em forno

mufla, resfriados e pesados. As amostras nos cadinhos foram incineradas em mufla a 450 °C por duas horas, resfriadas em dissecador sob vácuo e pesadas.

A operação foi repetida até a obtenção de pesos constantes (FARMACOPÉIA BRASILEIRA V, 2010.).

4.7 Obtenções do extrato hidroetanólico das folhas de *M. lindleyana* DC

Na obtenção da tintura em estudo, utilizou-se o método de extração por maceração descrita em Farmacopéia Brasileira 5ª Edição, 2010. Assim, 169 g do pó folhas de *Mikania lindleyana* DC permaneceram em maceração durante 10 dias em 2000 g de etanol 70 °GL num recipiente fechado ao abrigo da luz e temperatura ambiente (25°C).

A solução foi agitada freqüentemente, e após o término da extração, efetuou-se a filtração do macerado (extrato hidroetanólico).

4.7.1 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE APARENTE DA TINTURA DAS FOLHAS DE *M. LINDLEYANA* DC

A análise da densidade aparente da tintura foi realizada em triplicata segundo a metodologia proposta pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA V, 2010, onde um picnômetro com capacidade para 5 mL, previamente tarado, foi preenchido com o líquido padrão (água recém-destilada e fervida) e pesado. Em seguida, o picnômetro foi lavado com a amostra (tintura de *Mikania lindleyana*) e pesado.

4.7.2 DETERMINAÇÃO DO PH DE TINTURA DAS FOLHAS DE *M. LINDLEYANA* DC

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 e os resultados correspondem à média de três determinações independentes (FARMACOPÉIA BRASILEIRA V,2010).

4.7.3 DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO SECO DA TINTURA DE *M. LINDLEYANA* DC

Para uma cápsula de fundo plano de cerca de 50 mm de diâmetro e cerca de 30 mm de altura, pesou-se rapidamente 2 g da tintura. As amostras em triplicata foram evaporadas à secura em banho Maria e secadas na estufa a 100-105°C durante três horas. Em seguida, foram arrefecidas em dessecador em presença gel de sílica anidro R e pesadas. Os resultados foram expressos em percentagem m/m (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002).

4.7.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO DA TINTURA DE *M. LINDLEYANA* DC

Para a obtenção do extrato seco da tintura de *M. lindleyana* DC adicionaram-se 300 mL da tintura de *M. lindleyana* DC num balão de fundo redondo acoplado a um evaporador rotativo para concentração da tintura evaporando-se o líquido extrator (etanol).

A retirada do extrato do balão volumétrico foi feita com metanol e clorofórmio, auxiliada por um banho de ultra-som e transferido para uma placa de Petri devidamente tarada e pesada. Logo após, obteve-se o peso do extrato seco de *Mikania lindleyana*. DC (BARBOSA et al, 2003)

4.8 Abordagem fitoquímica do extrato hidroetanólico apartir das folhas de *Mikania lindleyana* DC

O extrato teve os metabólitos secundários presentes detectados por testes realizados em triplicata por prospecção em via úmida (BARBOSA et al, 2003). Onde foi determinada a presença de cada um utilizando os reativos respectivos.,

Na análise Fitoquímica da tintura, investigou-se qualitativamente a presença de metabólitos secundários em triplicata, na concentração de 5 mg/ml, (BARBOSA ,2001).

4.9 Análises termogravimétricas (TG) de pó, do extrato hidroetanólico das folhas de *Mikania lindleyana* DC e da cumarina Aldrich®.

Para obtenção da curva termogravimétrica (TG), utilizou-se uma massa em torno de 5 mg de cada uma das amostras; cumarina Aldrich®, extrato hidroetanólico seco e pó das folhas secas de *Mikania lindleyana* DC, que foram submetidas a uma faixa de temperatura entre 25°C e 600 °C, com auxílio de um analisador térmico Shimadzu (modelo: DTG-60H), sob atmosfera dinâmica de ar (50,00 mL/min) e razão de aquecimento de 5°C/min. (MOTHE G.C et al., 2004).

4.10 Análise da cumarina Aldrich® por RMN

A amostra de cumarina foi submetida à análise por RMN em um aparelho de marca NMR-300MHz, modelo Mercury-plus, onde cerca de 5mg da amostra de padrão foi analisada utilizando CDCl₃ e os resultados de ressonância foram comparados com valores da literatura (shakeel-u-rehman, 2010).

4.11 Determinação do perfil cromatográfico da tintura das folhas de *Mikania lindleyana* por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para a separação das substâncias e determinação do perfil cromatográfico da tintura das folhas de *Mikania lindleyana* DC por CCD, foi utilizada a técnica de cromatografia por adsorção em placa de gel de sílica (COLLINS et al., 2006). O marcador químico utilizado como padrão foi cumarina Aldrich® na concentração de 1mg/mL.

O método consistiu na comparação do fator de retenção (R_f) e da cor desenvolvida pela zona cromatográfica apresentada pela amostra analisada e padrão comercial (cumarina Aldrich®) concomitantemente, conforme dados descritos em literatura (WAGNER; BLADT, 2001).

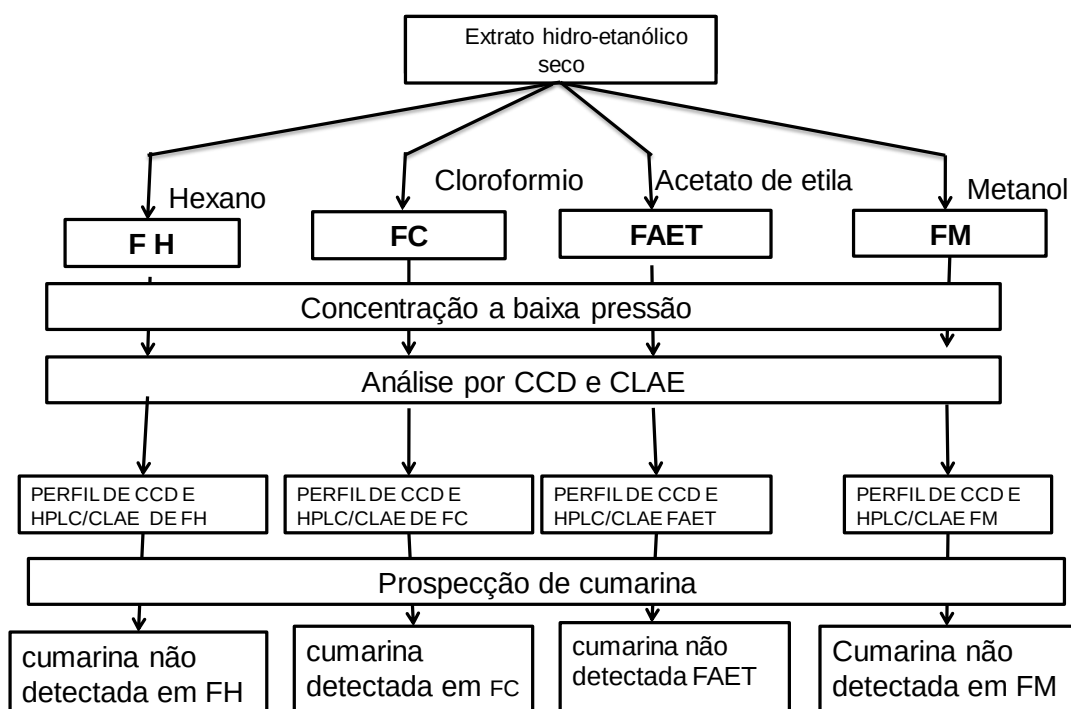
Desta forma, a tintura, as frações e o padrão foram aplicados com auxílio de microtubo capilar nas quantidades exatas sobre cromatoplasas pré-fabricadas de gel sílica de fase normal (Merck®) previamente ativada em estufa a 105 °C.

A forma de desenvolvimento adotada foi, utilizando como fase móvel um sistema, tendo eluente de tolueno/diclorometano/acetona (45:25:30) As placas foram colocadas em cubas cromatográficas previamente saturadas com a fase móvel.

Após o desenvolvimento cromatográfico, as placas foram secas e reveladas com o reagente uma solução etanólica de KOH a 5%) adequado para a visualização de cumarina por ação de radiação ultravioleta em comprimento de onda de 365 nm (WAGNER; BLADT, 2001). Logo após, as placas cromatográficas foram fotografadas e o valor do fator de retenção (R_f) de cada zona cromatográfica foi calculado.

4.12 Fracionamentos do extrato hidroetanólico das folhas de *Mikania lindleyana* DC

Na preparação das frações, cinco gramas do extrato hidroetanólico seco foram tratados com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol exaustivamente. Esse tratamento resultou em frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAET) e metanólica (FM). Os rendimentos das frações foram calculados e expressos em porcentagens m/m.



Fluxograma 01: Prospeção de cumarina no extrato hidroetanólico da *M. lindleyana* DC e suas Frações.

4.13 Análise quantitativa da cumarina na tintura de *Mikania lindleyana* DC por (CLAE/DAD)

A análise da tintura de *M. lindleyana* DC foi realizada em um Sistema Merck® Hitachi modelo LaChrom-7000, utilizando-se uma coluna LiChroCART125-4 ODS

eluída por 30.00 minutos, com um fluxo de 0,8 mL de metanol/água 47:53 por minuto. A temperatura da análise foi de 25°C ±1°C. A detecção foi na faixa de 200 nm a 400 nm. Sendo a detecção e a quantificação da cumarina realizada segundo Bilia *et al.* (2001).

Foram analisadas as amostras de extrato hidroetanólico bruto, fração Clorofórmica e cumarina padrão

As condições cromatográficas foram otimizadas para o objetivo do trabalho, utilizando-se soluções padrões de cumarina (Aldrich®) onde a vazão, a constituição da fase móvel e o comprimento de onda de detecção no intervalo de 270 nm a 400 nm foram alterados em relação a literatura.

