

LETÍCIA MONTEIRO FARIAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
PARA QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS DE
EXTRATOS DE *Strychnos pseudoquina* A.St.-Hil. (LOGANIACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

F224d Farias, Leticia Monteiro, 1984-
2015 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para
quantificação de marcadores químicos de extratos de *Strychnos
pseudoquina* A.St.-Hil. (Loganiaceae) / Leticia Monteiro Farias.
– Viçosa, MG, 2015.
xvii, 87 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: João Paulo Viana Leite.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 77-84.

1. *Strychnos pseudoquina*. 2. Plantas medicinais.
3. Quina (Botânica). 4. Flavonoides. 5. Leishmaniose.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 583.93

LETÍCIA MONTEIRO FARIAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
PARA QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS DE
EXTRATOS DE *Strychnos pseudoquina* A.St.-Hil. (LOGANIACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2015.

Ivanildes Vasconcelos Rodrigues

Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz

Ramon de Freitas Santos

João Paulo Viana Leite
(Orientador)

*Dedico este trabalho a Deus,
aos meus pais, Edson e Rosário,
pelo amor que me incentiva sempre .
E em especial à minha filha Giovanna ,
um novo sentido à minha vida.*

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências.

*O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso
passará pela vida sem ver nada”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, mesmo nos momentos em que não acreditei.

À minha família, pilar da minha vida.

À minha filha Giovanna, por compreender minha ausência tantas vezes necessária.

Ao meu orientador, João Paulo Viana Leite, pela orientação, pelos ensinamentos e principalmente pela confiança na condução dos trabalhos.

Aos amigos do Laboratório de Biodiversidade, Antônio Xavier, Alisson Andrade e Laís Rodrigues, pelo companheirismo e amizade.

Aos meus amigos de pós-graduação, Paulo, Gustavo e Gleide, pelos momentos de descontração que tornaram essa jornada mais agradável.

Aos órgãos que fomentam a pesquisa e o desenvolvimento da ciência brasileira.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia molecular pelo programa de Pós-Graduação.

À minha coorientadora Juliana Lopes Rangel Fietto, pela presteza.

Aos colaboradores do Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos (LBCB), Prof^ª. Juliana Lopes Rangel Fietto, discente Ramon de Freitas.

Ao Eduardo, pela ajuda em todos os aspectos burocráticos.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelos ensinamentos e colaboração.

À Juliana Hipólito, pelo incentivo, apoio e confiança.

Aos meus alunos, por compreender, as tantas vezes que expressei meu cansaço.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este momento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro à pesquisas do Laboratório de Biodiversidade da UFV.

À todos, minha eterna gratidão!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Geral	3
2.2 Específicos.....	3
3 JUSTIFICATIVA	4
3.1 Importância da pesquisa em bioprospecção farmacêutica	4
3.2 Fitoterápicos.....	5
3.3 Regulamentação de fitoterápicos no Brasil	6
3.4 Doença de Chagas.....	9
3.5. <i>Strychnos pseudoquina</i> A. St.-Hil.....	11
4. METODOLOGIA	14
4.1. Material vegetal	14
4.2. Obtenção dos extratos.....	15
4.2.1. Percolação seriada.....	15
4.2.2 Extração por sonicação	16
4.3 Fracionamento cromatográfico do extrato em acetato de etila (EAE)	17
4.4 Desenvolvimento e validação de método analítico por UV-Vis para quantificação de flavonoides totais em <i>S. pseudoquina</i>	19
4.4.1 Preparo das amostras	19
4.4.1.1 Reação colorimétrica	19
4.4.2 Curva de calibração para a quantificação de flavonoides totais.....	20
4.4.3 Validação do método espectrofotométrico	20
4.4.3.1 Seletividade.....	21
4.4.3.2 Linearidade	21
4.4.3.3 Limite de quantificação	22
4.4.3.4 Limite de detecção	22
4.4.3.5 Precisão intradia.....	22
4.4.3.6 Precisão interdia.....	23
4.4.3.7 Exatidão	23
4.4.3.8 Robustez	24
4.5 Desenvolvimento e validação de método analítico por HPLC-DAD para quantificação de marcadores em <i>S. pseudoquina</i>	24
4.5.1 Sistema cromatográfico	24
4.5.2 Preparo das soluções de análise	25
4.5.3 Preparo da solução de referência	25

4.5.4	Desenvolvimento da condição cromatográfica	25
4.5.5	Validação do método analítico	26
4.5.5.1	Seletividade	26
4.5.5.2	Linearidade	26
4.5.5.3	Limite de quantificação (LQ)	27
4.5.5.4	Limite de detecção (LD).....	27
4.5.5.5	Precisão	27
4.5.5.6	Exatidão	28
4.5.5.7	Robustez	28
4.6	Estudo de estabilidade preliminar a temperatura ambiente	29
4.7	Comparação do perfil cromatográfico e dos teores de flavonoides em extratos provenientes de diferentes acessos de <i>S. pseudoquina</i> e amostras comerciais de quina.....	29
4.8	Avaliação da atividade tripanocida.....	32
4.8.1	Ensaio biológico	32
4.8.1.1	Cepas de parasitas, cultura <i>In Vitro</i>	32
4.8.1.2	Células Vero, cultura <i>In Vitro</i>	33
4.8.1.3	Padronização da resazurina	33
4.8.1.4	Amostras	35
4.8.1.5	Ensaio para a atividade tripanocida	35
4.8.1.6	Ensaio de citotoxicidade	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1	Isolamento fitoquímico e obtenção dos flavonoides SPEA 1 e SPEA 2	37
5.1.1.	Rendimento dos extratos obtidos por percolação.....	37
5.1.2.	Análise dos extratos liofilizados	38
5.1.3.	Fracionamento cromatográfico do extrato em acetato de etila.....	41
5.2	Validação de método analítico por espectrofotometria no UV-Vis para a quantificação de flavonoides totais em <i>S. pseudoquina</i>	43
5.2.1	Seletividade.....	45
5.2.2	Linearidade	46
5.2.3	Limites de quantificação e de detecção.....	48
5.2.4	Precisão intradia.....	48
5.2.5	Precisão interdia.....	49
5.2.6	Exatidão	51
5.2.7	Robustez.....	51
5.3	Desenvolvimento e validação do método para quantificação de marcadores em <i>S. pseudoquina</i> por HPLC-DAD.....	53
5.3.1	Seletividade.....	58
5.3.2	Linearidade	60
5.3.3	Limite de quantificação	62
5.3.4	Limite de detecção	62
5.3.5	Precisão	62
5.3.5.1	Precisão intradia.....	62
5.3.5.2	Precisão interdia.....	63

5.3.6 Exatidão	65
5.3.8 Robustez.....	65
5.4 Estabilidade da quercetina 3-O-metil-éter e strychnobiflavona em solução metanólica do extrato da entrecasca de <i>S. pseudoquina</i>	66
5.5 Quantificação de flavonoides totais e dos marcadores quercetina 3-O-metil-éter e strychnobiflavona em extratos de <i>S. pseudoquina</i> de diferentes acessos e amostras comerciais.....	67
5.6 Atividade tripanocida	71
6. CONCLUSÕES.....	75
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
APÊNDICE 1	85
APÊNDICE 2	86
APÊNDICE 3	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do SPEA 1 e SPEA 2.	12
Figura 2: Estrutura geral dos flavonoides.	13
Figura 3: Foto da coleta da entrecasca do caule de <i>S. pseudoquina</i> no município de Rio Verde (Foto cedida pelo Prof. Fabiano Guimarães Silva).	15
Figura 4: Etapas realizadas na extração seriada para a obtenção dos extratos EH, EAE, EEt e EAq.	16
Figura 5: Amostras comerciais de quina.	30
Figura 6: Redução da resazurina (responsável pela coloração azul) à resorufina (responsável pela coloração rosa).	34
Figura 7: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD a partir da análise dos extratos EH, EAE, AEt e EAq, oriundos da percolação seriada da entrecasca de <i>S. pseudoquina</i>	39
Figura 8: Concentração (mg/g) da droga vegetal de A, Flavonoides Totais; B, SPEA 1 e C SPEA 2 nos extratos de <i>S. pseudoquina</i>	40
Figura 9: Fracionamento cromatográfico do EAE em coluna de sílica gel em três diferentes fases da eluição.	41
Figura 10: Perfil obtido por CCD e frações de EAE eluídas da coluna de sílica, após.	42
Figura 11: Espectros no UV- vis, registrados na região de 200 à 700 nm, obtidos pela varredura da solução de leitura do extrato adquirido por sonicação (a) sem adição de $AlCl_3$ e (b) após adição de $AlCl_3$	45
Figura 12: Curva analítica obtida em dias distintos pelo método espectrofotométrico para rutina após reação com $AlCl_3$	47
Figura 13: Influência do (A) volume de ácido acético, (B) tempo de leitura e (C) volume cloreto de alumínio na robustez do método espectrofotométrico para quantificação de flavonoides totais (média, n= 6).	52
Figura 14: Cromatograma em HPLC-DAD resultante da análise preliminar de SPEA 1 e SPEA 2.	54
Figura 15: Cromatogramas em HPLC-DAD gerados durante o desenvolvimento e otimização do método para quantificação dos marcadores SPEA 1 e SPEA 2 em <i>S. pseudoquina</i>	58
Figura 16: Cromatograma obtido por HPLC-DAD. As condições cromatográficas estão descritas no item 5.3.1.	59
Figura 17: Curvas analíticas obtidas por HPLC-DAD, em dois dias consecutivos, para SPEA 1 e SPEA 2.	61
Figura 18: Influência do fluxo da fase móvel, temperatura e porcentagem de ácido acético na robustez do método cromatográfico para quantificação de A (SPEA 1) e B (SPEA 2).	66
Figura 19: Teores médios de analitos em solução metanólica, mantidas à temperatura ambiente.	67
Figura 20: Perfil cromatográfico por HPLC-DAD dos acessos de <i>S. pseudoquina</i>	69
Figura 21: Concentração (mg/g) da droga vegetal de A, flavonoides totais; B, SPEA 1 e C SPEA 2 nos acessos de <i>S. pseudoquina</i>	69
Figura 22: Perfil cromatográfico por HPLC-DAD das amostras comerciais.	71
Figura 23: Ensaio de viabilidade de epimastigotas.	72
Figura 24: Ensaio de citotoxicidade em células Vero.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fracionamento do extrato em acetato de etila por cromatografia em coluna de sílica gel.....	18
Tabela 2: Alíquotas utilizadas para o preparo da curva de calibração.....	20
Tabela 3: Alíquotas utilizadas para o preparo da curva de exatidão.	23
Tabela 4: Variações nos parâmetros analíticos avaliados para o ensaio de robustez.	24
Tabela 5: Alíquotas utilizadas para o preparo da curva de exatidão.	28
Tabela 6: Amostras de <i>S. pseudoquina</i> e de quina analisadas quanto ao perfil fitoquímico e teor de flavonoides.	30
Tabela 7: Alíquotas dos acessos de <i>S. pseudoquina</i> e amostras comerciais de quina utilizadas para o ensaio de quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria UV- Vis.....	31
Tabela 8: Controles utilizados para o ensaio biológico.	35
Tabela 9: Rendimentos da percolação seriada da entrecasca de <i>Strychnos pseudoquina</i> obtidos a partir de 300,0g da droga vegetal.	37
Tabela 10: Resultados obtidos para flavonoides totais e marcadores SPEA 1 e SPEA 2 para EH, EAE, EEt e EAq obtidos através da percolação seriada da entrecasca de <i>S. pseudoquina</i>	38
Tabela 11: Fases móveis utilizadas na técnica de CCD em sílica gel para grupos de frações oriundos do fracionamento cromatográfico de EAE.	42
Tabela 12: Curva analítica de rutina após reação com $AlCl_3$ e média das absorvâncias obtidas para cada ponto da curva analítica.	46
Tabela 13: Resultados da análise estatística dos dados provenientes da curva analítica obtida para quantificação de rutina por espectrofotometria no UV-Vis, após reação com $AlCl_3$	47
Tabela 14: Concentrações em mg/g e percentagem de flavonoides totais determinados em <i>S. pseudoquina</i> pelo método espectrofotométrico com $AlCl_3$ para avaliação da precisão intradia.....	49
Tabela 15: Concentrações (mg/g) e percentagem de flavonoides totais determinados em <i>S. pseudoquina</i> pelo método espectrofotométrico com $AlCl_3$ para avaliação da precisão interdia.....	50
Tabela 16: Ensaio de recuperação de rutina para avaliar a exatidão do método de quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria no UV-Vis.....	51
Tabela 17: Condição cromatográfica utilizada para análise preliminar dos marcadores SPEA 1 e SPEA 2.	53
Tabela 18: Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método por HPLC-DAD para a quantificação dos marcadores SPEA 1 e SPEA 2 em <i>S. pseudoquina</i>	54
Tabela 19: Parâmetros de adequabilidade do sistema determinados para os picos dos analitos no extrato de <i>S. pseudoquina</i> obtido por sonicação, empregando a condição cromatográfica estabelecida.....	59
Tabela 20: Concentrações, média das áreas (n = 3), e desvio padrão relativo (DPR), obtidos através das curvas analíticas, para cada analito, em dois dias distintos.....	61
Tabela 21: Regressão linear para as curvas analíticas de SPEA1 e SPEA2 em dois dias distintos.....	62
Tabela 22: Teores percentuais de SPEA 1 e SPEA 2 em <i>S. pseudoquina</i> e valores de DPR utilizados para a determinação da precisão intradia do método.	63
Tabela 23: Teores percentuais de SPEA 1 e SPEA 2 em <i>S. pseudoquina</i> e valores de DPR utilizados para a determinação da precisão interdias do método.....	64
Tabela 24: Média (n = 3), da recuperação de SPEA 1 e SPEA 2 no extrato de <i>S. pseudoquina</i> . Os níveis fortificados são referentes ao início meio e fim da curva de calibração.....	65
Tabela 25: Resultados obtidos para flavonoides totais e marcadores SPEA 1 e SPEA 2 para os acessos de <i>S. pseudoquina</i> e amostras comerciais de quina.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Ácido acético
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIOPROS	Bioprospecção Molecular no Uso Sustentável da Biodiversidade
BPF	Boas Práticas de Fabricação
Bz	Benzonidazol
CCD	Cromatografia em camada delgada
CO ₂	Dióxido de carbono
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
°C	Graus celcius
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPR	Desvio padrão relativo
EAE	Extrato em acetato de etila
EAq	Extrato aquoso
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-cético
EEt	Extrato etanólico
EH	Extrato hexânico
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

EtOH	Etanol
Ex	Exemplo
FB	Farmacopeia Brasileira
FBS	Soro Feral Bovino
FFFB	Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira
F.M.	Fase móvel
g	Gramma
GO	Goiás
H	Horas
H ₂ O	Água
HPLC/DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta por arranjo de diodos
HPLC/FR	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de índice de refração
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IMS	Consultora Internacional de Marketing Farmacêutico
IPCC	Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas
k	Fator de Retenção
LD	Limite de detecção
LIT	Liver Infusion Triptose
LQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
MF	Medicamento Fitoterápico
MG	Minas Gerais

mL	Mililitros
min.	Minutos
mM	Milimol
μ M	Micromol
μ g	Micrograma
μ L	Microlitros
N	Número de Pratos Teóricos
NCEs	New Chemical Entities
nm	Nanômetros
Nf	Nifurtimox
O	Oeste
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PTF	Produto Tradicional Fitoterápico
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RE	Resolução referente à legislação
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Rs	Resolução referente à separação dos sinais cromatográficos
RSD	Relative Standard Deviation
s	Desvio padrão do intercepto da curva de regressão
S	Inclinação da curva
S	Sul

SPEA 1	Quercetina-3-O-metil éter
SPEA 2	Strichnobiflavona
<i>S. pseudoquina.</i>	<i>Strychnos pseudoquina</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Fator de calda
TR	Tempo de retenção
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UV	Ultravioleta
US\$	Dolares
Vis	Visível
Vol	Volume
WHO	World Health Organization

RESUMO

FARIAS, Leticia Monteiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de marcadores químicos de extratos de *Strychnos pseudoquina* A.St.-Hil. (Loganiaceae).** Orientador: João Paulo Viana Leite.

O Brasil é um país de grande diversidade vegetal sendo detentor de aproximadamente um terço de toda a flora mundial, no entanto, o potencial farmacológico de toda essa biodiversidade ainda é pouco explorado por pesquisadores. O mercado de fitoterápicos tem apresentado crescimento, aumentando o seu acesso à população. Conseqüentemente, a padronização de fitomedicamentos ganhou importância a fim de garantir a qualidade e os efeitos terapêuticos frente aos seus consumidores. A doença de Chagas é uma doença negligenciada causada por uma infecção parasitária amplamente distribuída em toda a América Latina. Atualmente, duas drogas são utilizadas para o tratamento dessa doença, porém ambas são ineficazes para o tratamento da mesma, portanto, pesquisas visando o desenvolvimento de novos fármacos se fazem necessárias. Visando contribuir para o avanço do potencial farmacológico das espécies vegetais brasileiras, o presente trabalho teve por objetivo, isolamento fitoquímico, desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a quantificação de marcadores químicos e avaliação tripanocida de extratos de *Strychnos pseudoquina* A.St.-Hil, uma planta medicinal endêmica do cerrado brasileiro, conhecida popularmente como quina-do-cerrado e com reconhecida atividade leishmanicida. Foram isolados os flavonoides quercetina 3-O-metil-éter (SPEA 1) e strychnobiflavona (SPEA 2) de extratos da entrecasca da espécie. Os teores de flavonoides totais expressos em rutina, determinados por espectrofotometria no UV/Vis após reação com cloreto de alumínio, na droga vegetal foi de 10,66 mg/g para o acesso de Jaboticatubas. O método foi validado e apresentou faixa de linearidade ($r^2 > 0,99$), seletividade, precisão (DPR < 0,26% para SPEA 1 e 0,21% para SPEA 2), exatidão (recuperação entre 95,84% a 100% para SPEA 1 e 94,01% a 98,22% para SPEA 2). Os teores de SPEA 1 e SPEA 2 determinados por HPLC-DAD foi de 0,27% e

0,37% respectivamente. Os métodos desenvolvidos quando aplicados na análise de extratos em acetato de etila provenientes de quatro acessos distintos de *S. pseudoquina*, bem como em três amostras comerciais, demonstrou que existe variação nos teores dos marcadores, bem como na concentração de flavonoides totais. Os extratos *S. pseudoquina* testados para atividade tripanocida não apresentaram resultados satisfatórios contra formas epimastigota de *T. cruzi*. Assim, o presente trabalho resultou na obtenção de métodos para a quantificação marcadores e flavonoides em *S. pseudoquina*, servindo como subsídio para o desenvolvimento o controle de qualidade de um fitoterápico com ação leishmanicida.

ABSTRACT

FARIAS, Letícia Monteiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Development and validation of analytical methods for the quantification of chemical markers of *Strychnos pseudoquina* A.St.-Hil. (Loganiaceae) extracts.** Adviser: João Paulo Viana Leite.

Brazil has approximately one third of the world's flora and thus has one of the higher vegetal biodiversities in the planet. However the pharmacological potential of this vegetal biodiversity is still little explored by researchers. The herbal market has shown growth, increasing their access to the population. In order to ensure the quality of this medicines for the consumers, the standarization of quality control techniques became very important. Chagas disease is a neglected disease caused by a parasitic infection widely distributed throughout Latin America. At present, two drugs are used to treat this disease, but both are unable to cure the patients, therefore, researches aiming the development of new drugs are needed. To contribute to the advancement of pharmacological potential of the brazilian plant species, this study aimed the phytochemical isolation, development and validation of analytical methods for the quantification of chemical markers and trypanocidal evaluation *Strychnos pseudoquina* A.St.Hil extracts, an endemic medicinal plant of the brazilian Cerrado, popularly known as quina do cerrado and recognized leishmanicidal activity. They were isolated flavonoid quercetin 3-O-methyl ether (SPEA 1) and strychnobiflavona (SPEA 2) bark extracts of the species. The total flavonoid content expressed as rutin, determined by spectrophotometry UV/Vis after reaction with aluminum chloride in the plant drug was 10,99 mg/g for access Jaboticatubas. The quantification method was validated and presented linearity ($r^2 > 0.99$), selectivity, precision (DPR < 0.26% for SPEA 1 and 0.21 for SPEA 2), accuracy (recovery from 95.84% to 100% for SPEA 1 and 94,01% to 98,22% for SPEA 2). The contents of SPEA 1 and SPEA 2 determined by HPLC-DAD was 0.27% and 0.37%. The methods developed when applied in ethyl acetate in extracts from the analysis of four separate accesses *S. pseudoquina* as well as three commercial samples showed that variation exists in the levels of the bullets, and the

concentration of total flavonoids. The extracts tested for trypanocidal activity showed no satisfactory results against epimastigote of *T. cruzi*. Thus, this work resulted in obtaining methods for the quantification and flavonoids markers in *S. pseudoquina*, serving as a subsidy to develop quality control of herbal with leishmanicidal action.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se observado em vários países um aumento no consumo de fitoderivados para a prevenção e tratamento de doenças, resultando também no crescimento do número de pesquisas que buscam investigar propriedades farmacológicas de extratos vegetais (LEITE, 2009). Muitas destas plantas possuem uso milenar, haja vista as inúmeras citações em papiros do antigo Egito, sendo que atualmente, vários desses usos com plantas medicinais encontram respaldo científico (MAIA–FILHO et al., 2011).

O emprego de plantas medicinais pela população mundial tem sido muito significativo nos últimos tempos, e tem inclusive recebido incentivos da própria Organização Mundial de Saúde (OMS). Comumente no Brasil, as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002).

O registro sobre emprego terapêutico de chás pela medicina popular contribue de forma relevante para a pesquisa científica, despertando o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, aumentando o acervo de conhecimento sobre a flora medicinal (MACIEL et al., 2002).

A pesquisa com plantas medicinais tem fortalecido o mercado de fitoterápicos em diferentes países. No Brasil, país de megabiodiversidade e detentor de uma sociodiversidade que tem nas plantas o principal recurso terapêutico de sua medicina popular, torna-se estratégico o estudo do potencial farmacológico das plantas, visando o desenvolvimento de novos medicamentos (KLEIN et al., 2011).

Assim, o interesse comercial e emprego terapêutico crescentes dos fitoterápicos têm repercutido na maior vigilância quanto a segurança, eficácia e qualidade dos produtos pelas autoridades reguladoras (CARVALHO; SANTOS & SILVEIRA, 2008). Para tal, é de fundamental importância o estabelecimento de métodos analíticos que deem suporte para o controle de qualidade dos extratos empregados na produção de fitoterápicos. Buscando a regulamentação do setor de validação analítica de fármacos, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), pela Resolução RE N^o 899 de 29 de Maio de 2003, estabeleceu o Guia para validação de métodos analíticos e

bioanalíticos (BRASIL, 2003). Segundo esta RE, a metodologia será considerada validada desde que sejam avaliados alguns parâmetros tais como especificidade, linearidade, intervalo, precisão/repetibilidade, exatidão e robustez. Além disso, o método deve assegurar resultados confiáveis.

A investigação do potencial farmacológico de extratos vegetais tem sido direcionado para a busca de novos compostos bioativos naturais destinados ao tratamento e prevenção de diferentes patologias (VIEIRA, 2010). Para o tratamento de doenças tumorais e infecciosas, 60% e 75% das novas drogas, respectivamente, foram originados de fontes naturais entre 1981 e 2002 (CRAGG & NEWMAN, 2013). O recurso vegetal também tem servido como fonte para a busca de novos compostos bioativos direcionados ao tratamento de doenças consideradas negligenciadas, como malária, esquistossomose, doença de Chagas e leishmania (FAGUNDES, 2013)

Apesar da doença de Chagas ser considerada negligenciada, e de apresentar 500 mil mortes por ano, o atual tratamento destinado à doença é considerado insatisfatório. Apenas cerca de 1% de todas as drogas desenvolvidas durante os últimos 30 anos foram voltadas para o tratamento de doenças tropicais, como a doença de Chagas (SOEIRO & CASTRO, 2009), o que justifica e demonstra claramente a necessidade urgente por novas drogas tipanicidas. Neste contexto, uma grande variedade de drogas tem sido investigada com o objetivo de estabelecer uma quimioterapia mais efetiva. Substâncias de origem natural de diversas classes, como quinonas, flavonoides e terpenos mostraram-se ativas contra o *T. cruzi* (FARIA et al., 2007).

Diante dessa necessidade de se buscar novos produtos naturais com potencial medicinal, o presente trabalho visou o desenvolvimento e validação de métodos para a quantificação de marcadores ativos em extratos obtidos das cascas do caule de *S. pseudoquina*, uma planta nativa do cerrado brasileiro, popularmente conhecida como quina. Extratos dessa espécie mostraram-se com potencial leishmanicida. Em estudo recente, os flavonoides quercetina-3-O-metil éter (SPEA 1) e strichnobiflavona (SPEA 2) foram isolados da espécie *S. pseudoquina* e apresentaram excelente atividade leishmanicida (LAGE et al., 2013). Estes métodos poderão ser utilizados na padronização de extratos visando a produção de medicamentos fitoterápicos,

bem como para monitorar variações interespecíficas de espécimes acessadas em diferentes regiões e de amostras comerciais. Uma vez comprovada a atividade leishmanicida, o presente trabalho também buscou investigar o potencial tripanocida de extratos e compostos isolados de *S. pseudoquina*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver e validar métodos de quantificação de marcadores ativos, a partir de um extrato com ação leishmanicida, oriunda da entrecasca de *Strychnos pseudoquina* e avaliar sua atividade tripanocida.

2.2 Específicos

- ✓ Obter os extratos seriados das entrecascas de *S. pseudoquina*;
- ✓ Isolar, purificar e realizar a identificação estrutural de marcadores ativos do extrato;
- ✓ Desenvolver e validar método analítico espectrofotométrico para quantificação de marcadores ativos nos extratos obtidos;
- ✓ Desenvolver e validar método analítico por HPLC/DAD para a quantificação dos marcadores ativos;
- ✓ Aplicar método analítico para o estudo da variação de marcadores ativos de quatro diferentes acessos de *S. pseudoquina*;
- ✓ Aplicar método analítico desenvolvido para determinação da autenticidade e análise da qualidade de amostras de *S. pseudoquina* disponibilizadas no mercado.
- ✓ Avaliar o potencial tripanocida de extratos e compostos isolados de *S. pseudoquina*.

3 JUSTIFICATIVA

3.1 Importância da pesquisa em bioprospecção farmacêutica

A pesquisa com produtos naturais de origem vegetal na busca de agentes terapêuticos e também como material precursor para a síntese de compostos biologicamente ativos tem se tornado, nas últimas décadas, uma importante estratégia, de forma a conciliar conservação da biodiversidade, fomento a atividade econômica e desenvolvimento de novos fármacos (BETZ et al., 2011; PATWARDHAN et al., 2004). Segundo relatório organizado neste ano pela União Internacional de Organizações de Pesquisas sobre Florestas, intitulado *Relatório Global sobre Florestas, Árvores e Paisagens para Segurança Alimentar e Nutrição*, conhecido como IPCC das Florestas, ainda falta, na maioria dos países, governança integrada para o que eles chamam de paisagens multifuncionais que conectam a economia florestal madeireira, não-madeireira e a produção agropecuária. De acordo com o relatório, produzido por 60 cientistas de diferentes nacionalidades, os países precisam avançar muito em questões como manejo das áreas de florestas, a valorização das cadeias produtivas florestais e a integração com outros sistemas produtivos (IUFRO, 2015).

Assim sendo, o trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa BIOPROS (Bioprospecção Molecular no Uso Sustentável da Biodiversidade), através da bioprospecção farmacêutica, tem se tornado de grande importância, haja vista o potencial terapêutico da biodiversidade nacional, por exemplo, na produção de fitoterápicos.

No ano de 2010, havia no Brasil 160 empresas autorizadas a manipular 512 medicamentos aprovados pela Anvisa; no entanto, nem todos chegaram ao mercado. Conforme informações da IMS Health, os fitoterápicos movimentam US\$ 14 bilhões por ano e empregam uma média de 100 mil pessoas no mundo. No Brasil, o mercado gera um volume médio anual de US\$ 400 milhões e as vendas apresentam crescimento de 12% ao ano, enquanto que os medicamentos sintéticos têm crescimento anual de 5%, sendo as regiões mais fortes na produção de fitoterápicos a Sul e Sudeste (FEBRAFAR, 2010).

Estes valores indicam um mercado potencial em expansão, principalmente se for considerada a biodiversidade brasileira e a aceitabilidade dos fitoterápicos pela população. O comércio de fitoterápicos pode ser um caminho para alavancar o crescimento da indústria farmacêutica brasileira, se considerada a dificuldade de competição com os mercados multinacionais de síntese química (CARVALHO, 2011).

3.2 Fitoterápicos

Segundo definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) são considerados medicamentos fitoterápicos aqueles obtidos exclusivamente com o uso de matérias-primas ativas vegetais, não sendo considerado aqueles que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais (BRASIL, 2014).

Dentro do contexto de disponibilização do fitoterápico para a população brasileira, é importante também mencionar que mais recentemente o governo brasileiro tem promovido a implantação dos serviços de fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS). Essa atitude segue as orientações da Organização Mundial de Saúde, que aponta para a valorização das práticas terapêuticas alternativas e sua implementação em programas de medicina complementar e integrativa no sistema primário à saúde.(BRASIL, 2006)

A fim de estabelecer uma discussão mais ampla sobre os fitoterápicos, garantindo o acesso seguro e racional destes, foi estabelecido no Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). Tal decreto estabeleceu diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações voltadas à garantia do acesso aos fitoterápicos em nosso país. Além disso, a PNPMF visa o desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como o fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, o uso sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento do complexo produtivo da saúde (BRASIL, 2006).

Em 2009, outra importante medida no âmbito dos fitoterápicos foi a publicação da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

(RENISUS), com respaldo da PNPMF. Esta iniciativa visou subsidiar o desenvolvimento de toda cadeia produtiva de plantas medicinais, inclusive nas ações a serem desenvolvidas por outros ministérios participantes do PNPMF, relacionadas à regulamentação, cultivo, manejo, produção, comercialização e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2009).