4.14 Preparação das soluções padrões de cumarina Aldrich®

Para quantificação foram utilizadas soluções padrão de cumarina preparadas por dissolução em volumes apropriados de água, a fim de fornecer as concentrações de 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 mg/mL. As soluções foram filtradas sobre membrana de Millipore® 0,45 µm.

4.15 Curva de calibração

A curva de calibração para a cumarina foi construída apartir da faixa de intervalo encontrada. Sendo assim, as médias das áreas de cada concentração de cumarina foram plotadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações nas abscissas.

A regressão linear foi realizada para obtenção da equação da reta ($y = a + bx$) e o coeficiente de Pearson (r) para avaliar a correlação entre a concentração e a relação das áreas (FDA, 2001; ANVISA, 2006).

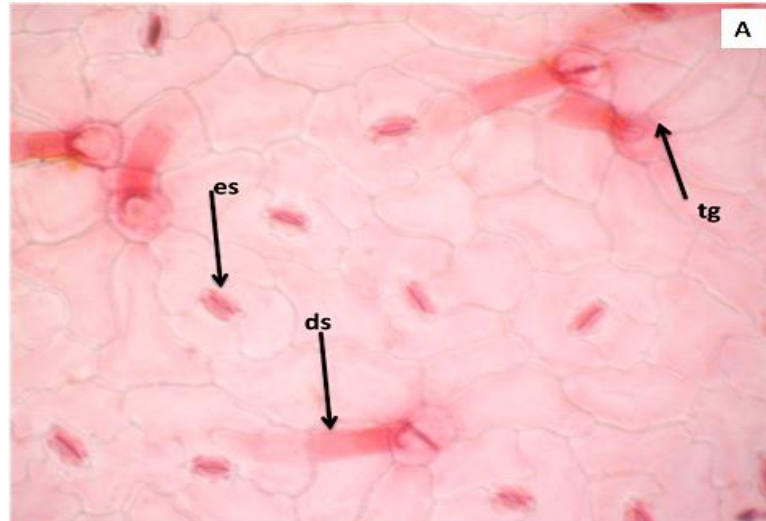
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados de anatomia das folhas da *M. lindleyana* DC.

Em relação aos caracteres anatômicos, a lâmina foliar apresenta, em vista frontal, células de contorno sinuoso, de paredes anticlinais levemente espessas. A folha apresenta estômatos do tipo normocíticos e anisocíticos na face abaxial, caracterizando a folha como hiperestomática (Figura 6) e estes se localizam no mesmo nível das demais células epidérmicas. Sobre o sistema de revestimento, ocorre presença de cutícula delgada e levemente estriada. Evidencia-se tricomas glandulares pluricelulares unisseriados, formados por cerca de seis células.

Em secção transversal da folha de *Mikania lindleyana* DC o mesófilo é do tipo dorsiventral, sendo constituído por cerca de duas camadas de parênquima paliçádico e aproximadamente três estratos de parênquima lacunoso (Figura 11), que evidencia grandes espaços intercelulares subjacente à epiderme adaxial, observa-se uma camada contínua de células de formato retangular, alongadas no sentido periclinal e maiores que as células epidérmicas (Figura 9). Mostrou também a epiderme e a camada subepidérmica com células retangulares um pouco maiores que aquelas de epiderme. Observou-se também a presença de cutícula delgada levemente estriada na parte adaxial.

Esses caracteres vão ao encontro dos dados relatados para a família da espécie em estudo (OLIVEIRA et al., 1986)



(Figura 6: Vista frontal da folha de *M. lindleyana* mostrando a face abaxial com; es) estômatos ; tg) tricoma glandular; ds) ducto secretor.

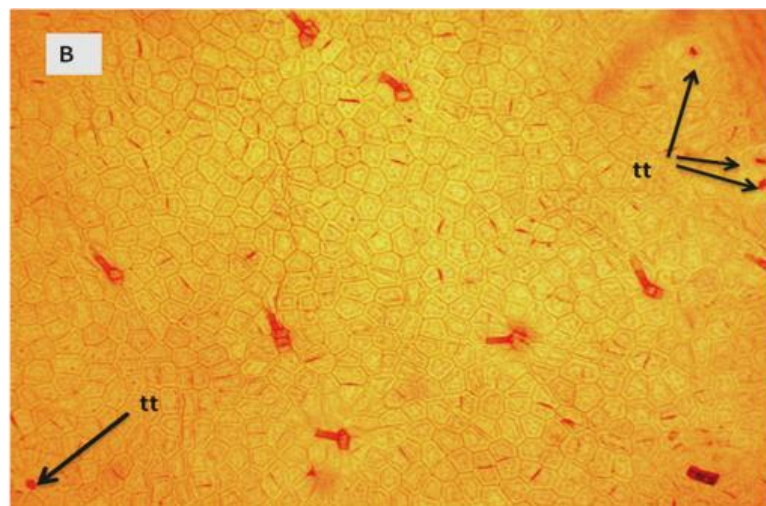


Figura 7: Vista frontal de epiderme ; Face adaxial tt:.tricoma tector.

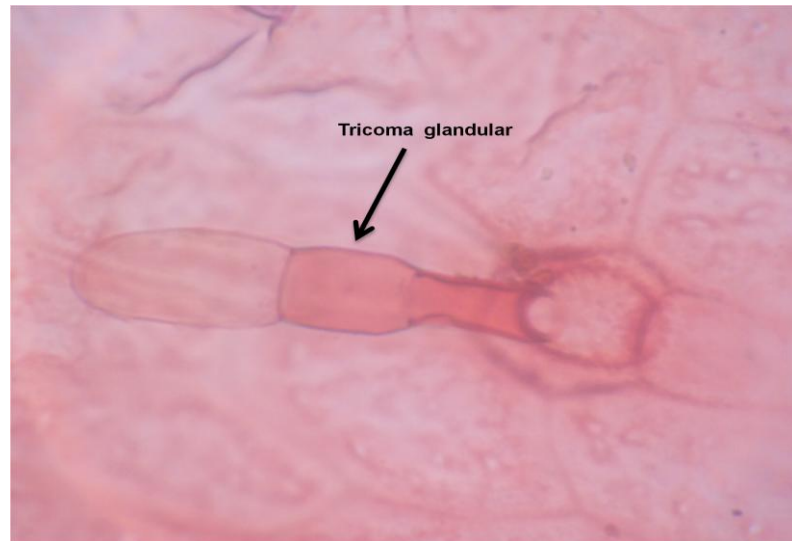


Figura 8: Epiderme abaxial da folha de *M. lindleyana* DC mostrando tricoma glandular

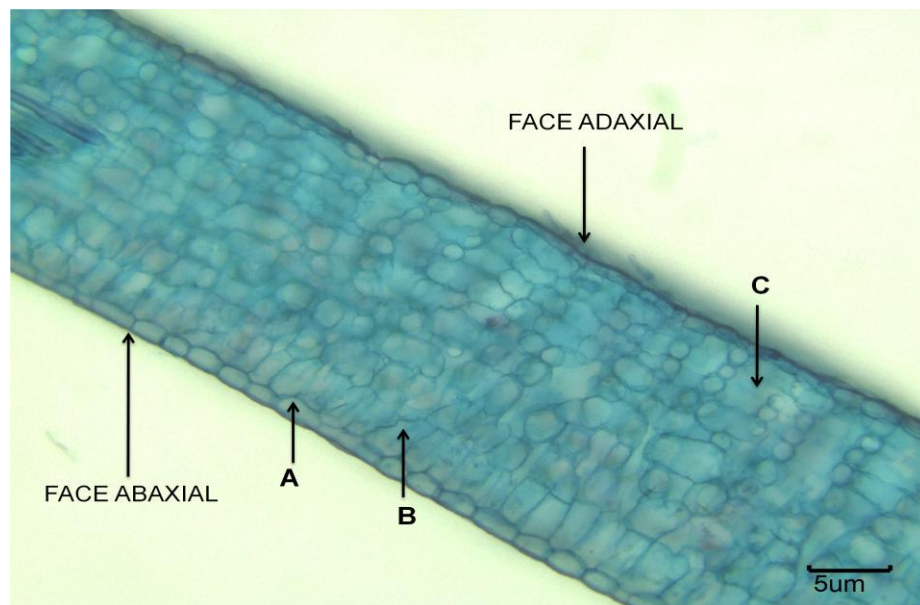


Figura 9: Esquema da anatomia básica de corte transversal do limbo da folha de *Mikania lindleyana*. A) epiderme, B) parênquima paliçádica C) parênquima lacunoso D) nervura lateral, observada em objetiva de x10 sem imersão