Nesse contexto, é importante ressaltar que o Brasil é o país que possui a maior diversidade biológica do planeta. Dentre os biomas encontrados no Brasil, o Cerrado se apresenta com grande potencial para o desenvolvimento de pesquisas que objetivam a descoberta de novos fármacos, pois agrega enorme variedade de espécies vegetais, sendo várias dessas endêmicas da região. Porém a demanda por madeira e a expansão das fronteiras agrícolas, dentre outros fatores, tem promovido drástica redução de sua área florestal, que conta atualmente apenas com cerca de 20% da área total de sua cobertura original (IBGE, 2010).

3.3 Regulamentação de fitoterápicos no Brasil

Recentemente, a Resolução de Diretoria Colegiada, RDC nº26/2014 redefiniu o termo fitoterápicos, subdividindo-o em duas classes: Medicamento Fitoterápico (MF) e o Produto Tradicional Fitoterápico (PTF) (BRASIL, 2014). A principal diferença entre elas, é que o MF tem sua segurança e eficácia comprovada através de estudos clínicos, enquanto o PTF comprova a sua segurança e efetividade pela demonstração do tempo de uso na literatura técnico-científica. Essa nova classe de fitoterápicos, os PTF, foi criada pela Anvisa para esclarecer para a população se o produto que ela está utilizando passou por todos os testes clínicos de segurança e eficácia ou se foi aprovado por tempo de uso tradicional seguro e efetivo (BRASIL, 2014).

Para fins de comercialização, tanto o MF quanto o PTF deverão estar regularizados perante a ANVISA. Os MF deverão ser registrados, enquanto os PTF, poderão ser notificados ou registrados. Os MF e PTF poderão ser regularizados e comercializados em todas as formas farmacêuticas previstas na literatura técnico-científica; e ainda, para os PTF, poderão ser notificados chás medicinais e outras formulações descritas no Formulário de Fitoterápicos

da Farmacopeia Brasileira (FFFB) (BRASIL, 2014).

Uma exigência primordial para assegurar a qualidade do fitoterápico é o cumprimento dos requisitos de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Para tanto, as empresas que fabricam medicamentos fitoterápicos e que produzem os próprios insumos farmacêuticos ativo vegetal (IFAV) precisam submeter a petição de autorização de funcionamento da empresa (AFE) para insumos, com as devidas atividades pretendidas.

O perfil cromatográfico, ou *fingerprint*, segundo a RDC nº 26/2014, deverá ser utilizado para auxiliar na identificação química do material vegetal, permitindo sua diferenciação de outras espécies, sendo obrigatório para droga vegetal, derivado vegetal e produto acabado no momento do registro, notificação ou renovação do registro, além de ser solicitado em algumas petições pós-registro. Assim sendo, o perfil cromatográfico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência auxiliará na avaliação da consistência da qualidade e da identidade lote a lote (BRASIL, 2014).

A RDC nº 26/2014 também determina que seja avaliado o conteúdo dos marcadores tanto nas matérias-primas quanto no produto acabado; no entanto, esse teste não se aplica para chás medicinais. O marcador é definido como a substância ou ainda, classe de substâncias (ex: alcaloides, flavonoides, ácidos graxos, etc.), que deverá ser utilizado como referência para o controle da qualidade da matéria-prima vegetal e dos fitoterápicos, devendo este, preferencialmente ter correlação com o efeito terapêutico (BRASIL, 2014).

O marcador é denominado marcador ativo quando o constituinte ou grupo(s) de constituintes tem relação com o efeito terapêutico, já o marcador analítico é definido quando ainda não foi demonstrada a relação do constituinte ou grupo(s) de constituintes com a atividade terapêutica do fitocomplexo (BRASIL, 2014).

Segundo a legislação, a variação permitida de teor de marcador no produto acabado deve ser inferior a 15%, quando o marcador for ativo, ou 20%, quando o marcador for analítico. Para se obter as especificação das faixas de variações para cada tipo de marcador, é permitido utilizar misturas de lotes de matérias-primas e/ou fazer adição de excipientes (BRASIL, 2014).

Os métodos utilizados no controle de qualidade devem estar presentes

em farmacopeias reconhecidas ou serem validados. Caso haja metodologia ou monografia para o IFAV específico em farmacopeia reconhecida pela ANVISA e haja uma preferência em utilizar outro método validado, esse método precisa ser tecnicamente equivalente ou superior ao presente em farmacopeia reconhecida. (BRASIL, 2014)

Quando não forem utilizadas farmacopeias reconhecidas pela ANVISA, será exigida a descrição detalhada de todos os métodos utilizados no controle de qualidade, e os métodos analíticos devem estar validados de acordo com o Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos, publicado pela Anvisa como RE nº 899/2003 (BRASIL, 2014).

Para a validação, as substâncias de referência utilizadas devem ser oficializadas pela Farmacopeia Brasileira (FB) ou por outros códigos autorizados pela legislação vigente. Portanto, na sua ausência, substâncias químicas isoladas e devidamente caracterizadas, podem ser utilizadas no processo de validação. Para tanto, as mesmas devem ser criteriosamente ensaiadas e avaliadas, sendo submetidas a análises físico-químicas como por ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas, infravermelho, ponto de fusão e/ou HPLC (BRASIL, 2014).

Diariamente, milhões de medições analíticas são efetuadas em laboratórios de diferentes países. Para tanto, torna-se necessário uma regulamentação internacional que permita que estes dados analíticos sejam comparáveis, consistentes e reprodutíveis. Assim sendo, a validação de métodos é um aspecto de vital importância para a garantia da qualidade analítica (BARROS, 2002).

Todo método analítico desenvolvido não normalizado empregado no controle da qualidade de medicamento deve ser previamente validado; e quando normalizado, deve passar por um processo de pré-implantação antes de seguir para a rotina laboratorial. A validação tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, quer seja uma determinação qualitativa, semiquantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003; SOUZA, 2007). O processo de validação para medicamento fitoterápico deve abranger parâmetros de seletividade/especificidade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez, conforme a RE nº 899/2003 (BRASIL, 2003).

Métodos normalizados como as dos compêndios farmacopeicos são considerados validados não necessitando de passar por um processo completo de validação. Entretanto quando houver qualquer alteração nos métodos oficiais, os mesmos deverão ser revalidados (SOUZA, 2007).

A conformidade dos métodos normalizados utilizados deve ser verificada sob condições reais de uso, portanto, testes preliminares devem ser realizados a fim de comprovar a reprodutibilidade do método oficial proposto para sua posterior implementação na rotina de trabalho (EURACHEM, 1998).

Segundo Bruce, Minkinen & Riekkola (1998), um processo analítico inclui as etapas de desenvolvimento, otimização, validação e revalidação do método. A validação do método analítico deve ser devidamente documentada, com a descrição dos procedimentos de forma clara, objetiva e completa, baseada em fundamentos teóricos, considerando a eficiência, praticidade e facilidade do delineamento experimental e das ferramentas de análise de dados (SOUZA, 2007).

3.4 Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada que afeta aproximadamente um bilhão de habitantes do planeta, causando alta morbidade e mortalidade (RICHARD & WERBOVETZ, 2010; SOEIRO; CASTRO, 2009). Várias estimativas relatam cerca de 20.000 mortes por ano no continente americano em decorrência da doença de Chagas, representando a segunda doença mais importante entre as tropicais nas Américas (COURA, 2009; COURA & DIAS, 2009). Segundo estimativas da World Health Organization (WHO), em 2015 cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estarão infectados em todo o mundo, principalmente na América Latina onde a doença de Chagas é endêmica. O custo do tratamento para a doença é considerado substancial. No ano de 2008, apenas na Colômbia, o custo anual da assistência médica para todos os pacientes com a doença foi estimada em cerca de US\$ 267 milhões. A pulverização com o uso de inseticidas para controlar vetores custaria cerca de US\$ 5 milhões por ano (WHO, 2015).

Um dos motivos da doença de Chagas permanecer com alta incidência é a grande quantidade de reservatórios, tendo sido relatada a infecção por *Trypanossoma cruzi* com mais de 150 espécies domésticas, rurais e animais selvagens (gatos, cachorros, porcos, roedores, marsupiais, tatus) (RASSI et al., 2010).

Apesar de esforços agregados desde a década de 1990 a partir de diferentes iniciativas governamentais e não-governamentais (ex. Médicos Sem Fronteiras) que resultaram no declínio acentuado de novos casos agudos, a doença de Chagas ainda apresenta muitos desafios, inclusive a falta de terapias profiláticas e de esquemas efetivos de quimioterapia em especial para pacientes crônicos tardios (WHO, 2015; COURA, 2009; DIAS, 2007).

Vários estudos têm implicado o fenômeno da autoimunidade como um dos fatores envolvidos no desenvolvimento da patologia da doença de Chagas. No entanto, dados apontam que embora a resposta imune contribua fortemente para as lesões dos tecidos em especial quando exacerbada e descontrolada, o parasita é ainda reconhecido como principal fator desencadeador da doença (GUTIERREZ et al., 2009; BONNEY et al., 2011).

Migrações rurais para áreas urbanas, bem como para países não endêmicos, têm contribuído significativamente para a mudança do padrão epidemiológico da doença de Chagas, tornando a transfusão sanguínea o segundo principal modo de transmissão desta parasitose (COURA, 2009). Outra maneira de transmissão da doença de Chagas é por via congênita, sendo a terceira via de maior importância (PARKER & SETHI, 2011). A transmissão pode ocorrer também através do transplante de órgãos infectados, por acidentes em laboratório e como relatados em vários surtos no Brasil, por via oral, devido ao consumo de alimentos contaminados (DIAS, 2006; RASSI et al., 2010)

O atual tratamento proposto é baseado em dois fármacos: Nifurtimox (Nf) e o Benzonidazol (Bz). Estes compostos (Nf e Bz) são parcialmente efetivos, apresentando baixa atividade na fase indeterminada e na fase crônica e ainda, apresentam severos efeitos colaterais (COURA, 2009; VILLA et al., 2007). Dessa forma, como requerem longos períodos de tratamento, levam ao frequente abandono do tratamento (JANNIN & VILLA, 2007;

SOEIRO et al., 2009).

Assim, baseado no conhecimento atual da biologia do parasita e do hospedeiro, um candidato ideal para terapia da doença de Chagas deveria apresentar algumas características, tais como: (i) alto nível de atividade contra as formas evolutivas presentes nos hospedeiros mamíferos e contra diferentes cepas do parasita incluindo aquelas naturalmente resistentes a nitroderivados como Bz e Nf; (ii) eficácia nas fases aguda e crônica (recente e tardia); (iii) administração oral em poucas doses, haja vista que, o tratamento prolongado com multidoses dificulta o tratamento elevando dessa forma o índice de abandono da farmacoterapia; (iv) baixa toxicidade e elevada segurança (incluindo formulações para crianças e mulheres em idade reprodutiva); (v) baixo custo (vi) alta estabilidade para temperaturas tropicais e (vii) altos níveis de acumulação em diferentes tecidos além de (viii) meia vida longa (Nwaka & Hudson, 2006; Soeiro et al., 2009; Soeiro & Castro, 2009, Buckner & Navabi, 2010).

Visto a urgência em se identificar novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas, se faz ainda relevante buscar por novas alternativas para profilaxia de bancos de sangue, sobretudo em áreas endêmicas e de alta prevalência.

3.5. *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil.

Strychnos pseudoquina A. St.-Hil. é uma planta medicinal nativa do bioma cerrado brasileiro, pertencente à família Loganiaceae, e popularmente conhecida como quina do campo, quina mineira, quina branca, quineira, quina grossa e quina do cerrado (Silva et al., 2005). É comumente empregada na medicina popular como estomática, para o tratamento de dispepsia (Rodrigues, 1998), no combate às moléstias do baço (Lorenzi & Matos, 2002) e inflamações dos gânglios mesentéricos (Almeida et al., 1998). A casca do caule é utilizada no tratamento da malária, como anti-febrífugo (Vieira & Martins, 2000), fortificante (Felfili et al., 2002) e contra dores (Siqueira, 1981). O caule pulverizado também é usado como cicatrizante e, quando usado na forma de “garrafada”, curtido em aguardente,

o seu uso oral é empregado para o tratamento de doenças do fígado (GRANDI et al., 1996). Para a casca na forma de decocção, é relatado pela medicina popular o potencial afrodisíaco e tônico (ALMEIDA et al., 1998).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa BIOPROS (Bioprospecção Molecular no Uso Sustentável da Biodiversidade), da Universidade Federal de Viçosa, mostraram que a *S. pseudoquina* apresenta potencial atividade leishmanicida (LAGE et al., 2013). No entanto, esta espécie é ainda pouco conhecida quanto ao seu potencial medicinal, necessitando de estudos complementares.

A análise fitoquímica de cascas e folhas da espécie *S. pseudoquina* sugere conteúdo químico constituído por triterpenos, alcaloides, flavonoides e taninos (XAVIER, 2015). A casca dessa espécie é espessa, suberosa, com pequenas ranhuras, amarelada e mole na parte externa, de cor cinza e mais dura na parte interna, sendo abundante em oxalato de cálcio (ALMEIDA et al., 1998). A casca e o lenho da quina do cerrado não apresentam o alcaloide quinina, presente em outras espécies popularmente conhecida como quina (LORENZI, 1998). Foi evidenciada a presença de flavonoides e alcaloides diferentes da quinina na casca dessa espécie (LORENZI & MATOS, 2002).

Do extrato etanólico das folhas foram isolados flavonoides, como a isorhametina e strychnobiflavona, e dois alcalóides, a diabolina e a 11-metoxidiabolina (NICOLETI et al., 1984; SILVA et al., 2005 e MATOS, 2009). Em estudo realizado por Lage et al (2013), o flavonoide strychnobiflavona (SPEA 2) também foi isolado e identificado das cascas do caule de *S. pseudoquina*, juntamente com outro flavonoide, a quercetina 3-O-metil-éter (SPEA 1) (Figura 1).

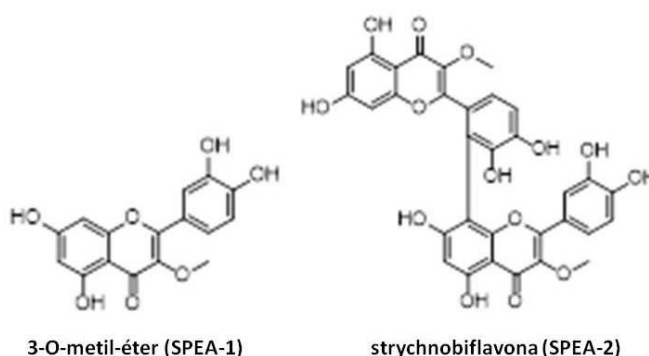


Figura 1: Estrutura química do SPEA 1 e SPEA 2.

Os flavonoides são compostos polifenólicos produzidos por plantas, sendo importantes tanto no crescimento, quanto nos mecanismos de defesas das mesmas (CAZAROLI et al., 2008). Possuem um esqueleto carbônico de 15 átomos, organizado em três anéis (A, B e C), sendo dois aromáticos (A e B) ligados por um anel pirano (C) (figura 2) (BEHLING, 2004).

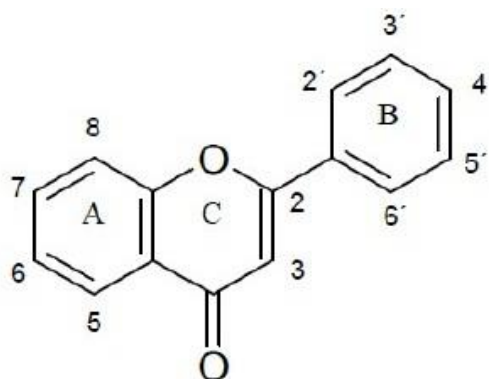


Figura 2: Estrutura geral dos flavonoides.

O trabalho realizado por Lopes (2012), também pertencente ao BIOPROS, relata pela primeira vez na literatura o isolamento de SPEA 1 e SPEA 2 presente nas cascas de *S. pseudoquina*. Estes produtos naturais tiveram suas estruturas elucidadas empregando técnicas espectroscópicas e após a análise espectral e comparações com dados da literatura, os sólidos SPEA 1 e SPEA 2 foram identificados estruturalmente como correspondentes ao flavonoide 3-O-metilquercetina e ao biflavonoide strychnobiflavona, respectivamente.

Uma estratégia para descobrimento de novas drogas ocorre através da pesquisa de produtos naturais a partir de plantas usadas na medicina popular. Em estudo recente, realizado por Lage et al. (2013), a atividade leishmanicida das cascas de *Strychnos pseudoquina* St. Hil, foi investigada e o seu extrato em acetato de etila apresentou atividade contra a *Leishmania amazonensis*. O isolamento fitoquímico desse extrato resultou na purificação de dois flavonoides que apresentaram atividade leishmanicida, a quercetina 3-O-metil-éter e a strychnobiflavona. Os dados apresentados neste estudo sugere o potencial terapêutico do extrato em acetato de etila da *S. pseudoquina* para o tratamento de leishmaniose, bem como dos flavonoides purificados (LAGE et al, 2013). A ação biológica desses compostos para cepas de *T. cruzi*,

incluído as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas ainda são desconhecidas até o momento.

Visando a padronização de extratos de *S. pseudoquina* para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, dado a sua promissora atividade leishmanicida, o presente trabalho propõe o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação dos marcadores ativos. A ação anti-protozoário do extrato de *S. pseudoquina* frente a formas infectadas de leishmania motivou a investigação de sua ação contra *Trypanossoma cruzi*.

4. METODOLOGIA

4.1. Material vegetal

Os trabalhos de fracionamento e isolamento fitoquímico, desenvolvimento e validação de método, bem como os ensaios biológicos, foram realizados com amostras provenientes de acessos de *S. pseudoquina* coletados no município de Jaboticatubas - MG (coordenadas geográficas: 19° 24' 98" S e 43° 47' 04" O), a autorização de acesso ao patrimônio genético para fins científico foi concedido pelo CNPq (n° 010863/2014-1).

Em todos os acessos de *S. pseudoquina*, foi coletada a entrecasca do caule da árvore, na forma de um semicírculo, com auxílio de um facão (Figura 3). O material vegetal foi seco em estufa ventilada a 37°C e posteriormente pulverizado em moinho de facas. Exsiccatas dessa espécie foram produzidas, identificadas pela botânica Andrea Fonseca Silva e depositada em herbário Fiel Depositário da EPAMIG, Belo Horizonte.



Figura 3: Foto da coleta da entrecasca do caule de *S. pseudoquina* no município de Rio Verde (Foto cedida pelo Prof. Fabiano Guimarães Silva)

Para fins de aplicação do método desenvolvido para análise de controle de qualidade de diferentes amostras *in natura* e comerciais de *S. pseudoquina*, foram analisados materiais provenientes de quatro diferentes acessos da espécie, sendo estes provenientes dos municípios de Uberlândia (MG), Jaboticatubas (MG), Rio Verde (GO) e Montes Claros (MG); além de quatro amostras comerciais de quina adquiridas no comércio do município de Belo Horizonte (MG).

4.2. Obtenção dos extratos

No presente trabalho, a droga vegetal foi submetida a técnicas distintas de extrações, variando de acordo com o objetivo de cada etapa da pesquisa.

4.2.1. Percolação seriada

A fim de se obter extratos para o fracionamento biomonitorado e isolamento fitoquímico, foram realizadas percolações seriadas e exaustivas com os solventes hexano, acetato de etila, etanol e água (Figura 4). Para esta percolação, foram utilizados 300,0 gramas da entrecasca seca e pulverizada do caule. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório, em banho-maria a 60 °C, sob pressão reduzida, até resíduo. Em seguida, os

extratos obtidos foram transferidos para frascos de liofilizador e mantidos em freezer a uma temperatura de - 80 °C, e posteriormente colocados para liofilizar por cerca de 24 horas, para completa remoção dos solventes. Após liofilização, o rendimento para cada extrato foi calculado.

Para a obtenção dos extratos objetivando o desenvolvimento, validação e aplicação de métodos quantitativos provenientes de diferentes acessos, bem como das amostras comerciais, outro método de extração foi desenvolvido.

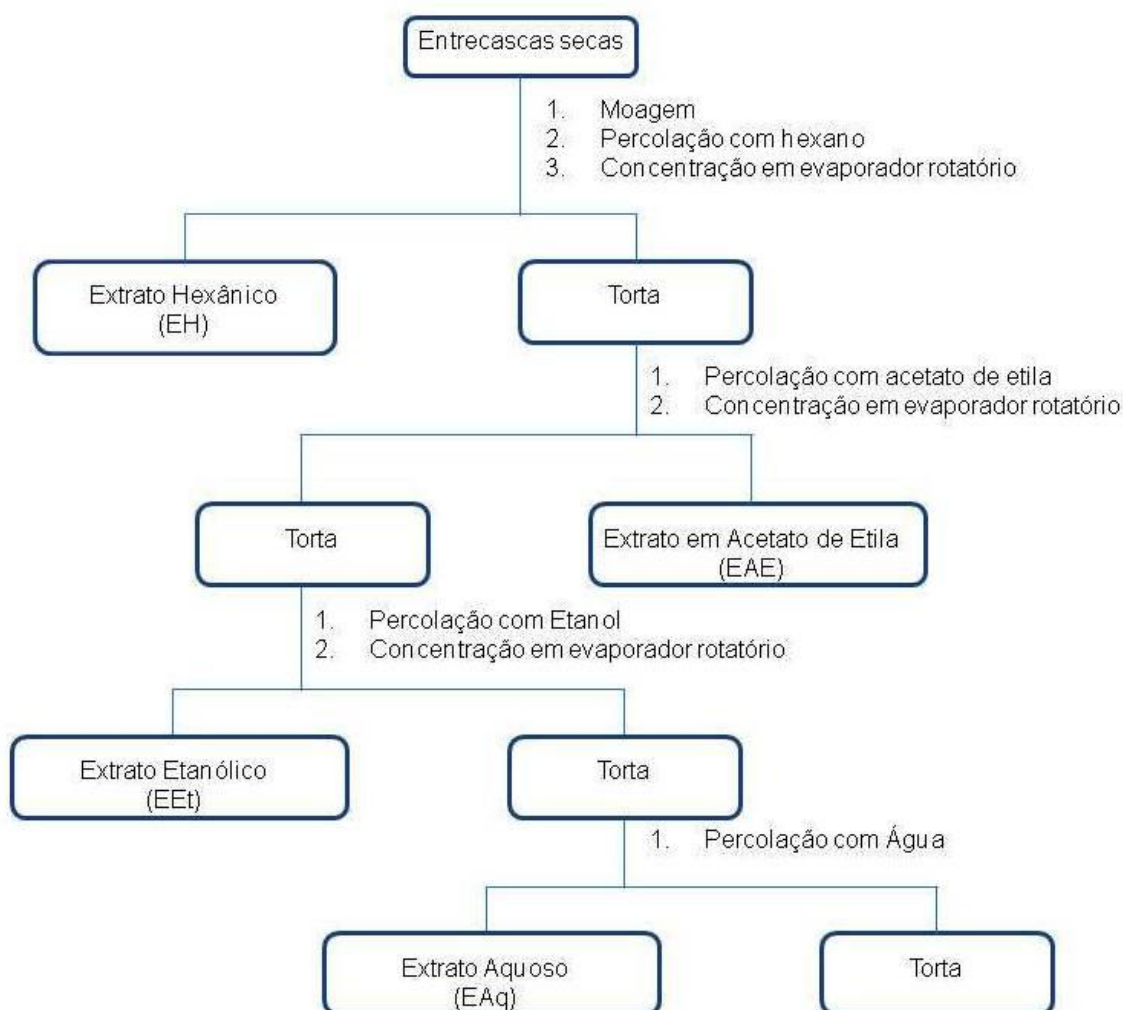


Figura 4: Etapas realizadas na extração seriada para a obtenção dos extratos EH, EAE, EEt e EAq.

4.2.2 Extração por sonicação

A fim de se obter extratos para serem empregados em métodos de quantificação de marcadores no extrato da entrecasca da *S. pseudoquina*, foi utilizado processo de extração em banho de ultrassom.

Resumidamente, 2,0 g da droga vegetal foi pesado e transferido para Erlenmeyer de 125 mL. Em seguida, uma alíquota de 50 mL de acetato de etila foi adicionada ao material, sendo a mistura levado para a extração em banho de ultrassom à 40° C por 30 minutos. Após o procedimento, a mistura foi filtrada com algodão em funil para erlenmeyer de 250 mL. A torta foi submetida à mais duas sucessivas extrações. Ao final, os filtrados foram reunidos em balão de fundo redondo e concentrados em evaporador rotatório, até completa remoção do solvente. O resíduo foi ressuscitado em metanol grau HPLC e transferido para balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume completado com este mesmo solvente. Para o ensaio de quantificação das amostras, foi utilizado balão de 25,0 mL. A extração foi realizada em triplicata.

4.3 Fracionamento cromatográfico do extrato em acetato de etila (EAE)

O fracionamento cromatográfico do EAE em coluna de sílica gel teve como objetivo o isolamento e purificação dos flavonoides 3-O-metilquercetina e strychnobiflavona a serem empregados como padrões para o estudo de desenvolvimento e validação de método analítico por HPLC-DAD, destinado à quantificação de marcadores na droga vegetal. Adicionalmente, os flavonoides isolados foram utilizados para a avaliação da ação tripanocida.

Após monitoramento por HPLC dos extratos obtidos pela percolação seriada, foi observado a concentração dos flavonoides 3-O-metilquercetina (SPEA 1) e strychnobiflavona (SPEA 2) no extrato em acetato de etila (EAE), estando de acordo com os resultados obtidos por Lage et al., (2013). A confirmação da presença desses flavonoides foi realizada pela co-injeção e comparação do tempo de retenção e espectros UV- vis referente aos padrões de SPEA 1 e SPEA 2.

O fracionamento cromatográfico de EAE (6,0 g) foi realizado em coluna de vidro (66 cm altura x 5,0 cm diâmetro), empacotada com 120g de sílica gel (Merck 70 – 230 mesh) e equilibrada em hexano. Um gradiente eluotrópico de polaridade crescente foi utilizado e alíquotas de 100 mL foram recolhidas e concentradas em evaporador rotatório, obtendo-se, ao final, 465 frações. As

frações, após analisadas por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD) e empregando solução etanólica 6M de H₂SO₄ como revelador, resultaram em grupos de frações, de acordo com a similaridade dos perfis cromatográficos (Tabela 1).

Os flavonoides SPEA 1 e SPEA 2 isolados, foram em seguida submetidos a processo de recristalização empregando-se diclorometano (SPEA 1) e uma solução de acetato de etila e etanol (SPEA 2), para completa purificação dos compostos, o grau de pureza dos compostos foi analisado por HPLC-DAD e por ponto de fusão (MQAPF – 302; Microquímica Equipamentos Ltda).

Tabela 1: Fracionamento do extrato em acetato de etila por cromatografia em coluna de sílica gel.

Eluentes	Frações	Grupos
hexano	1 a 6	G1
hexano-diclorometano (1:1)	7 a 13	G2
hexano-diclorometano (1:1)	14 a 15	G3
hexano- diclorometano (2:8)	16 a 17	G3
hexano- diclorometano (2:8)	18 a 21	G4
hexano- diclorometano (2:8)	22 a 31	G5
diclorometano	32 a 42	G6
diclorometano – acetato de etila (8:2)	43 a 48	G7
diclorometano – acetato de etila (8:2)	49 a 50	G8
diclorometano – acetato de etila (8:2)	51 a 77	G9
diclorometano – acetato de etila (8:2)	78 a 83	G10
diclorometano – acetato de etila (8:2)	84 a 85	G11
diclorometano – acetato de etila (8:2)	86 a 93	G12
diclorometano – acetato de etila (8:2)	94 a 108	G13
diclorometano – acetato de etila (8:2)	109 a 123	G14
diclorometano - acetato de etila (7:3)	124 a 128	G14
diclorometano - acetato de etila (7:3)	129 a 130	G15
diclorometano - acetato de etila (7:3)	131 a 184	G16
diclorometano - acetato de etila (7:3)	185 a 208	G17

Eluentes	Frações	Grupos
diclorometano - acetato de etila (6:4)	209 a 213	G17
diclorometano - acetato de etila (6:4)	214 a 286	G18
diclorometano - acetato de etila (6:4)	287 a 297	G19
diclorometano - acetato de etila (6:4)	298 a 303	G20
diclorometano - acetato de etila (1:1)	304 a 324	G20
diclorometano - acetato de etila (1:1)	325 a 332	G21
diclorometano - acetato de etila (1:1)	333 a 335	G22
diclorometano - acetato de etila (3:7)	336 a 378	G22
diclorometano - acetato de etila (3:7)	379 a 392	G23
diclorometano - acetato de etila (3:7)	393	G24
diclorometano - acetato de etila (1:9)	394 a 420	G24
acetato de etila	421 a 427	G24
acetato de etila - etanol (1:1)	428	G24
acetato de etila - etanol (1:1)	429 a 432	G25
acetato de etila - etanol (1:1)	433 a 447	G26
etanol	448 a 454	G26
etanol	455 a 465	G27

4.4 Desenvolvimento e validação de método analítico por UV-Vis para quantificação de flavonoides totais em *S. pseudoquina*

4.4.1 Preparo das amostras

Extratos provenientes das cascas do caule de *S. pseudoquina*, acessada em Jaboticatubas, foram obtidos pelo método de sonicação.

4.4.1.1 Reação colorimétrica

Alíquota de 0,6 mL do extrato em solução, recentemente preparada, foi transferida para balão volumétrico de 25 mL; sendo em seguida adicionados 0,6mL ácido acético glacial; 8,0 mL de metanol e 2,5 mL de solução de cloreto de alumínio hexahidratado a 8% em metanol. O volume foi completado com água purificada.

Após 20 minutos de repouso, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu a

420nm, utilizando cubetas de quartzo, frente à solução de compensação.

Solução de compensação foi preparada para anular possível interferência da absorção do extrato no comprimento de onda de 420 nm. A mesma foi preparada em balão volumétrico de 25 mL, adicionando-se 0,6 mL do extrato; 0,6 mL de ácido acético glacial e 8,0 mL de metanol, sendo o volume completado com água purificada.