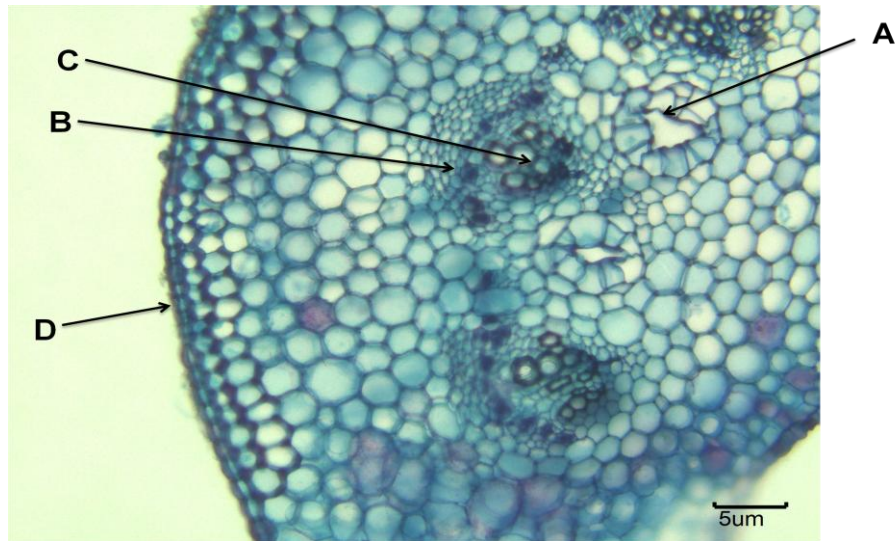
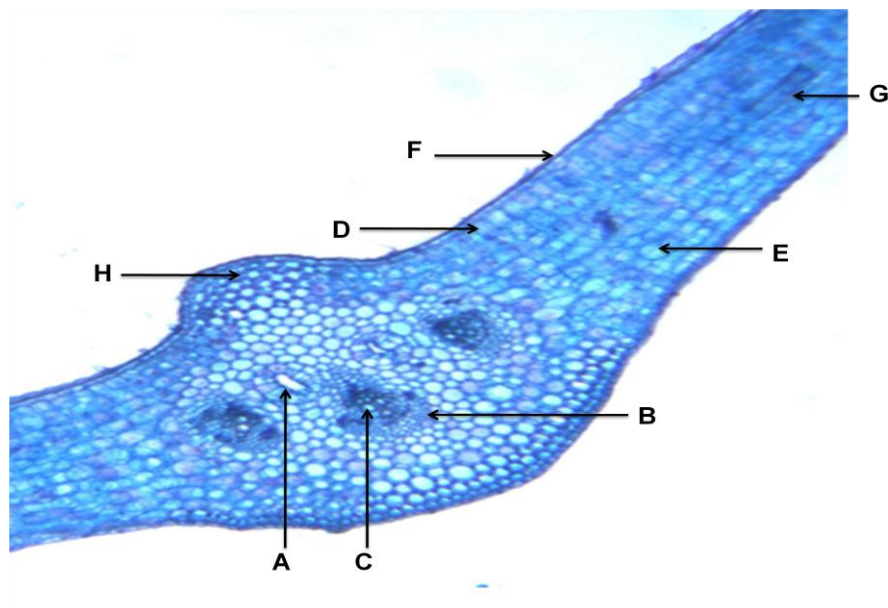


Figura 10; Nervura central da folha de *Mikania lindleyana* mostrando A) canal secretor B) floema C) xilema observada em objetivo de 10x sem imersão



(Figura 11: Nervura central e limbo da folha de *M. lindleyana* DC mostrando A) canal secretor B) Floema C) xilema D) parênquima paliçádico E) parênquima lacunoso F) epiderme G) nervura lateral, H) colênquima, observada em objetivo de 4x sem imersão

5.2 Determinação da distribuição granulométrica do pó das folhas de *Mikania lindleyana* DC

Após a tamisação do pó da droga vegetal (folhas de *Mikania lindleyana* DC), constatou-se que as partículas do pó passaram em sua totalidade pelo tamiz de malha 1700 μm e menos de 40% passaram pelo tamiz de malha 355 μm , caracterizando-o como pó grosso de acordo com a Farmacopéia Brasileira (5ª edição, 2010), como mostra a (Figura 12)

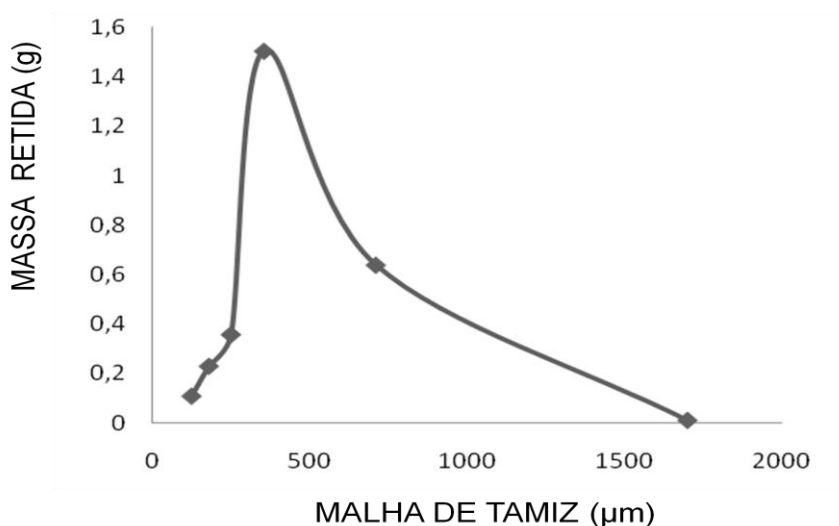


Figura 12: Distribuição granulométrica de pó de *M. lindleyana* DC

5.3 Perda por Dissecação da droga vegetal

Após o cálculo da médias das massas obtidas para perda por dissecação obteve-se o valor de $13,52\% \pm 0,5$.

A perda por Dissecação é um método analítico que determina o teor de matéria volátil do vegetal a 105 °C, ou seja, que expressa o percentual de umidade residual da droga vegetal.

Este tipo de análise é importante, uma vez que pode oferecer informações a cerca das condições de armazenamento da droga vegetal. Sob o ponto de vista tecnológico e de produção, este resultado é de grande relevância no controle de qualidade.

5.4 Determinação de cinzas totais de pó das folhas de *M. lindleyana* DC.

Na determinação do teor de cinzas totais do pó das folhas de *M. lindleyana* DC, após o cálculo da média das massas de cada pesagem ($\pm 0,05$) (Tabela 1), obteve-se o valor de 0.348g de resíduo o que corresponde à 17,067% $\pm 0,5$ (m/m).

A realização deste ensaio permite verificar prováveis impurezas inorgânicas não-voláteis, e quando o teor de cinzas é superior ao permitido, provavelmente seja indício de procedimentos de colheita e pós colheita inadequados (SHARAPIN, 2000; SOUSA *et al.*, 2003) ou a metabolização de metais e a incorporação deles nos metabólitos.

Tabela 1: Determinação de teor de cinzas das folhas da *Mikania lindleyana* DC.

Peso de cadinho	Media de Pesos cadinho + amostras	Media de Peso cadinho + cinzas	n
25,200g	27,288g $\pm 0,05$	25,556g $\pm 0,05$	3
27,612g	29,639g $\pm 0,05$	27,959g $\pm 0,05$	3
45,417g	47,425g $\pm 0,05$	45,759g $\pm 0,05$	3

n= número de determinações

Perda de massa = 1,693g

Resíduo = 2,041 – 1,693g = 0,348g, %=17,067% $\pm 0,5$

5.5 Densidade Aparente do extrato hidroetanólico (tintura) de *M. lindleyana* DC

O valor da densidade aparente encontrado foi de $0,88 \text{ g/cm}^3 \pm 0,05$, o qual se manteve dentro do limite preconizado para tinturas que é de 0,87 e $0,98 \text{ g/cm}^3$ (PRISTA et al., 1990).

A avaliação da qualidade de uma tintura inicia-se com a análise da matéria prima ou droga vegetal utilizada para sua obtenção, atentando-se principalmente para a identificação botânica ou zoológica (DESMICHELLE, 1987).

Após o processo de produção, as tinturas devem passar por vários ensaios dentre eles a identificação, observação de características organolépticas, determinação da densidade, do resíduo seco, do teor alcoólico e doseamento de compostos marcadores (FONSECA; LIBRANDI, 2008).

Todos estes ensaios são importantes para assegurar a qualidade, atendendo a uma especificação pré-estabelecida, este entendimento pode se aplicar na caracterização e controle de qualidade da tintura obtida a partir do pó das folhas de *M. lindleyana* DC.

5.6 pH do extrato hidroetanólico (tintura) de *M. lindleyana* DC

O valor de pH encontrado para a tintura de *M. lindleyana* DC foi de 5,0 caracterizando-a como ácida. Este resultado representa um dado determinante na escolha dos adjuvantes empregados na formulação fitoterápica, além de ser um fator de influência na estabilidade de formulações a base dessa planta (MACIEL et al., 2006).

5.7 Resíduo Seco do extrato hidroetanólico (tintura) de *M. lindleyana* DC

O percentual de resíduo seco da tintura determinado a 105°C e foi de 10,6 % (m/m), sendo assim esse percentual é um indicativo da concentração da tintura de *M. lindleyana* DC.

A determinação do resíduo seco é um parâmetro fundamental e preliminar quando se objetiva alcançar a eficácia de uma formulação fitoterápica, pois este ensaio implica na quantificação das substâncias extraídas da planta através da eliminação do solvente extrator.

5.8 Rendimento do extrato seco e das frações da tintura de *M. lindleyana* DC

O rendimento geral do extrato hidroetanólico bruto seco foi de 19,8 gramas enquanto o rendimento das frações obtidas a partir de 5g do extrato foi o seguinte: FH 0.7g (0.15%), FC 0.9g (0.18%), FH 1.3g (26%) FM 2.1g (42%)

5.9 Resultados de Análise Fitoquímica Da *M. lindleyana* DC

Na análise fitoquímica realizada detectou-se na amostra, a presença de derivados de cumarina, alcalóides, fenóis, taninos, sesquiterpenolactonas, esteroides, triterpenoides, saponinas espumídicas, ácidos orgânicos e polissacarídeos, porém os resultados foram negativos para flavonóides contrariando os resultados obtidos por MENDES, 2002 (Tabela 2).

Pela análise Fitoquímica realizada segundo metodologia descrita por Barbosa (2001), foi possível estabelecer o perfil químico da tintura de *M. lindleyana* DC, um parâmetro preliminar para o seu controle de qualidade e caracterização da matéria-prima

Tabela 2: Resultado da abordagem fitoquímica do extrato hidroetanólico seco das folhas da *Mikania lindleyana* DC (sucurijú)

Metabolito	RESULTADO
Saponinas espumílicas	Positivo
Ácidos orgânicos	Negativo
Açúcares redutores	Positivo
Polissacarídeos	Positivo
Amino ácidos e proteínas	Positivo
Fenóis e taninos	Positivo
Flavonóides	Negativo
Purinas	Negativo
Glicosídeos cardíacos	Positivo
Catequinas	Positivo
Esteróides e triterpenos	Positivo
Derivados da cumarina	Positivo
Alcalóides	Positivo
Antraquinonas	Positivo

5.10 Resultados da Análise Termogravimétrica de pó das folhas de *M. lindleyana* DC, seu extrato hidroetanólico bruto e da cumarina Aldrich®.