4.4.2 Curva de calibração para a quantificação de flavonoides totais

Inicialmente, foi preparada solução padrão de rutina à 500 µg/mL em metanol. A partir desta, foram preparadas, em triplicata, soluções de leitura nas concentrações de 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 µg/mL, respectivamente (Tabela 2). Após reação colorimétrica em cubetas de quartzo e repouso de 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as leituras foram realizadas a 420nm, utilizando o branco para o ajuste do zero.

Tabela 2: Alíquotas utilizadas para o preparo da curva de calibração.

Nível	Alíquota (mL)	Vol. AcOH (mL)	Vol. MeOH (mL)	Vol. AlCl ₃ (mL)	Vol. H ₂ O (mL)	Vol. Total (mL)
1	0,1	0,6	8,0	2,5	13,8	25,0
2	0,25	0,6	8,0	2,5	13,65	25,0
3	0,5	0,6	8,0	2,5	13,4	25,0
4	1,0	0,6	8,0	2,5	12,9	25,0
5	1,5	0,6	8,0	2,5	12,4	25,0

Para o preparo do branco, foi utilizado balão volumétrico de 25 mL, adicionado de 0,6 mL de ácido acético glacial, 8,0 mL de metanol, 2,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado a 8%, o volume foi completado com água.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, sendo calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação.

4.4.3 Validação do método espectrofotométrico

A validação foi realizada conforme os parâmetros e especificações da

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003). Foram avaliados os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez, limite de quantificação e limite de detecção.

4.4.3.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade do método, espectros de absorção foram obtidos e comparados utilizando espectrofotômetro na faixa de comprimento de onda de 200 a 700nm de soluções de extrato, com e sem adição de solução de cloreto de alumínio 8%. A seletividade do método foi avaliada a partir da análise de bandas na região de 420 nm para ambos os espectros.

Para o preparo da amostra contendo o reagente colorimétrico, uma alíquota de 0,6 mL do extrato foi transferido para balão volumétrico de 25,0 mL, sendo em seguida adicionados 0,6mL ácido acético glacial, 8,0 mL de metanol e 2,5 mL de solução de cloreto de alumínio hexahidratado a 8% em metanol. O volume foi completado com água purificada. Para a amostra sem reagente colorimétrico, o volume do reagente de cloreto de alumínio foi substituído por 2,5 mL de metanol.

Após 20 minutos de repouso à temperatura ambiente e ao abrigo da luz as varreduras foram realizadas em espectrofotômetro na região de 200 a 700nm, utilizando cubetas de quartzo.

4.4.3.2 Linearidade

A linearidade foi realizada a partir de uma curva de calibração com padrão de rotina em metanol, em cinco níveis de concentração, de acordo com o item 4.4.1, com triplicatas para cada nível representantes da faixa de 80 a 120% da concentração de trabalho. A equação da reta foi determinada pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados, obtendo-se dados do gráfico como inclinação da reta, interseção e coeficiente de correlação linear.

Duas curvas analíticas foram construídas e analisadas em dias diferentes. A análise de covariância foi empregada para definir a semelhança estatística entre ambas.

4.4.3.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação do método foi estimado empregando-se os parâmetros da curva analítica considerando o desvio padrão em razão ao coeficiente angular (inclinação da reta) obtidos pela linearidade, segundo a equação a seguir:

$$LQ = 10 \times s/S$$

Onde:

LQ = limite de quantificação,

s = desvio padrão do intercepto da curva de regressão,

S = inclinação da curva.

4.4.3.4 Limite de detecção

O limite de detecção do método foi determinado a partir dos parâmetros da curva analítica, segundo a equação a seguir:

$$LD = 3,3 \times s/S$$

Onde:

LD = limite de detecção,

s = desvio padrão do intercepto da curva de regressão,

S = inclinação da curva analítica.

4.4.3.5 Precisão intradia

A precisão intradia do método foi verificada por meio de seis determinações para o extrato com teor de flavonoide próximo ao ponto médio de concentração de rutina na curva analítica (10 µg/mL). A partir da quantificação em sextuplicata dos extratos, foi determinado o teor de flavonoides totais presentes na droga vegetal.

Para a realização do teste, utilizou-se alíquota de 0,6 mL do extrato, sendo esta transferida para balão de 25 mL. Em seguida, foram empregados os mesmos procedimentos de reação colorimétrica anteriormente descrita (item 4.4.1.1). Para o preparo da solução de compensação, foi utilizado balão volumétrico de 25 mL, adicionado de 0,6 mL de extrato, 0,6 mL de ácido acético glacial, 8,0 mL de metanol, o volume foi completado com água.

O desvio padrão relativo (DPR) foi calculado para os teores encontrados ($n = 6$).

4.4.3.6 Precisão interdia

A precisão interdia foi avaliada conforme descrito para a precisão intradia, no entanto, o parâmetro foi mensurado para doze amostras, em dois dias diferentes e com analistas diferentes.

O DPR referente aos teores encontrados foi calculado para n de 12 e as médias dos teores entre os dois dias de determinações comparadas pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

4.4.3.7 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pela fortificação do extrato com concentrações conhecidas de rutina. Para isso, foi realizada uma curva contendo extrato, fortificada com três níveis de concentração, baixa média e alta, de padrão. O volume adicionado de padrão foi retirado da solução estoque de concentração $500\mu\text{g/mL}$ de rutina. Cada nível foi adicionado de 0,2 mL do extrato metanólico preparado conforme item 4.2.2, e de crescente alíquota de rutina (Tabela 3). Em seguida, procedeu-se com o método colorimétrico anteriormente descrito para quantificação de flavonoides totais (item 4.4.1.1).

Tabela 3: Alíquotas utilizadas para o preparo da curva de exatidão.

Nível	Extrato (mL)	Rutina (mL)	Concentração teórica final de rutina* ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,2	0,1	2,0
2	0,2	0,5	10,0
3	0,2	1,5	30,0

* Concentrações calculadas a partir das alíquotas retiradas da solução estoque de rutina ($500\mu\text{g/mL}$) para balão volumétrico de 25,0 mL. A concentração de rutina presente no extrato não foi utilizada para as concentrações expostas nessa tabela.

Calculou-se a taxa de recuperação das quantidades de rutina adicionada ao extrato, ou seja, a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente conforme equação abaixo.

4.4.3.8 Robustez

Seis soluções de leitura provenientes de três extrações diferentes foram preparadas, variando-se alguns parâmetros analíticos conforme Tabela 4.

Tabela 4: Variações nos parâmetros analíticos avaliados para o ensaio de robustez.

Parâmetro	Usual	Variação	
		-	+
Volume de AlCl ₃ (mL)	2,5	2,0	3,0
Volume de ácido acético (mL)	0,6	0,5	0,7
Tempo de leitura (minutos)	20	15	25

Os teores de flavonoides totais em cada ensaio foram calculados e os dados submetidos à análise de variância, as médias dos teores foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.5 Desenvolvimento e validação de método analítico por HPLC-DAD para quantificação de marcadores em *S. pseudoquina*

O método foi desenvolvido para quantificação dos flavonoides strychnobiflavona e quercetina 3-O-metil-éter da entrecasca de *S. pseudoquina* com ação leishmanicida (LAGE et al., 2013). O método analítico também objetivou a obtenção do perfil cromatográfico, ou *fingerprint*, para auxiliar na identificação da droga vegetal, ou de seus derivados fornecendo subsídio para o seu controle de qualidade de acordo com a RDC 26/2014 (BRASIL, 2014).

4.5.1 Sistema cromatográfico

O desenvolvimento e validação do método foi realizado em cromatógrafo líquido com detector com arranjos de diodos (DAD) Shimadzu Prominence, equipado com bomba LC - 20 AD, detector SPD - M 20 A, forno CTO - 20 A e software LabSolutions.

4.5.2 Preparo das soluções de análise

Para o desenvolvimento do método analítico, as amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.2.2. Posteriormente as amostras foram filtradas com filtro de seringa de 0,45 μm , acondicionadas em vial e volumes de 10 μL foram injetados automaticamente no sistema de HPLC. O volume restante foi armazenado em frasco hermeticamente fechado e acondicionado em geladeira ao abrigo da luz sendo utilizado nos dias de análise.

4.5.3 Preparo da solução de referência

A solução de referência utilizada para a determinação da concentração das amostras foi preparada solubilizando 10,0 mg dos padrões strychnobiflavona e quercetina 3-O-metil-éter, isolados e purificados de *S. pseudoquina* em balão volumétrico de 10 mL (1,0 mg/mL), utilizando metanol grau HPLC. A solução foi deixada em sonicador por 10 minutos, sendo avolumado com o mesmo solvente.

Cerca de 1,5 mL da solução foi transferida para vial e volumes de 10,0 μL foram injetados no sistema de HPLC-DAD. O volume restante da solução de referência foi armazenado em geladeira ao abrigo da luz e utilizada nos dias de análise.

4.5.4 Desenvolvimento da condição cromatográfica

A partir de uma condição empírica, modificações foram propostas e otimizadas avaliando-se a influência das mesmas nos parâmetros da resolução cromatográfica dos picos de interesse. Condições tais como temperatura, vazão, modo de eluição (isocrático e/ou em gradiente), concentração de ácido acético na fase móvel, inclinação do gradiente e comprimento e diâmetro na fase estacionária foram utilizados como modificadores do método. Os picos de interesse foram identificados pela co-injeção com as substâncias de referência e pelos espectros no UV obtidos *on-line* pelo detector DAD.

A confiabilidade da condição cromatográfica estabelecida foi verificada pela seletividade do método e por testes de adequabilidade do sistema (*system suitability test*). O método foi considerado seletivo quando, numa

mesma condição analítica, todos os picos de interesse apresentaram homogeneidade espectral. Os testes de adequabilidade do sistema foram conduzidos pela avaliação dos parâmetros de resolução, fator de retenção, fator de cauda, número de pratos teóricos e DPR dos tempos de retenção para os picos de interesse. Todos os parâmetros foram calculados pelo *System Suitability* do programa LabSolutions (Shimadzu), de acordo com as equações recomendadas pela Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010). O tempo morto (t_0) do sistema cromatográfico foi determinado pela injeção, nas mesmas condições de análise, de 10 μ L de metanol grau HPLC.

4.5.5 Validação do método analítico

À condição cromatográfica selecionada e utilizada para a quantificação dos marcadores SPEA 1 e SPEA 2 no extrato foi realizada sua validação considerando-se critérios da ANVISA (BRASIL, 2003). A aquisição e o processamento dos dados foram realizados pelo programa LabSolutions (Shimadzu) e as análises estatísticas realizadas pelos programas Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2007) e GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software, 2007). Para o estudo de validação foi empregado o extrato de *S. pseudoquina* obtido conforme item 4.2.2.

4.5.5.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela homogeneidade espectral dos picos, realizada pela sobreposição dos espectros registrados nas regiões ascendente, apical e descendente dos mesmos, sendo considerados puros quando apresentaram exata sobreposição.

Para as determinações, foram empregados o extrato de *S. pseudoquina* ($n = 6$) obtido conforme item 4.2.2.

4.5.5.2 Linearidade

Foram construídas curvas analíticas para a avaliação concomitante da linearidade dos dois marcadores, strychnobiflavona (SPEA 2) e quercetina 3-O-metil-éter (SPEA 1) utilizando-se seis concentrações distintas para cada marcador. Cada ponto das curvas analíticas foi obtido pela injeção, em triplicata, de concentrações diferentes das substâncias de referência.

As curvas analíticas foram construídas relacionando-se as áreas integradas dos picos de interesse e as respectivas concentrações injetadas, para o cálculo do teor de cada marcador, em dois dias diferentes de análise.

Os dados obtidos foram avaliados através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação (r^2) correspondentes calculados. A análise estatística das curvas obtidas em dias diferentes foi realizada por análise de variância ($p < 0,05$). A faixa de concentração de trabalho foi de 50 a 550 $\mu\text{g/mL}$.

4.5.5.3 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi inicialmente estimado a partir da equação que considera os parâmetros de linearidade da curva analítica, descrita a seguir:

$$\text{LQ} = 10 \times s/S$$

Onde:

LQ = limite de quantificação,

s = desvio padrão do intercepto da curva de regressão,

S = inclinação da curva.

4.5.5.4 Limite de detecção (LD)

O LD inicialmente foi estimado a partir dos parâmetros da curva analítica, utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{LD} = 3,3 \times s/S$$

Onde:

LD = limite de detecção,

s = desvio padrão do intercepto da curva de regressão,

S = inclinação da curva analítica.

4.5.5.5 Precisão

Para a precisão intradia, foram utilizadas alíquotas do extrato de *S. pseudoquina* referentes à concentração do ponto médio da curva analítica ($n = 6$). A precisão interdia foi determinada em dois dias consecutivos, com analistas diferentes ($n = 12$).

Foi determinada a concentração dos analitos no extrato, o DPR

calculado, e as médias dos teores entre os dois dias de determinações comparadas pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

4.5.5.6 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pela fortificação do extrato obtido por sonicação com concentrações conhecidas de SPEA 1 e SPEA 2 simultaneamente. Para isso, foi realizada uma curva contendo extrato, fortificada com os marcadores em três níveis de concentração, baixa média e alta e uma curva de branco da matriz, contendo volumes de metanol em lugar das alíquotas dos marcadores. Para a curva fortificada, o volume adicionado de padrão foi retirado uma solução estoque de concentração 1000µg/mL de SPEA 1 e SPEA 2. Cada nível foi adicionado do extrato metanólico preparado conforme item 4.2.2, e de crescente alíquota dos marcadores (Tabela 5). Em seguida, procedeu-se com as análises (item 4.4.1.1).

Tabela 5: Alíquotas utilizadas para o preparo da curva de exatidão.

Nível	Extrato (mL)	SPEA 1 e SPEA 2 (mL)	Concentração teórica final de marcadores* (µg/mL)
1	4,75	0,25	50
2	3,25	1,75	350
3	2,25	2,75	550

* Concentrações calculadas a partir das alíquotas retiradas da solução estoque dos marcadores (1000µg/mL) para balão volumétrico de 5,0 mL. A concentração dos marcadores presentes no extrato não foi utilizada para as concentrações expostas nessa tabela.

Calculou-se a taxa de recuperação das quantidades dos marcadores adicionados ao extrato, ou seja, a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

4.5.5.7 Robustez

Foram preparadas seis amostras do extrato como descrito no item 4.2.2, sendo estas analisadas empregando-se a condição analítica estabelecida. Os seguintes parâmetros foram avaliados a fim de averiguar a robustez do método: temperatura do forno (38 e 42 °C); concentração de ácido acético na fase móvel (0,4 e 0,6%) e vazão de fase móvel (0,9 e 1,1

mL/min). As modificações inseridas foram avaliadas individualmente. Os teores dos analitos foram determinados para cada condição e os dados submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ou por meio do teste t de Student ($p < 0,05$).

Os teores, a resolução (R_s) e o fator de cauda (T) dos picos dos analitos foram determinados e os dados submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.6 Estudo de estabilidade preliminar a temperatura ambiente

A fim de avaliar a estabilidade dos extratos obtidos no item 4.2.2, foi realizado um teste de estabilidade preliminar nos tempos 0, 12, 24, 48 e 72 horas, empregando o método de HPLC-DAD validado. Para a realização do mesmo, as amostras ($n = 3$) foram mantidas na bandeja do injetor automático do aparelho HPLC à temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

As análises foram conduzidas conforme descrito posteriormente no item 5.2. Os teores dos marcadores químicos foram calculados em cada intervalo de tempo e submetidos à análise de variância seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.7 Comparação do perfil cromatográfico e dos teores de flavonoides em extratos provenientes de diferentes acessos de *S. pseudoquina* e amostras comerciais de quina.