O pó das folhas secas de *Mikania lindleyana* DC apresentou 3 etapas de termodecomposição (Figura 13 e 14), A primeira etapa de termodecomposição (48,16°C -119,65°C) apresentou uma perda de massa de 0,533mg, um percentual de aproximadamente 13,31%, que pode está relacionada com a eliminação da água adsorvida nas partículas do pó, (Figura 14 e Tabela 3). A segunda etapa (265,79°C-342,62 °C) apresentou um percentual de perda de massa de 39,13% (1,567mg),

esta significativa perda de massa está relacionada com a decomposição de matéria orgânica, (COSTA et al.,2002).

Na terceira etapa, no intervalo de temperatura entre 491,57°C e 516,37°C observou-se a perda de massa de 1,178mg (29,41%) podendo ser visualizada nas curvas TG (Figura 14). Essas perdas estão associadas à decomposição térmica de matéria orgânica, (ARAÚJO et al., 2006).

O estudo termogravimétrico (TG) da cumarina Aldrich[®], apresentou um comportamento térmico com uma etapa de termo-decomposição (Figura 15; 16 e Tabela 3). A etapa entre 194,41°C e 227,42 °C apresentou uma perda de massa de 4,394mg (99,88%), podendo ser confirmada pelo pico observado na curva de DTA (Figura 15), o qual pode ser relacionada a quebra de matéria orgânica. (ARAUJO et al.,2006)

Como não se observou nenhuma perda de massa no primeiro pico de 69^o C na curva DTA da cumarina (Figura 15) e a curva sendo endotérmica, logo acredita –se que esse seja o ponto de fusão de cumarina (LAKE, 1999)

A caracterização térmica do extrato hidroetanólico seco da *M. lindleyana* DC, apresentou três etapas de decomposição térmica (Figura 18 e Tabela 3). A primeira etapa de termodecomposição (112,73°C-174, 40°C) apresentou perda de massa de 1.098mg, um percentual de aproximadamente 25,37%, que pode está relacionado com a eliminação da água adsorvida entre as partículas do extrato.

A segunda etapa (258,97°C-332, 36°C) apresentou perda de massa de 0,750mg, um percentual de 17,36%.Esta perda de massa está relacionada com a decomposição de matéria orgânica (COSTA et al.,2002). A terceira etapa de termo-decomposição ocorreu na região de 485,54 a 557,06°C.com perda de massa de 0,788mg (18,29%), essa perda de massa também corresponde à eliminação de matéria orgânico (ZHANG et al..2008),

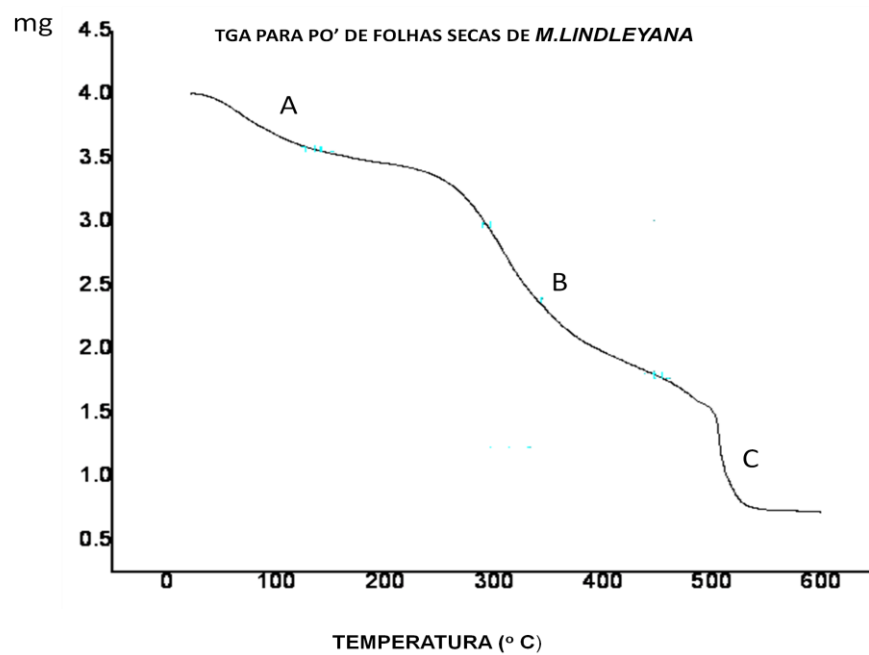


Figura 13: Curva TG em ar de pó das folhas de *M. lindleyana* DC, mostrando os picos TGA que correspondem à perda de água (A) e perda de massa decorrente da degradação de matéria orgânica (B e C)

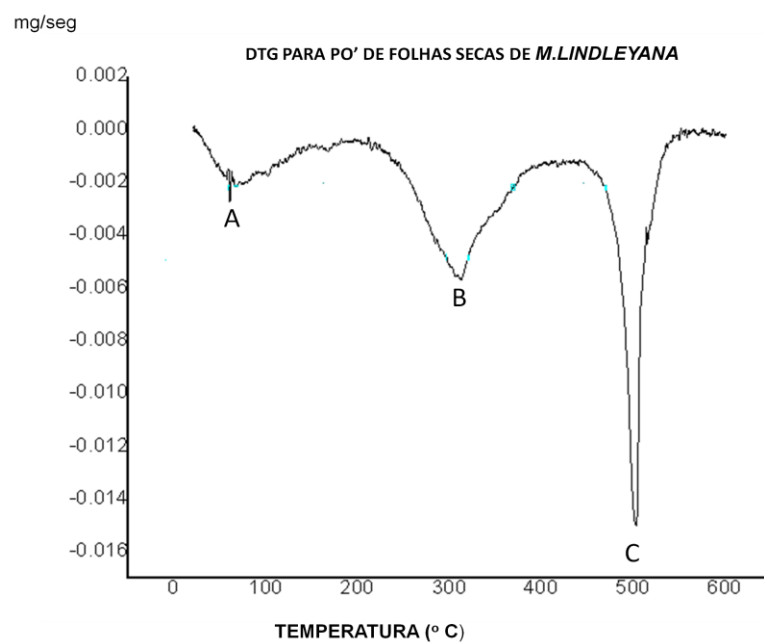


Figura 14. Curva DTG de pó das folhas de *M. lindleyana* DC, mostrando os picos que correspondem à perda de água (A) e perda de massa decorrente da degradação de matéria orgânica (B e C)

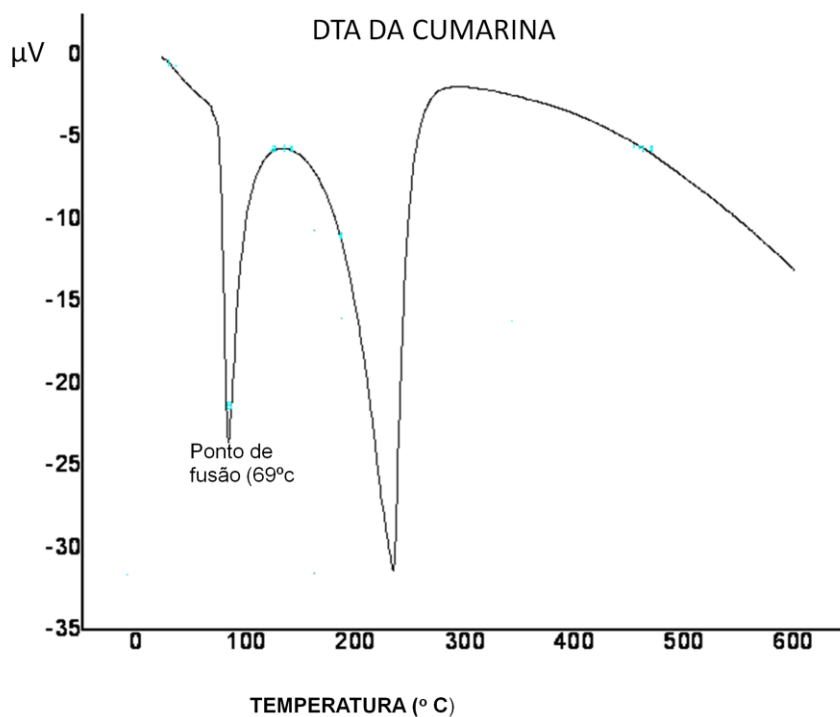


Figura 15. Curva termogravimetrica diferencial (DTA) de cumarina Aldrich® mostrando pico de ponto de fusão.

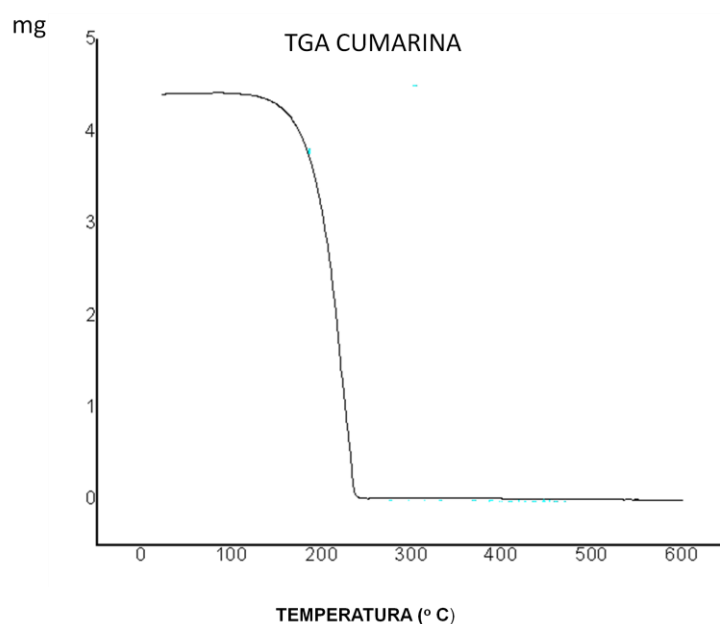


Figura 16. TGA de cumarina Aldrich® em ar mostrando pico correspondente à perda de massa

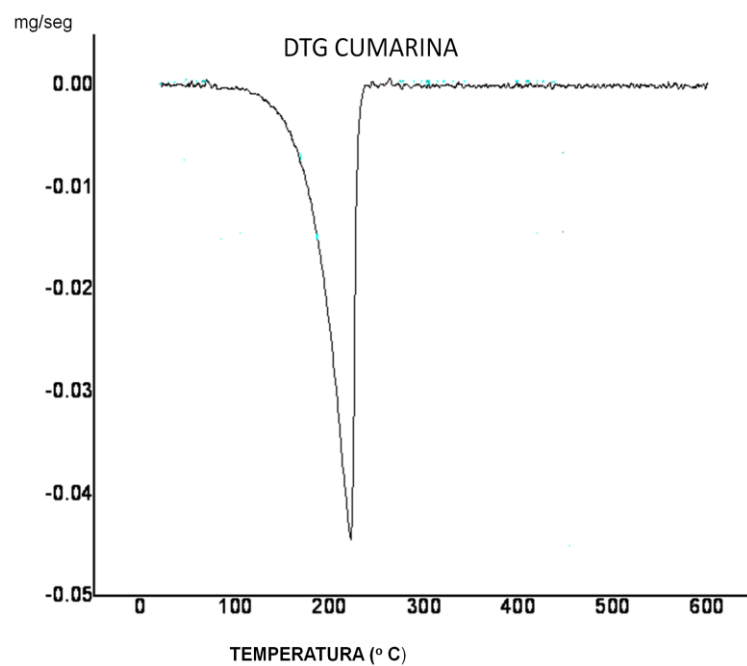


Figura 17. Curva DTG de cumarina Aldrich® em ar mostrando pico correspondente à perda de massa

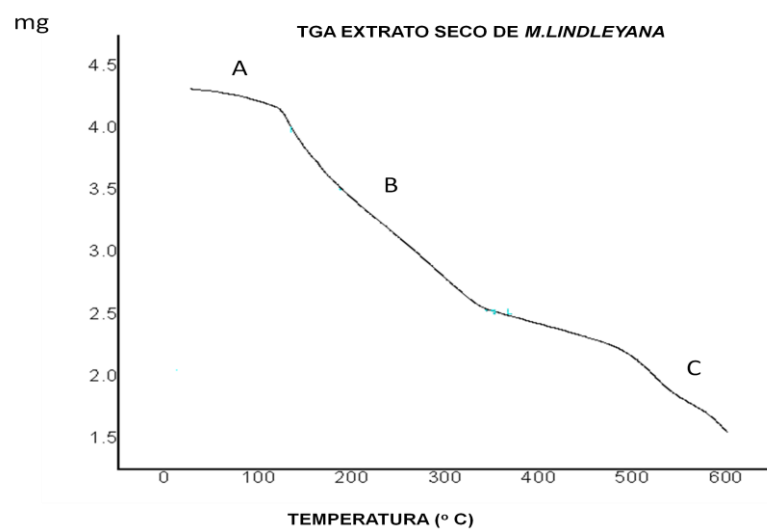


Figura 18 Curva TG em ar de extrato hidroetanólico seco de *M. lindleyana* DC, mostrando os picos TGA que correspondem à perda de água (A) e perda de massa decorrente da degradação de matéria orgânica (B e C)

Tabela 3: Dados termogravimétricos (TG) e termodiferenciais (DTA) em ar do pó de folhas de *Mikania lindleyana* DC, da cumarina e do extrato hidroetanólico seco.

Amostra	Etapas de termo-decomposição	Temperatura de termo-decomposição Inicial (0C)	Temperatura de termo-decomposição Final (0C)	Perda de massa (%)
Pó de folhas de <i>M. lindleyana</i> DC	1	48,97	119,65	13,31
	2	265,79	342,62	39,13
	3	491,57	516,37	29,41
Cumarina (Aldrich®)	1	194,41	227,42	99,88
Extrato hidroetanólico seco de <i>Mikania lindleyana</i> DC	1	112,73	174,40	25,37
	2	258,97	332,36	17,37
	3	485,54	557,06	18,29

5.11 Análises por RMN da cumarina Aldrich®.

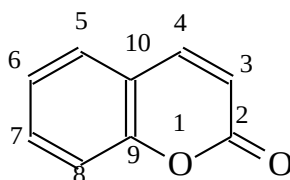
Na análise por RMN, observou-se que a amostra analisada foi a de cumarina simples, sem grupos funcionais.

O posicionamento da ressonância de cada carbono se baseou no efeito substitutivo da conhecida ordem de divisão dos espectros acoplados aos prótons e a consistência interna. A energia positiva indica ressonância deslocada em relação a CDCl_3 . (Tabela 4)

Há uma ordem de desimpedimento geral para todos os carbonos exceto o C-3 o que se aplica em cumarina. As deslocamentos observados são atribuídos a protonação do oxigênio da carbonila. (SHAKEEL-U-REHMAN *et al.* 2010)

O efeito de desimpedimento está associado à perda de densidade da carga para os carbonos da mesma hibridação, portanto há uma grande contribuição da ressonância na carga positiva em C-2 e C-4 os quais podem ser utilizados para explicar o efeito de desimpedimento observado nos carbonos (STANLEY, 1975) e o deslocamento químico de hidrogênio (Tabela, 4)

Tabela 4: Dados de RMN ^{13}C e ^1H de cumarina(Aldrich®) obtido em CDCl_3 em comparação com dados da literatura (SHAKEEL-U-REHMAN *et al.*2010)



Carbono	δ (^{13}C) registrado	δ (^{13}C) literatura	δ (^1H) registrado)	δ (^1H) literatura
C2	160,654	159,9	-	-
C3	116,717	115,7	6,390	6,380
C4	143,383	142,7	7,682	7,680
C5	127,796	127,3	7,478	7,500
C6	124,336	123,6	7,282	7,260
C7	131,727	130,9	7,454	7,420
C8	116,535	115,7	7,282	7,260
C9	153,915	153,1	-	-
C10	120,000	118,1	-	-

5.12 Cromatografias em camada delgada (CCD) do extrato hidroetanólico de *M. lindleyana* DC

A análise por cromatografia em camada delgada é uma técnica analítica extremamente simples para a prospecção de substâncias presentes em fitoterápicos. Esta consiste na separação dos componentes de um extrato por migração diferencial sobre uma camada fina de gel de sílica (fase estacionária), retida sobre uma superfície plana por ação da fase móvel constituída por uma mistura de solventes em proporções diferentes (ROCHA, 2006; COLLINS *et al.*, 2006).

Assim, a determinação do perfil cromatográfico da tintura possibilitou a comparação dos valores de R_f das substâncias da amostra com os valores de R_f da

Cumarina padrão além da comparação das colorações desenvolvidas pelas zonas cromatográficas. Seguindo este procedimento, o perfil cromatográfico por CCD obtido para tintura de *M. lindleyana* DC, apresentou melhor desenvolvimento no eluente, constituído de tolueno/diclorometano/acetona (45: 25:30).

Após o desenvolvimento, o cromatograma apresentou uma zona fluorescente verde clara com valor de Rf 0,61 idênticos ao valor de Rf da cumarina usada como referência (0,57-0,60), e duas zonas cromatográficas fluorescentes azuis atribuídas aos ácidos clorogênico e caféico com respectivos Rfs (0,35-0,50), (WAGNER; BLADT, 2001).

Portanto, através da análise qualitativa por cromatografia em camada delgada, é caracterizada a presença destes marcadores químicos, comprovando assim a identidade e assegurando a qualidade da matéria-prima e conseqüentemente, do derivado vegetal obtido (tintura).

A análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada com as frações e extrato seco das folhas de *Mikania lindleyana* DC eluído em tolueno/diclorometano/acetona (45: 25: 30), borrifado com solução alcoólica de KOH 5% e observado sob a luz ultravioleta a 254nm e 365nm.

A fração clorofórmica e a cumarina Aldrich®, mostraram as manchas verdes nas regiões com fator de retenção (FR) igual a 0.61 (Figura 19) quando observadas na luz ultravioleta em comprimento de onda de 365nm após borrifação com uma solução alcoólica de KOH 5%, sugestivo de cumarina (WAGNER. et al ,2001)

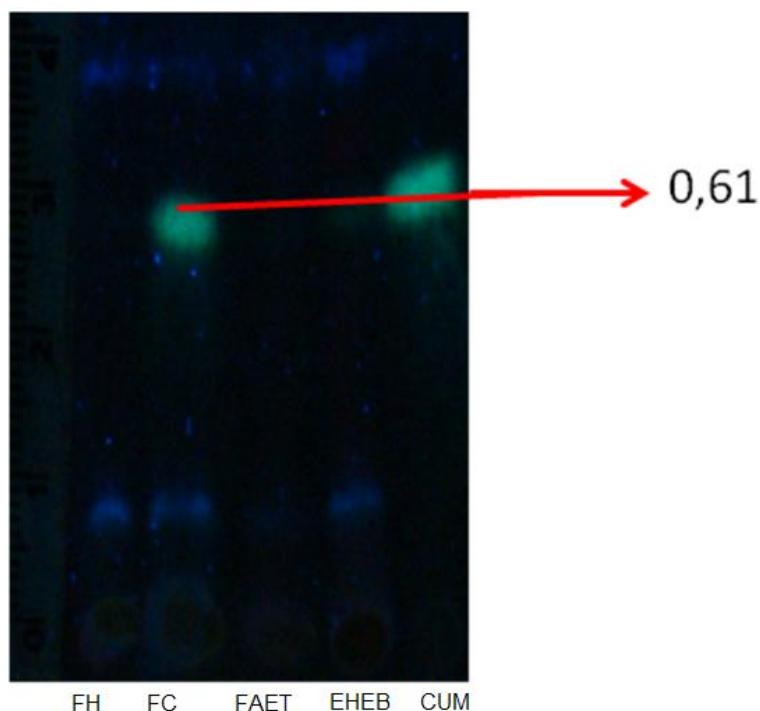


Figura 19: Cromatograma de fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FC), Fração de acetato de etila (FAET), extrato hidroetanólico bruto (EHEB) e cumarina Aldrich® (CUM)

5.13 Resultado de Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) . Detecção de cumarina no extrato e na fração clorofórmica de

M. lindleyana DC

A análise do extrato hidroetanólico de *M. lindleyana* DC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) mostrou um pico com RT de 6,00 min. e espectro característico com máximos de absorção a 270nm e 300nm. (Figura 20).