Amostras provenientes de quatro diferentes acessos de *S. pseudoquina* e três amostras comerciais de quina (Figura 5) foram analisadas e comparadas quanto ao perfil cromatográfico e aos teores de flavonoides totais (Tabela 6). Os cálculos realizados estão detalhados no apêndice 1 para flavonoides totais, apêndice 2 para SPEA 1 e apêndice 3 para SPEA 2.



Figura 5: Amostras comerciais de quina.

Tabela 6: Amostras de *S. pseudoquina* e de quina analisadas quanto ao perfil fitoquímico e teor de flavonoides.

Amostras	Sigla	Procedência	Aspecto
Acesso de entrecasca de <i>S. pseudoquina</i>	A1	Jaboticatubas, MG	Constituída pela entrecasca seca, isenta da epiderme vegetal
Acesso de entrecasca de <i>S. pseudoquina</i>	A2	Uberlândia, MG	Constituída pela entrecasca seca, isenta da epiderme vegetal
Acesso de entrecasca de <i>S. pseudoquina</i>	A3	Rio Verde, GO	Constituída pela entrecasca seca, isenta da epiderme vegetal
Acesso de entrecasca de <i>S. pseudoquina</i>	A4	Montes Claros, MG	Constituída por galhos contendo epiderme vegetal
Quina adquirida no comércio	C1	Mercado Central, BH; MG	Embalada em pacote plástico vedado, contendo grandes pedaços de tronco apresentando epiderme vegetal.
Quina adquirida no comércio	C2	Mercado Central, BH	Embalada em pacote plástico vedado, contendo pequenos pedaços de tronco de cor mais escuras que as demais amostras.

Amostras	Sigla	Procedência	Aspecto
Quina adquirida no comércio	C3	Mercado Central, BH	Embalada em pacote plástico vedado, contendo grandes pedaços de tronco apresentando epiderme vegetal.

Nota: BH: Belo Horizonte, Minas Gerais.

Para a quantificação de flavonoides totais nos extratos da espécie, as amostras foram preparadas e analisadas em triplicata conforme já descrito (item 4.2.2 e 4.4.1.1). A fim de contemplar o intervalo linear do método validado neste trabalho, diferentes alíquotas do extrato metanólico das amostras foram utilizadas (Tabela 7). Os teores foram calculados empregando-se a equação da curva analítica média, obtida no ensaio de linearidade e expressos em miligrama por grama (mg/g) da droga vegetal. Os teores obtidos ($n = 3$) foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 7: Alíquotas dos acessos de *S. pseudoquina* e amostras comerciais de quina utilizadas para o ensaio de quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria UV- Vis

Amostras	Alíquotas (mL)
A1	0,5
A2	0,25
A3	2,0
A4	2,0
C1	2,0
C2	2,0
C3	2,0

Nota: A2: Acesso Uberlândia A3: Acesso Rio Verde, A4: Acesso Montes Claros, C1: Amostra comercial 1; C2: Amostra Comercial 2, C3: Amostra Comercial 3.

As amostras para análise cromatográfica por HPLC-DAD foram preparadas conforme já descrito no item 4.2.2 e posteriormente descrito no item 5.3. Os teores foram calculados utilizando-se o fator de resposta (SNYDER et al., 1997) e expressos em mg/g da droga vegetal, sendo estes (n

= 3) submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.8 Avaliação da atividade tripanocida

Os extratos obtidos pela percolação (item 4.2.1), EH, EAE, EEt e EAq, bem como os compostos isolados do extrato em acetato de etila de *S. pseudoquina* no presente trabalho, foram submetidos a avaliação *in vitro* da atividade tripanocida. A investigação dessa atividade foi motivada por estudo prévio realizado por Lage et al. (2013), que indicou atividade leishmanicida de extratos de *S. pseudoquina* e dos flavonoides SPEA 1 e SPEA 2 frente a parasitos de *Leishmania amazonensis*.

4.8.1 Ensaio biológico

O ensaio biológico foi realizado com epimastigotas, conforme proposto por Moura, (2014), com algumas modificações.

4.8.1.1 Cepas de parasitas, cultura *In Vitro*

Foram utilizados parasitos da cepa Y (DTU II) de *T. cruzi*, fornecidos pelo Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos do Departamento de Bioquímica e Biologia Celular da UFV, isolados a partir de um paciente infectado em fase aguda. Esta cepa leva à baixa parasitemia e alta mortalidade em camundongos (SILVA & NUSSENZWEIG, 1953) e é parcialmente sensível ao benzonidazol (FILARDI & BRENER, 1987). Os epimastigotas de *T. cruzi* cultivados em meio LIT foram congelados em nitrogênio líquido.

Para os ensaios, os parasitos foram descongelados e inoculados em uma garrafa de cultivo de 25 cm³ contendo aproximadamente 10 mL de meio Grace's adicionado de 10% de soro fetal bovino (FBS), sendo mantidos a 28 °C. Desde então, contagens diárias do número de parasitos foram realizadas em câmara de Neubauer.

Para manter o crescimento exponencial, repiques foram realizados a cada 4 ou 5 dias, a fim de expandir o número de parasitos para a realização do teste. Para tal, todo o conteúdo da garrafa de cultivo, foi transferido para tubo Falcon de 10 mL e centrifugado.

O meio foi descartado e o parasito sedimentado foi ressuspenso em novo meio de cultura, sendo então transferido para novas garrafas de cultivo em quantidade suficiente para manter a concentração de parasitos em 5×10^6 células/mL.

Para a realização do teste, foram necessários $7,2 \times 10^8$ células, mantidas em uma concentração final de $2,5 \times 10^7$ células/mL.

4.8.1.2 Células Vero, cultura *In Vitro*

As células Vero são derivadas de uma linhagem estabelecida a partir de células renais de embrião de macaco verde africano (*Chlorocebus aethiops*). Esta linhagem foi obtida da *American Type Culture Collection* e armazenada em tubos de criopreservação em nitrogênio líquido.

Para a manutenção das células Vero, foram utilizadas garrafas de cultura de 25 cm³ contendo 10 mL de meio de cultura RPMI adicionado de 1 a 10 % de soro fetal bovino. Foram colocadas aproximadamente 5×10^5 células por garrafa.

Os repiques dessas células foram feitos pela remoção do meio de cultura, lavagem da monocamada de células com 10 mL de solução salina 0,9% (estéril), adição de 5 mL de tripsina (100 mL de PBS 1X, 0,5 g de tripsina e 0,02g de EDTA) e incubação por intervalo de tempo variando de 2 a 3 minutos em estufa à 37° C para descolamento das células. A reação de descolamento foi interrompida pela adição de 10 mL de solução salina 0,9% e posterior homogeneização.

Esta suspensão celular foi acondicionada em tubo Falcon de 15 mL, centrifugada por 10 minutos a 152 g (5° C), o sobrenadante descartado e o "pellet" suspenso em 10 mL de solução salina 0,9% estéril. Uma alíquota foi retirada para contagem em câmara de Neubauer. As células foram centrifugadas novamente por 10 minutos a 152 xg (4 °C), suspensas em meio RPMI 10% SFB e uma quantidade de 1×10^6 células foram semeadas em 15 mL de meio de cultura RPMI 10% SFB em garrafas de 75 cm³ e incubadas em estufa à 37 °C, 5% CO₂ e atmosfera umidificada à 95%.

4.8.1.3 Padronização da resazurina

Variáveis como o tempo de incubação e o número de células

plaqueadas podem interferir nas respostas obtidas da resazurina para o teste com os parasitas, a fim de eliminá-las, foi realizada uma padronização destes parâmetros. Assim sendo, o Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos desenvolveu protocolo objetivando a otimização do número de células Vero e de parasitos utilizados, bem como do tempo de incubação necessário com o corante para cada tipo celular.

Haja vista que o método utilizado para avaliar a atividade tripanocida dos extratos e dos isolados SPEA 1 e SPEA 2 seguiu o protocolo já implantado e utilizado pelo Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos, não foram realizados testes para a padronização da resazurina frente ao tempo de leitura e número de células a serem utilizadas no procedimento. Assim sendo, para avaliar a atividade tripanocida dos extratos e isolados, foi utilizado $5,0 \times 10^6$ parasitas por poço, enquanto que para o ensaio de citotoxicidade foi utilizado $2,5 \times 10^5$ células por poço. O tempo de leitura para ambos foi de 2 horas após a adição de 20 μ L de resazurina 1mM a cada poço.

Na presença dos metabólitos produzidos durante a multiplicação do parasito, a resazurina sofre redução, tornando-se resorufina apresentando uma coloração rósea (MOURA, 2014 *apud* AHMED et al., 1994 & O'BRIEN et al., 2000), conforme ilustra a Figura 3.

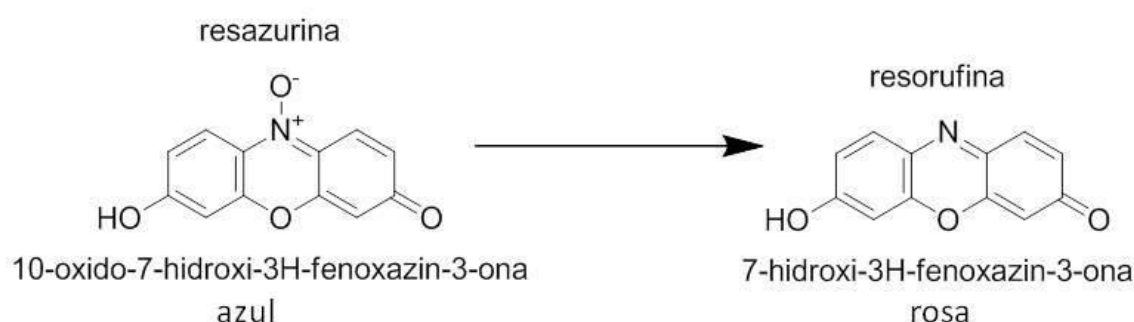


Figura 6: Redução da resazurina (responsável pela coloração azul) à resorufina (responsável pela coloração rosa).

Como as duas formas do corante (oxidada ou reduzida) absorvem luz em diferentes regiões de comprimento de onda, as leituras das absorbâncias foram feitas a 570 e 600 nm em leitor de microplacas. A porcentagem de redução do corante, foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Redução da resazurina} = [A_{570} - (A_{600} \times R_0)]$$

Onde, A570= absorvância a 570nm, A600= absorvância a 600nm e R0 é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorvância do controle negativo (C-), que continha meio de cultura e resazurina na ausência de células [R0=(A570C- /A600C-)].

4.8.1.4 Amostras

Os extratos de *S. pseudoquina* (item 4.2.1) e os flavonoides SPEA 1 e SPEA 2 foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), respectivamente, nas concentrações de 10 mg/mL e 10 mM, e congelados à -80°C.

4.8.1.5 Ensaio para a atividade tripanocida

Para a avaliação do efeito tripanosomicida dos compostos, as formas epimastigotas foram mantidas como descrito no item 4.8.1.1. Para quantificar a atividade de cada composto sobre o parasito, utilizou-se a reação colorimétrica da resazurina, previamente padronizada.

Após contagem em câmara de Neubauer, ajustou-se o número de parasitos para a concentração de $2,5 \times 10^7$ células/mL. Duzentos microlitros dessa suspensão foram adicionados a cada poço da placa de 96 poços, em triplicata. Logo após, 2µL das amostras preparadas conforme item 4.7.2, foram adicionados aos poços contendo os epimastigotas. Ao final, cada poço exibiu concentrações de 100 µg/mL para o extrato e 100 µM para os produtos naturais, além de 5×10^6 células. O benzonidazol foi testado na concentração de 100µM.

As placas foram incubadas em estufa BOD, a 28°C, por 24 h, 48 h e 72 horas. Para cada placa foram feitos controles conforme Tabela 8.

Tabela 8: Controles utilizados para o ensaio biológico.

Controle	Parasito	Extrato	Flavonoide	Benzonidazol	Resazurina
Negativo (R0)	-	+	+	-	+
Positivo 1	+	-	-	-	+
Positivo 2	+	-	-	+	+

* Nota: + (presente); - (ausente).

Após o intervalo de tempo, foram adicionados 20 µL de resazurina 1mM/poço e após 2, 3 ou 4 horas foi realizada a leitura da reação a 570nm e 600nm, utilizando um leitor de microplacas. Todo o experimento foi realizado em triplicata, com no mínimo 3 repetições.

A porcentagem de inibição da proliferação foi calculada a partir da fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[\frac{A570 - (A600 \times R0) \text{ Tratado}}{A570 - (A600 \times R0) \text{ Controle+}} \right] \times 100.$$

Onde, A570 = absorbância a 570nm, A600 = absorbância a 600nm e R0 é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo, ou seja, apenas meio de cultura e resazurina na ausência de parasitos [R0 = (A570 / A600)].

4.8.1.6 Ensaio de citotoxicidade

Afim de avaliar os efeitos tóxicos sobre as células hospedeiras, culturas de células Vero foram tratadas com os mesmos compostos testados para os parasitas. Assim sendo, 100µL de suspensão das células Vero, na concentração de $2,5 \times 10^5$ /mL, adicionados de 100 µL de meio RPMI foram pipetados em placas de 96 poços e incubados a 37°, 5% CO₂, por 24 h, 48h e 72 horas. Os extratos (EH; EAE; EEt e EAq) e os flavonoides SPEA 1 e SPEA 2 foram adicionados em uma concentração final de 100 µg/mL e 100 µM respectivamente.

Foram adicionados a cada placa: controles negativos (meio), controles positivos (meio+células), controles para avaliar o potencial dos compostos testados (meio+compostos) em reduzir o corante e o potencial do DMSO em afetar as células (meio + DMSO + Vero).

Após 24h, 48h e 72 horas de incubação a 37°C, foram adicionados 20 µL de resazurina 1mM a cada poço e leitura da placa foi realizada em leitor de microplacas (570 nm e 600nm). A porcentagem de inibição da proliferação induzida pelos compostos foi calculada utilizando-se a fórmula abaixo:

$\% \text{ inibi\c{c}\tilde{a}\tilde{o}} = 100 - [A570 - (A600 \times R0) \text{ Tratado} / A570 - (A600 \times R0) \text{ Controle+}] \times 100$

Onde, A570= Absorbância a 570nm, A600= Absorbância a 600nm, Controle + é o poço contendo células, meio e resazurina, na ausência do fármaco. R0 é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo (C-), ou seja, apenas meio de cultura e resazurina na ausência de células [R0 = (A570 / A600)C-].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento fitoquímico e obtenção dos flavonoides SPEA 1 e SPEA 2

5.1.1. Rendimento dos extratos obtidos por percolação

Os rendimentos dos extratos adquiridos através do processo de percolação seriada, conforme descrito no item 4.2.1, estão expostos na Tabela 9.

Tabela 9: Rendimentos da percolação seriada da entrecasca de *Strychnos pseudoquina* obtidos a partir de 300,0g da droga vegetal.

Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexânico (EH)	1,13	0,38
Acetato de etila (EAE)	7,82	2,61
Etanólico (EEt)	26,51	8,84
Aquoso (EAq)	12,38	4,13

Estes dados sugerem que o farmacógeno da entrecasca da droga vegetal é majoritariamente constituído por compostos polares quanto à composição dos metabólitos secundários. A análise por HPLC realizada nos extratos corrobora com esta sugestão, haja vista os perfis cromatográficos obtidos utilizando uma coluna de fase reversa C18, cujo ao picos majoritários eluem em tempos de retenção menores quando comparados aos demais sinais gerados pelo equipamento.

5.1.2. Análise dos extratos liofilizados

Análise por espectrofotômetro e por HPLC-DAD foi realizada nos extratos secos (EH, EAE, EEt e EAq), obtidos a partir da percolação seriada da entrecasca de *S. pseudoquina*, a fim de avaliar qual das amostras apresentava maiores concentrações de flavonoide, bem como do marcadores, SPEA 1 e SPEA 2 (Tabela 10 e Figura 7)

Tabela 10: Resultados obtidos para flavonoides totais e marcadores SPEA 1 e SPEA 2 para EH, EAE, EEt e EAq obtidos através da percolação seriada da entrecasca de *S. pseudoquina*.

Amostras	Flavonoides totais (mg/g)	DPR (%)	SPEA 1 (mg/g)	DPR (%)	SPEA 2 (mg/mL)	DPR (%)
EH	80,83	0,0	7,39	0,10	5,49	0,82
EAE	346,04	0,0	101,59	0,16	85,94	0,16
EEt	23,8	0,0	10,83	0,24	10,67	1,84
Eaq	*	*	*	*	*	*

Nota: Cada amostra foi analisada em triplicata (n=3). EH: Extrato Hexânico; EAE: Extrato em Acetato de Etila; EEt: Extrato Etanólico; EAq: Extrato Aquoso.

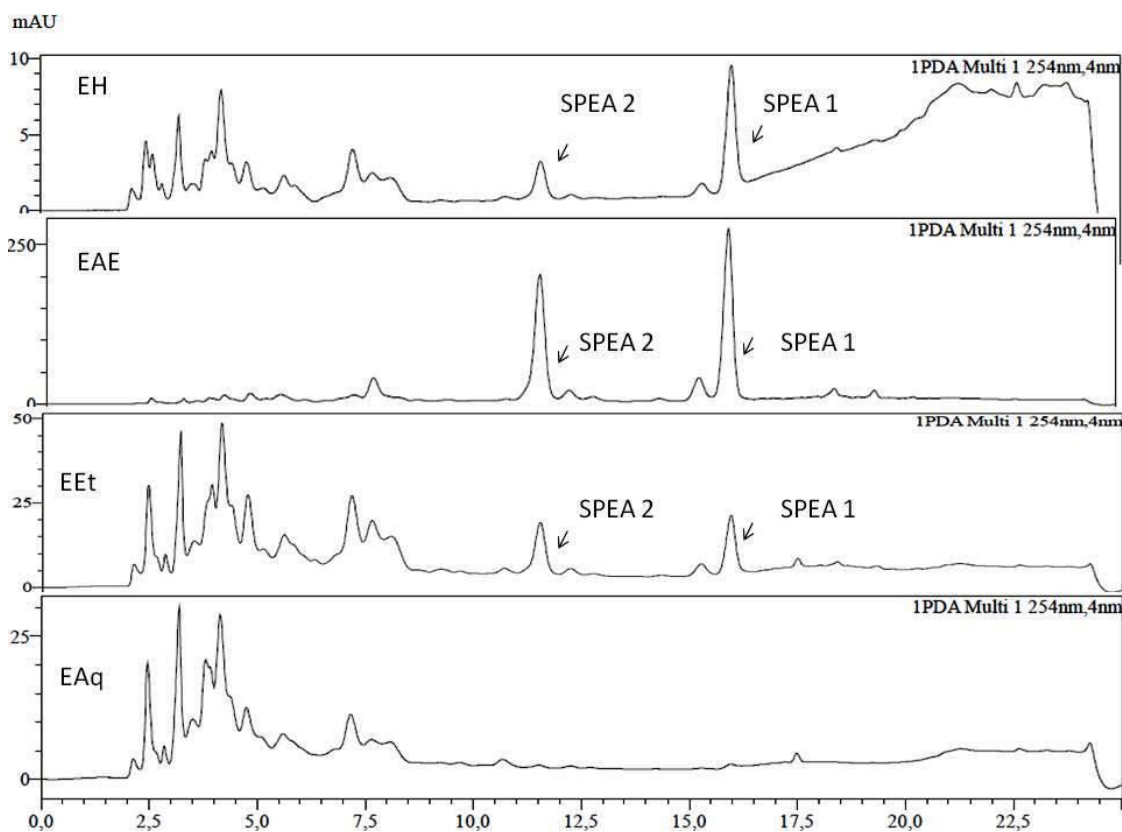


Figura 7: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD a partir da análise dos extratos EH, EAE, AEt e EAq, oriundos da percolação seriada da entrecasca de *S. pseudoquina*.

Nota: EH: Extrato Hexânico; EAE: Extrato em Acetato de Etila; EEt: Extrato Etanólico; EAq: Extrato Aquoso.

Para a análise cromatográfica por HPLC, os extratos utilizados foram preparados solubilizando-se 9,9 mg de cada amostra em metanol grau HPLC para balão volumétrico de 10,0 mL. As amostras utilizadas para o ensaio de flavonoides totais, foram preparadas conforme item (4.2.2), alíquotas de 1,0 mL do EAE e 2,0 mL do EH, EEt e EAq foram empregadas para a reação colorimétrica com cloreto de alumínio.

As amostras EH, EAE e EEt exibiram a presença majoritária dos marcadores SPEA 1 e SPEA 2, indicando que a obtenção dos extratos pela percolação seriada proporcionou o enriquecimento desses flavonoides em EAE. Já o extrato EAq, não apresentou a presença dos mesmos, conforme ilustra a Tabela 10 e Figura 7.

Assim, o perfil cromatográfico e a concentração de flavonoides presentes nesses extratos também apresentaram distinção quanto a concentração de flavonoides, o que demonstra a capacidade seletiva do

solvente acetato de etila na extração desses dois compostos a partir da entrecasca de *S. pseudoquina* (Figura 8).

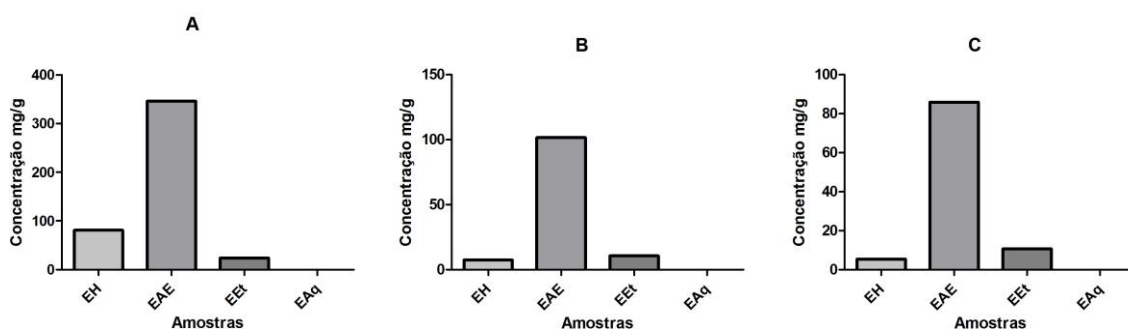


Figura 8: Comparação das concentrações (mg/g) de: **A**, Flavonoides Totais; **B**, SPEA 1 e **C**, SPEA 2 nos extratos de *S. pseudoquina*. Nota: Nota: EH: Extrato Hexânico; EAE: Extrato em Acetato de Etila; EEt: Extrato Etanólico; EAq: Extrato Aquoso.

A análise do cromatograma demonstrou que o EH é rico em compostos apolares, já que o mesmo apresentou sinal significativo com tempo de retenção após 20 minutos. Tal fato se deve à característica da fase estacionária, que por ser de fase reversa, interage mais com compostos apolares que somente são eluidos da coluna quando a força da fase móvel é aumentada. Como os flavonoides são compostos mais polares, o EH não apresentou altas concentrações destes metabolitos quando analisado por espectrofotometria. (CAZAROLLI et al., 2008)

O EAE apresentou uma maior concentração de flavonoides, principalmente strychnobiflavona e quercetina 3-O-metil-éter, sendo portanto, o extrato selecionado para o isolamento e purificação desses marcadores. Esse resultado corrobora com os resultados de Lage et al., (2013), que também detectou o extrato em acetato de etila como solvente seletivo para a extração desses flavonoides na entrecasca de *S. pseudoquina*.

O EEt exibiu uma grande quantidade de compostos polares, além dos marcadores. Já o EAq sugere grande quantidade de compostos polares e ausência dos flavonoides e dos marcadores strychnobiflavona e quercetina 3-O-metil-éter. A análise cromatográfica dos extratos EH, EAE, EEt e EAq (Figura 3) para os marcadores, corrobora com as análises para flavonoides totais, haja vista a os resultados obtidos para os extratos EH, EAE e EEt e EAq, conforme ilustra a Figura 8.

5.1.3. Fracionamento cromatográfico do extrato em acetato de etila

Baseando-se na análise de dados referente aos extratos secos e liofilizados obtidos pelo processo de percolação, e conforme já realizado por Lopes (2012), foi realizado o fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel do extrato EAE (Figura 9).



Figura 9: Fracionamento cromatográfico do EAE em coluna de sílica gel em três diferentes fases da eluição.

Nota: EAE: Extrato em Acetato de Etila.

O fracionamento cromatográfico de 6,0g de EAE resultou em 465 frações, sendo todas concentradas em evaporador rotatório e analisadas por CCD empregando solução etanólica 6M de H_2SO_4 como revelador. De acordo com a similaridade do perfil cromatográfico (Figura 10), as mesmas foram reunidas em 27 grupos de frações, conforme demonstrado na Tabela 1



Figura 10: Perfil obtido por CCD e frações de EAE eluídas da coluna de sílica, após.

Nota: EAE: Extrato em Acetato de Etila

Haja vista a diversidade de compostos encontrados durante o fracionamento, uma variedade de fase móvel (Tabela 11) foi utilizada a fim de permitir a análise dos constituintes químicos presentes em cada fração.

Tabela 11: Fases móveis utilizadas na técnica de CCD em sílica gel para grupos de frações oriundos do fracionamento cromatográfico de EAE.

Fase móvel	Frações
Hexano - Diclorometano (2:8)	1 a 17
Acetato de Etila - Diclorometano (1:1)	18 a 35
Acetato de Etila - Diclorometano (2:8)	36 a 77
Acetato de Etila - Diclorometano (3:7)	78 a 130
Acetato de Etila – Clorofórmio (1:1)*	131 a 229
Acetato de Etila – Clorofórmio (4:6)*	230 a 302
Acetato de Etila – Clorofórmio (6:4)*	303 a 324
Acetato de Etila – Clorofórmio (8:2)*	325 a 378
Acetato de Etila – Clorofórmio (8:2)**	336 a 392
Acetato de Etila – Ácido Acético (9:1)	393 a 434
Acetato de Etila – Etanol (7:3)*	435 a 465

* adicionado de 11% de ácido acético.

** adicionado de 13% de ácido acético.

Nota: EAE: Extrato em Acetato de Etila.

Dois grupos de frações G9 (0,613g) e G16 (0,836g) apresentaram dois sólidos amorfos de coloração amarelada que ao ser analisado em CCD e eluido em fase móvel acetato de etila : clorofórmio (4:6) apresentaram manchas únicas com Rf's de 0,7 e 0,41 referentes à quercetina 3-O-metil-éter e strychnobiflavona respectivamente.

O G9, constituído pelas frações 51-77 foi submetido à recristalização em diclorometano, sendo obtido 612,9 mg de um sólido amorfo, sendo já identificado e descrito por Lopes (2012) e denominado quercetina 3-O-metil-éter (SPEA 1), (Figura 1). O segundo grupo, constituído pelas frações 131-184, foi submetido à recristalização com acetato de etila e etanol, resultando em 836,1 mg de um sólido amarelo amorfo também já identificado e descrito por Lopes (2012), denominado strychnobiflavona (SPEA 2), (Figura 1).

Estes sólidos ao serem submetidos à análise por HPLC-DAD e sob as condições previamente estabelecidas (item 5.3), pode-se observar a presença de um único pico apresentando tempos de retenção de 11,3minutos para SPEA 2 e 15,7 minutos para SPEA 1. A coinjeção com soluções padrões de SPEA 1 e SPEA 2, bem como análise dos espectros de UV, confirmou a identidade dos sólidos. A pureza também foi avaliada pela medida das faixas de fusão de ambos os sólidos, após recristalização em solvente de diclorometano (SPEA 1) e uma mistura de acetato de etila e etanol (SPEA 2), sendo encontrado 273,7 à 275 °C para SPEA 1 e 336,1 à 337,8 °C para SPEA 2. As faixas estreitas encontradas para os valores de ponto de fusão reforçam a indicação de pureza de SPEA 1 e de SPEA 2 isolados, sendo estes utilizados posteriormente como padrões para o processo de desenvolvimento e validação dos métodos de quantificação desses marcadores em *S. pseudoquina* no presente trabalho.

5.2 Validação de método analítico por espectrofotometria no UV-Vis para a quantificação de flavonoides totais em *S. pseudoquina*.

A quantificação de flavonoides totais em extratos e frações de *S. pseudoquina* foi realizada por espectrofotometria no UV-Vis, o comprimento de onda utilizado para a leitura foi de 420 nm, a escolha do mesmo foi baseada em uma varredura do extrato de 200 à 700 nm realizada antes e após reação com cloreto de alumínio (AlCl₃).

O reagente, cloreto de alumínio, quando adicionado ao extrato, forma complexos estáveis entre o cátion alumínio e as moléculas de flavonoides em solução metanólica, resultando em deslocamento batocrômico e perceptível intensificação da coloração da solução de leitura (efeito hiperacrômico). Tal reação, permite que a quantificação de flavonoides empregando método espectrofotométrico seja realizada em região de comprimento de onda mais seletivo, diminuindo a interferência de outras substâncias, especialmente ácidos fenólicos (MARCUCCI et al., 2009).

Ainda segundo Marcucci et al. (2009), embora formem complexos com o reagente cloreto de alumínio, os ácidos fenólicos, absorvem em comprimentos de onda em torno de 355 nm, região esta abaixo da absorvância resultante com a complexação com flavonoides. Portanto, pode-se afirmar que os ácidos fenólicos presentes nos extratos da entrecasca da *S. pseudoquina*, não interferem na quantificação de flavonoides totais.

Kreft e colaboradores (2002), quantificaram rutina de *Fagopyrum esculentum* Moench empregando três métodos distintos: dois por espectrofotometria na região do UV-Vis, após reação com $AlCl_3$, e outro empregando HPLC-FR. O teor de rutina obtido pelo método espectrofotométrico foi 30% superior aquele determinado pelo método por HPLC-FR. Estes dados indicam que os flavonoides totais presentes nos extratos são detectados e quantificados pelo método de espectrofotometria no UV – Vis, sendo um método de seletividade limitada para a quantificação de um determinado ou grupo de flavonoide separadamente.