Foram observados picos similares no mesmo tempo de retenção (6.00min) para cumarina Aldrich® (padrão) e para a fração clorofórmica. (Figura 21 e 24). Para confirmar essa observação, foi realizada a co-injeção de cumarina em amostra de extrato e da fração clorofórmica nas mesmas condições. A comparação dos cromatogramas mostra o aumento das áreas dos picos relacionados à cumarina (Figura s 22; 25)

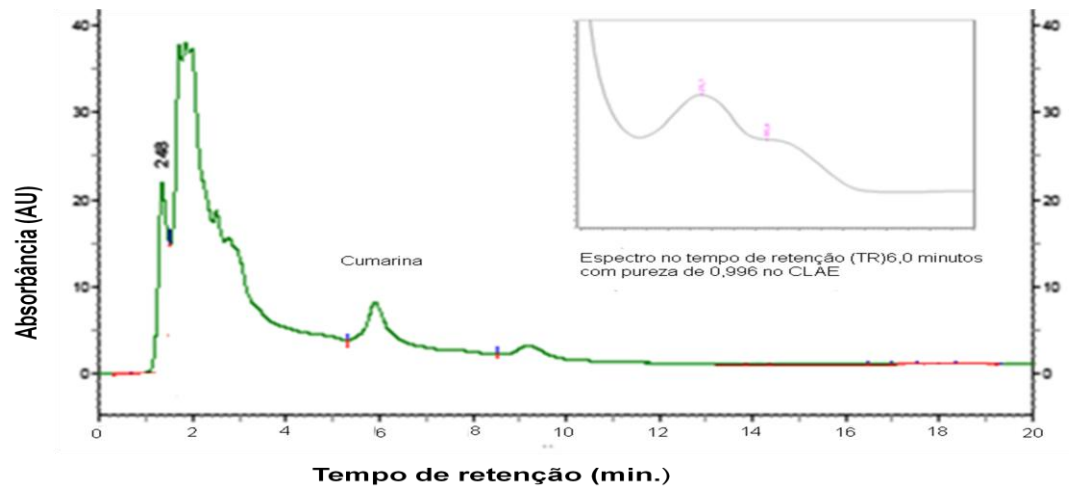


Figura 20. Cromatograma de CLAE de extrato hidroetanólico registrado a 270nm eluído com metanol/ água a 53:47.

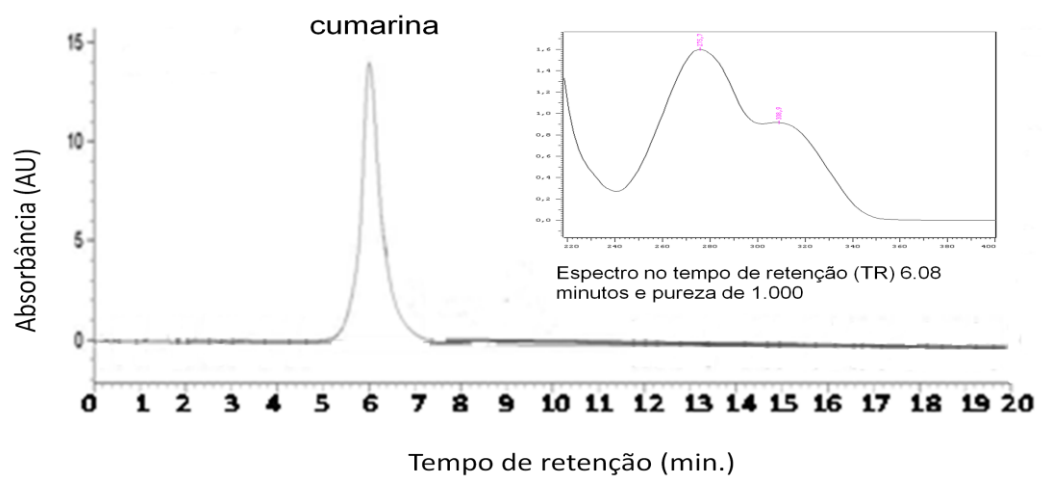


Figura 21 Cromatograma registrado a 270nm de coumarina Aldrich® a 1mg/mL dissolvido em água e eluída com metanol/ água a 53:47.

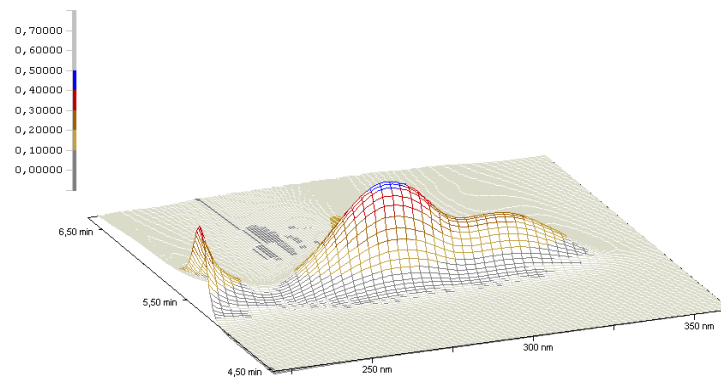


Figura 22: Diagrama do pico da coumarina mostrando absorção entre 5,50min. e 6,50min.

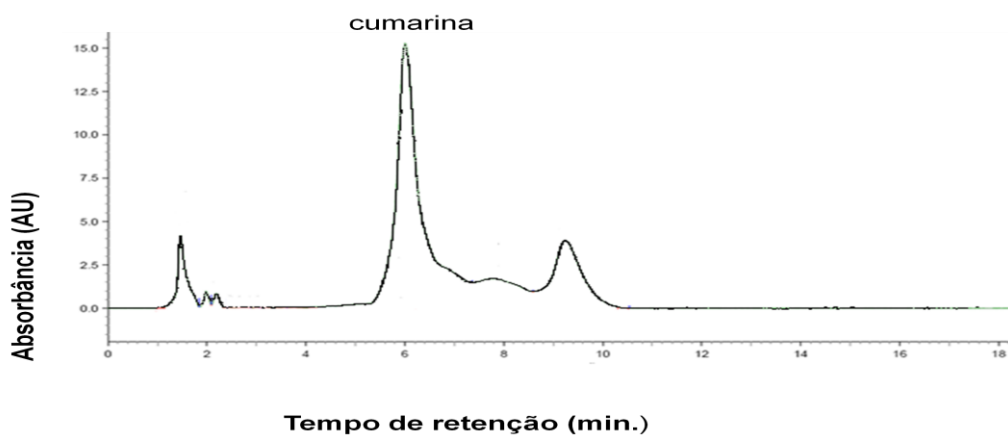


Figura 23. Cromatograma da co-injeção do extrato hidroetanólico e cumarina eluída com metanol/ água a 53:47

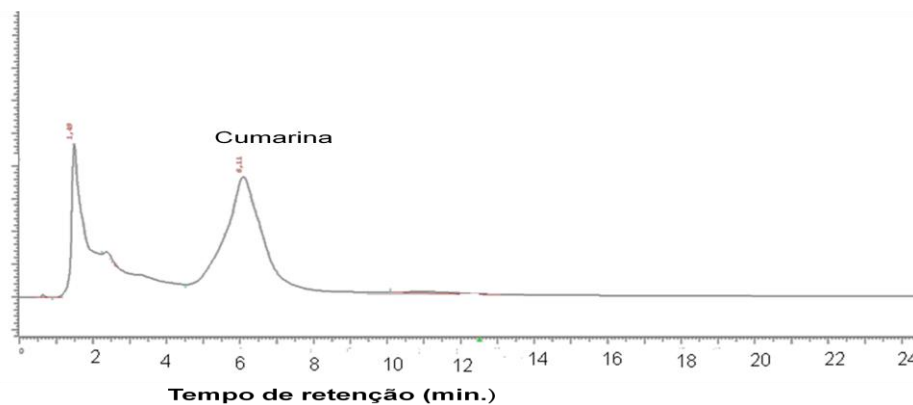


Figura 24. Cromatograma da fração clorofórmica do extrato hidroetanólico seco das folhas da *M. lindleyana* DC em metanol /água, 43:57, registrado a 270nm.

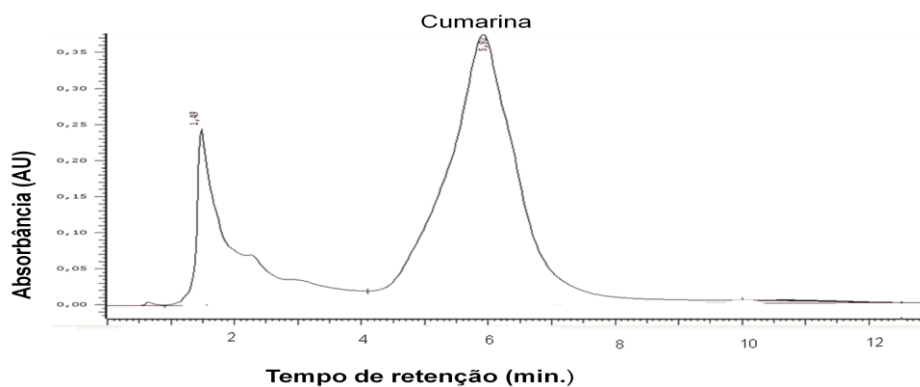


Figura 25; cromatograma de co-injeção no CLAE da fração clorofórmica (FC) do extrato hidroetanólico seco das folhas da *M. lindleyana* DC com cumarina registrado a 270nm.

5.13.1 QUANTIFICAÇÃO DE CUMARINA NO EXTRATO E NA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA DE *M. lindleyana* DC.

Para determinar as concentrações de cumarina nas amostras de extrato hidroetanólico bruto (EHEB) e fração clorofórmica (FC), montou-se uma curva de calibração (Figura 26) utilizando as áreas sob as curvas dos picos obtidos para cumarina Aldrich® nas diferentes concentrações de 1,00; 0,50; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/mL como mostra a tabela 6.

A curva (Figura 26) foi utilizada no cálculo de teores de Cumarina no extrato bruto e nas duas amostras aplicando a equação; $Y=a+bx$ e $r =0,999$. (CELEGHINI *et al* 2001) onde obteve-se teores de cumarina de 0,014 mg/mL e 0,209 mg/mL para EHEB e FC, respectivamente (tabela 7)

Tabela 5; As diferentes concentrações de cumarina e suas respectivas áreas sob a curva

Cumarina mg/mL	n	Áreas sob a curva
1,00	4	29895955
0,50	4	26364860
0,25	4	15068851
0,125	4	3971359
0,0625	4	5821564

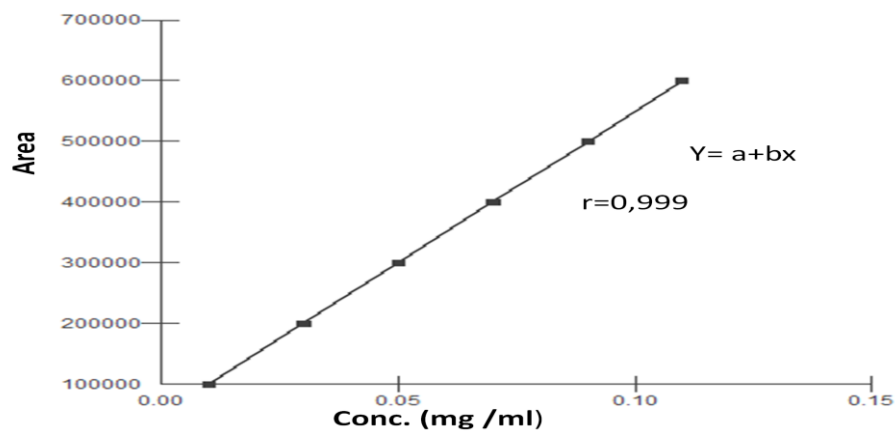


Figura 26.: Curva de calibração feito com resultados cromatográficas de cumarina Aldrich®.

Tabela 6: Teor de cumarina total em extrato hidroetanólico bruto de *M. lindleyana* DC e sua fração clorofórmica.

Amostra	Conc. de Cumarina (mg/ml)
Extrato hidroetanólico	0.014
Fração Clorofórmica	0.209

6. CONCLUSÕES

Através da caracterização física e físico-química da droga vegetal (pó das folhas de *Mikania lindleyana* DC) e do derivado vegetal (tintura de *M. lindleyana*DC), foi possível obter especificações farmacognósticas além de parâmetros de controle de qualidade condizentes com a monografia farmacopéica específica para a espécie em estudo, além de constatar a identidade do marcador químico como sendo cumarina através da detecção por CCD.

O método para a quantificação da cumarina na tintura de *M. lindleyana* por CLAE-DAD apresentou parâmetros de desempenho relevantes aos objetivos do trabalho e estão em conformidade com os parâmetros recomendados pela legislação sanitária vigente no país.

A partir dos resultados obtidos, é possível inferir que nem todas as frações do extrato da *Mikania lindleyana* DC contém cumarina (apenas a fração clorofórmica) e que os dados da análise cromatográfica permitiram determinar o teor de cumarina no extrato e na fração clorofórmica entretanto é necessário que sejam feitas mais estudos a cerca dos conteúdos químicos desta planta, aplicando outros métodos e focando em suas importâncias farmacológicas e seus aspectos toxicológicos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M.S.M. **Caracterização farmacognósticas, química, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém.
- AMARAL, M. P. H.; VIEIRA, F. P.; LEITE, M. N.; AMARAL, L. H.; PINHEIRO, L. C.; FONSECA, B. G.; PEREIRA, M. C.. S.; VAREJÃO, E. V. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol 19, nº 2B, p.607-611, 2009.
- AMOROZO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botânica Brasílica** , 16(2):p189-204.2002.
- ANDRADE, E. C. B.; ALVES, S. P.; TAKASE, I. Avaliação do uso de ervas medicinal como suplemento nutricional de ferro, cobre e zinco. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol 25, nº 3, p.591-596, 2005.
- ARAGÃO, C.F.S.; SOUZA, F.S.; BARROS, A.CS.; VERAS, J.W.E.; BARBOSA FILHO, J.M.; MACEDO, R.O. Aplicação da termogravimetria (TG) no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.). Menispermaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 12, supl., p. 60-61, 2002.
- ARAÚJO, A. A. S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol .42, nº 2, p. 270-277, 2006.

BARBOSA, W. L. R.; QUIGNARD, E.; TAVARES, I. C. C.; PINTO, L. N.; OLIVEIRA, F. Q.; OLIVEIRA, R. M. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais. **Revista Científica da UFPA**. Vol 4. 2001. <http://www.ufpa.br/rcientifica> > Acesso em 04/05/2009.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa State University Press, 1^a Ed,v.1, 1976.

BILIA, A.R.; BERGONZI, M.C.; MORGENNI, F.; MAZZI, G.; VINCIERI, F. F. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 213, p. 199–208, 2001.

BOLINA, R. C.; GARCIA, E. F.; DUARTE, M. G. R. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol 19, nº 1B, p.294-298, 2009.

BOURGAUD, F. et al. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unraveled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry Review**, v76 :p293–308,2006

BRASIL. Ministério da Saúde **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária** (Anvisa). Decreto n.º 5.813, de 22 de junho de 2006. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. 23 jun. 2006.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1991.

BUCHILLET, D. **Medicinas tradicionais e medicina ocidental na Amazônia**. Belém,MPEG/CNPq/PR/CEJUP/UEP, 504p. 1991

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; KOSCIUV, I.; MORAIS, T. B.; FERRARI, L. P. Contribuição ao estudo farmacognóstico de *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker (guaco), visando o controle de qualidade da matéria-prima. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol 19, nº 2B, p.545-552, 2009

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, NS. M.S.A.Q.; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**. Ano. V, n. 11, Jun. 2007.

CARVALHO, C. M. G.; PRUDENTE, L.R.; PEREIRA, A. C.; DE PAULA, J.R.; BARA, M. T. F. Avaliação da qualidade de extratos vegetais. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Vol. 3 (2), p. 53-62, 2006.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo: Tecmed, p. 257-265, 2004.

CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; MALTA, M. R.; CARDOSO, M. G.; SILVA, F. A. M. Coumarin Contents in Young *Mikania glomerata* Plants (Guaco) under Different Radiation Levels and Photoperiod. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, vol 25, nº 3, p.387-92, 2006.

Celeghini, R. M. S., Vilegas, J H. Y. and Lanças, F. M.; *Extraction and Quantitative HPLC Analysis of Coumarin in Hydroalcoholic Extracts of Mikania glomerata Spreng. ("guaco") Leaves*, **Journal of Brazilian chemical society**, Vol. 12, No. 6, 706-709, 2001.

CHAVES, J. S.; OLIVEIRA, D. C. R. Sesquiterpene Lactones and other Chemical Constituents of *Mikania hoehnei*; **Journal of Brazilian Chemical Society**, vol 14, nº 5, p.734-737, 2003.

CLAUDIA, M. et al, Farmacognosia da planta ao medicamento, 1999, Ed. UFSC, CLEMES, S. M.; BERTARELLO, Z. A. L.; MORGANA, K. Avaliação química de folhas de plantas medicinais nativas utilizadas no entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí. **Revista Brasileira de Farmácia**, vol 89, nº 1, 2008.

COELHO-FERREIRA, M. R. Identificação e valorização das plantas medicinais de uma comunidade pesqueira do litoral paraense (Amazônia Brasileira). **Tese de Doutorado**. Belém, UFPA/MPEG,. 244p,2000.

COLLINS, H. C.; BRAGA, L. G.; BONATO, S. P. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: Editora Unicamp,v2,p123, 2006.

DESMICHELLE, G. O. **Medicamento homeopático: fabricação, controle, legislação**. In: MERCIER, L.(ORG.). Homeopatia: princípios básicos. São Paulo:Organização Andrei,. p.143-149, 1987.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Vol.5ª edição Brasília, 2010

FARMACOPÉIA Portuguesa VII. p. 196, Lisboa, 2002

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 42, nº 3, 2006.

FERREIRA, F. P.; OLIVEIRA, D. C. R. New constituents from *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker. **Tetrahedron Letters**, vol. 51, p. 6856–6859, 2010.

FERREIRA, M. R. C. Identificação e valorização das plantas medicinais de uma comunidade pesqueira do litoral paraense (Amazônia Brasileira).2000. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Pará. Belém, Pará. 260p.

FONSECA, P.; LIBRANDI, A.P.L. Avaliação das características físicoquímicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 2, abr./jun., 2008

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for industry; Bioanalytical Method Validation**, 2001.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, vol 68, p.335-357, 2002.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**:. 2^a, ed. London:.p.112,1983

HOLMES, W.C.; McDaniel, S. **Genus Mikania - Tribe Eupatorieae**. In: J.Fabride. Flora of Peru. Fieldiana Bot. New Series 9: 1-57. 1982

HOLMES, W. C.. A proposed sectional classification for Mikania (Eupatorieae). Pp. 621-626. 1996

HOLMES, W. C. A review preparatory to an infrageneric classification of *Mikania* (tribe: Eupatorieae).Pp. 239-254. In: D.J.N. Hind; C. Jeffrey & G.V. Pope (eds.). Advances in Compositae Systematics, **Royal Botanical Gardens**, Kew. 1995

JARDIM, M. A. G et al, Levantamento de plantas de uso terapeutico no município de Santa Barbara do Para, Estado do Pará, Brasil; **Revista Brasileira de Farmacognosia** p 21-25, 2007

KING, R. M.; ROBINSON, H. **The genera of the Eupatorieae (Asteraceae)**. Missouri Botanical Garden, St. Louis. 1987

KRAUTMANN, M.; RISCALA, E. C.; BURGUEÑO-TAOPIA, E.; MORA-PERZ, Y.; CATALAN, C. A. N.; JOSEPH-NATHAN, P. C-15-Functionalized Eudesmanolides from *Mikania campanulata*. **Journal of Natural Products**, vol 70, p.1173-1179, 2007.

LAKE B. G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Journal of Food and Chemical Toxicology*, vol 37, p. 423 -453, 1999.

LINDON, J.C.; NICHOLSON, J.K.; SIDELMANN, U.G.; WILSON, I.D. Directly coupled HPLC-NMR and Its application to drug metabolism. **Drug Metabolism Reviews**. vol.29, n.3, p.705-746, 1997.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. **Caracterização de Polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: Editora E-papers, 2001.

MACHADO, M. V. F, et al. Avaliação da disponibilidade de ferro em ovo, cenoura e couve e em suas misturas. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol 26, p.610-618, 2006.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA Jr, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Revista Química Nova**, vol. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Revista Química Nova**, vol 32, nº3, p.595-622, 2009.

MANN, J. I. **Natural Products and Their chemistry and biological significance**. 2nd.ed.Longman. London:, 1996. MPEG/CNPq/PR/CEJUP/UEP, 1991, 504p.

MARTINS, A. S.; ALVES, C. N.; LAMEIRA, O. A.; SANTOS, A. S.; MÜLLER, R. C. S. Avaliação de minerais em plantas medicinais amazônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol 19, nº 2B, p.621-625, 2009.

MARTINS AG, ROSÁRIO DL, BARROS MN, JARDIM, MAG, Levantamento etnobotânico de plantas medicinais, alimentares e tóxicas da Ilha do Combu,

Município de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 86: 21-30,2005

MATOS, J. R.; MACHADO, L. D. B. CANEVAROLO JUNIOR., S.V Análise térmica e termogravimetria. In:. **Técnicas de caracterização de polímeros**.

São Paulo: Editora Artliber, p. 209-228, 2004.

MENDES, C. C.; SANDES, L. Q.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F. New (9 β H)-Lanostanes and Lanostanes from *Mikania aff. jeffreyi* (Asteraceae). **Journal of Chemistry and Biodiversity**, vol 6, p.1463-1470, 2009.

MENDES. B;. Informações fitoterápicas e composição química de *Mikania lindleyana* DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 1/4, p. 27-29, 2002.

MENEZES R. R.. Análise da co-utilização do resíduo do beneficiamento do caulim e serragem de granito para produção de blocos e telhas cerâmicos, Cerâmica,**Revista Química Nova**, 53, p192-199,2007

MIGLIATO, K.F.; MOREIRA, R.R.D.; MELLO, J.C.P.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H.R.N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17(1), p. 94-101, Jan./Mar, 2007

MOTHÉ C. G. et al; Caracterização Térmica e Mecânica de Compósitos de Poliuretano com Fibras de Curauá; **Revista de Ciência e Tecnologia**, vol. 14, nº 4, p. 274-278, 2004

NASCIMENTO, D. C.; PEREIRA, B. A. F.; TEIXEIRA, J. R. M. Efeito de *Mikania lindleyana* DC. na memória: Estudo experimental em ratos. **Revista Paraense de Medicina**, vol 2, p.6-11, 2003.

NOLLA, D.; SEVERO, B. M. A. **Plantas medicinais**. 2ªed., Passo Fundo: UPF, p72. 2005.

OLIVEIRA, A.B.; LONGHI, J.G.; ANDRADE, C.A.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. A normatização de fitoterápicos no Brasil. **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPR**. p. 1-13, 2007.

OSÓRIO, A. C; MARTINS, J. L. S. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol 40, nº 4, 2004.

PANIZZA, S. Plantas que curam: cheiro de mato. São Paulo: **IBRASA**, vol.1, p.117-118, 1997

PEDROSO, A. P. D.; SANTOS, S. C.; STEIL, A. A.; DESCHAMPS, F.; BARISON, A.; CAMPOS, F.; BIAVATTI, M. W. Isolation of syringaldehyde from *Mikania laevigata* medicinal extract and its influence on the fatty acid profile of mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol 18, nº 1, p.63-69, 2008.

RAQUEL M.A, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** , vol. 42, p54, jul./set. 2006

REIS, A. A.; FERRAZ, T. L.; MARTINS, D.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. S.; ROQUE, N. F. Preliminary studies on the volatile constitution of *Mikania* species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, vol 18, p.683-685, 2008.

Ritter M.R, Miotto S.T.S.; **Taxonomia de Mikania Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. Hoehnea v32: p309-359. 2005.

RITTER, M. R; WAECHTER, J. L. Biogeografia do gênero *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, vol 18, nº 3, p.643-652, 2004.

ROCHA, L.M. Cuidados na preparação de medicamentos com extratos padronizados de *Ginkgo biloba*. **Infarma Brasília**: vol.18, nº 11/12, 2006.

RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J.R. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da zidovudina (AZT). **Acta Farmacêutica Bonaerense**. v. 24 n. 3, p. 383-387, 2005.

ROESER K.R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und **Kunstwerk der Natur**. **Mikrokosmos** v.61: p33-36, 1972

RUI-LONG WANG , LING-WEN DING , QIAO-YANG SUN JING LI ZENG-FU XU SHAO-LIN PENG, Genome sequence and characterization of a new virus infecting *Mikania micrantha* H.B.K. **Arch Virol. journal**, p153:1765–1770; 5 Agosto 2008

RYCHLIK. M. Quantification of free coumarin and its liberation from glucosylated precursors by stable isotope dilution assays based on liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol 56, nº 3, 2008

SANTOS, E.V.M. Extração de matérias-primas vegetais. Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos. **Cyted, Santafé de Bogotá**, p. 27-60, 2000.

SANTOS, A.F.O.; BASÍLIO Jr, I.D.; SOUZA, F. S.; MEDEIROS, A.F.D.; PINTO, M.F.; DE SANTANA, D.P.; MACÊDO, R.O. Application of thermal analysis of binary mixtures with metformin. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, vol. 93, p. 361–364, 2008.

SHARAPIN, N. Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos. **Cyted, Santafé de Bogotá**, p. 145-157, 2000.

SHAKEEL-U-REHMAN, REEHANA KHAN, KHURSHEED A. BHAT, ALSABA F. RAJA, ABDUL S. SHAWL, MOHD S. ALAM, Isolation, characterisation and antibacterial activity studies of coumarins from *Rhododendron lepidotum* Wall. ex G. Don, Ericaceae, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20(6): p886-890, Dez. 2010

SILVA, R. D. **Farmacopéia Brasileira. V.** ed. São Paulo: Ateneu, 2010

SILVA, E.C.; PAOLA, M.V.R.V.; MATOS, J.R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n. 3, jul./set., 2007.

SILVA JÚNIOR, J.O.C.; PEREIRA, N.L. Avaliação da permeação in vitro de gel fitoterápico contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytum officinalis* L. **Revista Brasileira de Farmácia**. Aceito para publicação, 2008.

SILVA JÚNIOR, J.O.C. **Obtenção e avaliação de forma farmacêutica semisólida fitoterápica contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytum officinale* L. (confrei)**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto. 2006

SOARES, A. P.; NASCIMENTO, A. M.; TALEB-CONTINI, S. H.; OLIVEIRA, D. C. R. Constituents of *Mikania lasiandrae*. **Journal of Chemistry of Natural Compounds**, vol. 43, nº 6, p.708-709, 2007.

SOUSA, O.V.; OLIVEIRA, M.S.; CUNHA, R.O.; COSTA, B.L.S. ZANCANELLA, C.R.; LEITE, M.N. Avaliação da qualidade de matérias-primas de ruibarbo utilizadas em formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13, supl., p. 30-33, 2003.

TOLEDO, M.G.T; ALQUINI,A; NKASHIMA,T. Aspectos estruturais das folhas de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae)em dois ambientes distintos,**Revista Brasileira de Farmacognosia**, 85(3): p89-93, 2004

TONZIBO, Z. F.; BROU, A. F.; KOFFI, A. M.; CHALCHAT, J. C. Geographic Variation in the Leaves Oils Composition of *Mikania cordata* (Burm.f.) B. L. Robinson from Côte d'Ivoire. **European Journal of Scientific Research**. vol.38, nº 4, p.572-576, 2009.

VILEGAS, J. H. Y.; DE MARCHI, E.; LANÇAS, F. M. **Phytochemical Analysis**. v 8, p266.1997

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: **a Thin Layer Chromatography Atlas**. 1ª edição, Berlin: Springer, p. 216-217, 2001.

WAGNER, H., Plant Drug Analysis, **A Thin Layer Chromatography Atlas**,. 2nd ed, Berlin, P44-82, 1996

WAGNER, H.; WIESENAUER, M. **Fitoterapia: Fitofármacos, Farmacologia eAplicações Clínicas**. 2ª edição. São Paulo: Pharmabooks,p34-46, 2006.

WEI, X.; HUANG, H.; WU, P.; CAO, H.; YE, W. Phenolic constituents from *Mikania micrantha*. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol 32, p.1091–1096, 2004.

WENDLANDT, W. W. **Thermal Analysis**. New York: John Wiley & Sons, 3.ed.p56, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Quality Control Methods for Medicinal Plant Matérias**. Geneva: Organização Mundial de Saúde, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO **monographs on selected medicinal plants**. Geneva: Organização Mundial de Saúde. v. 2, p. 35-44,2002.

WWW.FITOTERAPICA.COM.BR/PLANTASERVAS, Mikania lindleyana DC, sucurijú
4 abril. 2010

ZHANG, L.M.; ZHAO, X.; JI, J.J.; DAI, Y.J. TG-DTG as an effective method for the characterization of rutin extracted from the buds of *Sophora japonica* L. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1-6, 2008.