A quantificação de flavonoides por HPLC-DAD, em comparação com aquela realizada por métodos espectrofotométricos, possibilita determinar cada composto isoladamente. Por outro lado, considerando-se que a atividade biológica de espécies medicinais frequentemente está associada a efeitos sinérgicos entre diferentes constituintes de uma mesma classe, ou de classes distintas, as quantificações de teores totais por métodos espectrofotométricos, como descritas aqui para flavonoides totais, seria uma estratégia válida para a padronização de drogas vegetais e derivados (GARCIA, 2011). Assim, no presente trabalho optou-se por efetuar a quantificação dos flavonoides por ambos os métodos.

Os parâmetros avaliados na validação do método espectrofotométrico

no UV-Vis foram linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. O extrato utilizado para a validação de todos os parâmetros do método foi preparado conforme descrito no item 4.2.2.

5. 2.1 Seletividade

Análise de seletividade busca avaliar a capacidade que o método possui de medir exatamente os analitos de interesse em presença de outros de outros componentes existentes no extrato (Brasil, 2003).

Foram obtidos espectros de duas soluções de leitura contendo extrato preparado conforme item (4.2.2), uma sem a adição de AlCl_3 e de outra contendo o reagente de cor. O procedimento foi realizado para avaliar a seletividade do método em relação a possíveis interferentes contidos na matriz vegetal. Os espectros obtidos para as duas soluções de leitura na faixa de 200 a 700 nm estão representados na Figura 11.

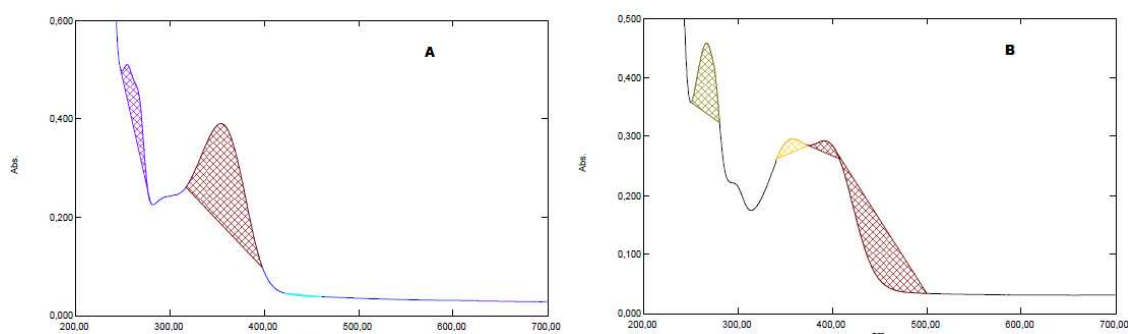


Figura 11: Espectros no UV- vis, registrados na região de 200 à 700 nm, obtidos pela varredura da solução de leitura do extrato adquirido por sonicação (A) sem adição de AlCl_3 e (B) após adição de AlCl_3 .

No espectro da solução de leitura sem adição da solução de AlCl_3 observa-se uma absorção quase imperceptível no comprimento de onda de 420 nm, que é anulada pelo uso da solução de compensação. No espectro obtido para a solução com o reagente de cor, observa-se uma banda intensa e com máximo de absorção em torno de 420 nm. Dessa forma, o uso da solução de compensação elimina eventuais interferentes da matriz.

É desejável que a solução de leitura sem adição de cloreto de alumínio não apresente absorção significativa em 420 nm, indicando que não há

interferência da matriz para a quantificação do complexo resultante da complexação dos flavonoides presentes no extrato com o cloreto de alumínio.

5.2.2 Linearidade

A análise de linearidade verifica a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do marcador no extrato dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003)

As curvas analíticas foram construídas, após reação da substância de referência (rutina) com reagente de cloreto de alumínio 8%. Duas curvas foram traçadas em dias diferentes, utilizando-se cinco soluções de concentrações distintas. A curva analítica obtida indicou relação linear entre a concentração de rutina e a absorvância dentro da faixa avaliada. A Tabela 12 apresenta os valores de concentração e as respectivas absorvâncias obtidas no teste de linearidade.

Tabela 12: Curva analítica de rutina após reação com AlCl_3 e média das absorvâncias obtidas para cada ponto da curva analítica.

Dia	Nível (concentrações $\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias
1º	1 (2,0 $\mu\text{g/mL}$)	0,083
	2 (5,0 $\mu\text{g/mL}$)	0,123
	3 (10,0 $\mu\text{g/mL}$)	0,198
	4 (20,0 $\mu\text{g/mL}$)	0,369
	5 (30,0 $\mu\text{g/mL}$)	0,512
2º	1 (2,0 $\mu\text{g/mL}$)	0,079
	2 (5,0 $\mu\text{g/mL}$)	0,130
	3 (10,0 $\mu\text{g/mL}$)	0,208
	4 (20,0 $\mu\text{g/mL}$)	0,391
	5 (30,0 $\mu\text{g/mL}$)	0,562

Através da análise de variância comprovou-se ausência de diferença estatística entre as curvas analíticas obtidas em dias distintos e, por isso, todos os dados foram reunidos obtendo-se uma única curva analítica, pela plotagem da concentração de rutina *versus* a absorvância. A equação da reta

de melhor ajuste foi calculada pelo método dos mínimos quadrados. A Figura 12 representa a média dos valores teóricos obtidos através das curvas analíticas obtidas.

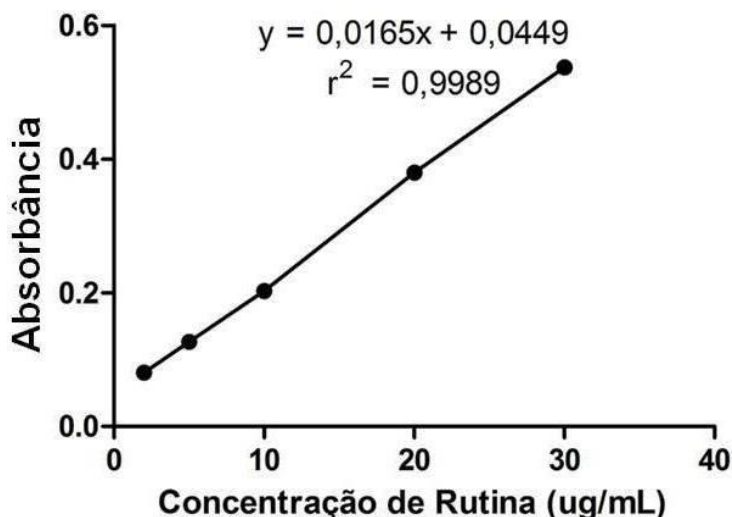


Figura 12: Curva analítica média obtida em dias distintos pelo método espectrofotométrico para rutina após reação com $AlCl_3$.

Os resultados da análise estatística da curva analítica obtida estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13: Resultados da análise estatística dos dados provenientes da curva analítica obtida para quantificação de rutina por espectrofotometria no UV-Vis, após reação com $AlCl_3$

Parâmetros	Valores obtidos para a curva média
Faixa linear (μ/mL)	2,0 – 30,0
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9989
Inclinação	0,0165
Erro padrão da inclinação ($\times 10^{-5}$)	15,11
Intercepto	0,0449
Erro padrão do intercepto ($\times 10^{-5}$)	255,44

A análise de covariância indicou que as inclinações e os interceptos das duas retas foram equivalentes e, portanto, a equação da reta foi estabelecida com os valores médios, resultando na equação $y = 0,0165x + 0,0449$ com r^2 de 0,9989.

5.2.3 Limites de quantificação e de detecção

O limite de detecção (LD) consiste na menor quantidade do marcador presente no extrato que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado sob as condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação (LQ), refere-se a menor quantidade do marcador presente no extrato, que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

O desvio padrão do intercepto e a inclinação da curva analítica foram utilizados para o cálculo do limite de quantificação do método, obtendo-se o valor de 1,55 µg/mL. Já o limite de detecção do método, calculado pela equação correspondente, foi de 0,51 µg/mL.

5.2.4 Precisão intradia

O cálculo da precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.

A precisão intradia (repetibilidade) foi avaliada utilizando-se seis determinações no ponto médio de concentração de rutina da curva analítica. Os valores de absorvância obtidos foram utilizados para o cálculo do teor de flavonoides totais e do desvio padrão relativo (DPR) em relação à droga vegetal. A Tabela 14 apresenta os resultados para a precisão intradia.

Tabela 14: Concentrações em mg/g e percentagem de flavonoides totais determinados em *S. pseudoquina* pelo método espectrofotométrico com $AlCl_3$ para avaliação da precisão intradia.

Amostra	Concentração na droga vegetal (mg/g)	Teor (%)
1	12,06	1,21
2	12,25	1,23
3	12,32	1,23
4	12,32	1,23
5	12,19	1,22
6	12,13	1,21
Média	12,21	1,22
DPR	0,844	

O valor encontrado para o desvio padrão relativo (0,844%), inferior a 5%, indica que o método possui precisão intradia adequada, segundo critérios da ANVISA (BRASIL, 2003).

5.2.5 Precisão interdia

A precisão interdia (reprodutibilidade) foi avaliada a partir de doze determinações no ponto médio de concentração de rutina da curva analítica, em dois dias diferentes e com analistas diferentes ($n = 24$). O teor de flavonoides totais na droga vegetal foi calculado a partir dos valores de absorvância obtidos para cada solução de leitura e o DPR foi calculado para as vinte e quatro determinações. A Tabela 15 apresenta os resultados referentes à avaliação da precisão interdia.

O desvio padrão relativo obtido para a precisão interdia (1,56%) foi inferior a 5%, indicando que o método possui precisão interdias adequada, segundo critérios da ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 15: Concentrações (mg/g) e percentagem de flavonoides totais determinados em *S. pseudoquina* pelo método espectrofotométrico com $AlCl_3$ para avaliação da precisão interdia.

Dia	Concentrações na solução de leitura (mg/g)	Teor (%)
1	11,87	1,19
	11,74	1,17
	11,87	1,19
	11,87	1,19
	12,25	1,23
	12,06	1,21
	11,81	1,18
	11,62	1,16
	11,49	1,15
	11,56	1,16
	11,62	1,16
	11,62	1,16
2	12,82	1,28
	12,76	1,28
	13,32	1,33
	13,14	1,31
	13,07	1,31
	13,07	1,31
	13,20	1,32
	13,20	1,32
	13,26	1,33
	13,07	1,31
	13,07	1,31
	13,07	1,31
Média	12,43	1,49
DPR		1,56

5.2.6 Exatidão

A medida de exatidão busca monitorar a proximidade dos resultados obtidos pelo método usado em relação ao valor verdadeiro.

A exatidão do método foi avaliada em ensaio de recuperação, conforme descrito no item 4.4.3.7 em três níveis de concentração diferentes, com triplicata para cada nível. A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos para as soluções de leitura provenientes dos extratos fortificados e do extrato não fortificado (sem a adição de rutina).

Tabela 16: Ensaio de recuperação de rutina para avaliar a exatidão do método de quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria no UV-Vis.

Níveis de fortificação	A	B	C	D	E	Recuperação aparente de Rutina (%)	DPR (%)
1	2,2	4,37	6,57	9,16	2,1	95,13	11,56
2	9,6	4,37	13,97	16,23	9,1	95,39	2,68
3	29,8	4,37	34,17	34,98	27,9	93,50	0,72

Nota: A= Concentração experimental de rutina adicionada à solução de leitura ($\mu\text{g/mL}$); B = Concentração experimental de flavonoides totais contido no extrato ($\mu\text{g/mL}$); C = Somatório de flavonoides totais contido no extrato fortificado ($\mu\text{g/mL}$); D = Concentração experimental de flavonoides totais contido no extrato fortificado ($\mu\text{g/mL}$); E = Concentração de rutina recuperada calculada a partir da diferença de D – B.

Segundo a AOAC (2002), os valores de recuperação dependem do teor dos constituintes nas amostras. Considerando-se que para os flavonoides totais este teor varia de 0,1 a 10,0%, são aceitáveis recuperações de 90 a 108%. Portanto, como os valores de recuperação encontrados no ensaio variaram de 93,5 a 95,39%, o método para quantificação de flavonoides totais em matrizes de *S. pseudoquina* atende os requisitos para o ensaio de exatidão.

5.2.7 Robustez

A medida de robustez de um método, analiticamente, consiste em avaliar a sua capacidade de resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Constatando a susceptibilidade do método a variações

promovidas nas condições analíticas, estas deverão ser controladas, sendo incluídas algumas precauções no procedimento (Brasil, 2003).

Na presente validação, a robustez foi realizada a fim de avaliar a estabilidade do complexo formado entre o cloreto de alumínio e os flavonoides presentes nos extratos de *S. pseudoquina*. Haja vista que o tempo determinado pelo método foi de 20 minutos, foram realizadas leituras de seis soluções obtidas a partir de três diferentes extrações no comprimento de onda de 420 nm nos tempos de 15 e 25 minutos. Adicionalmente, variações nos volumes de ácido acético e de cloreto de alumínio também foram testados. A Figura 13 apresenta graficamente os resultados obtidos, como a média das determinações para cada variação proposta ($n = 6$).

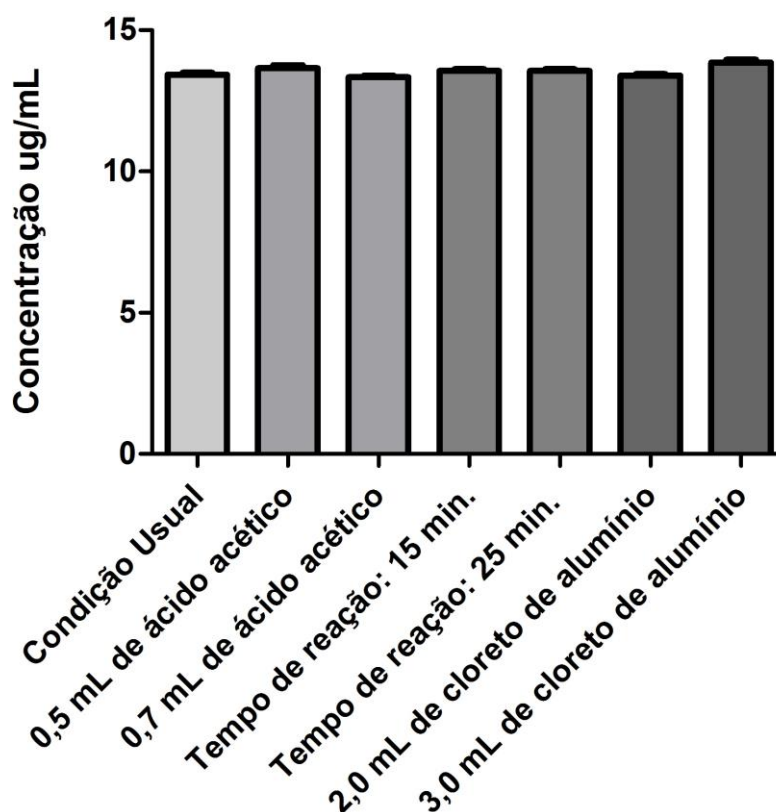


Figura 13: Influência do volume de ácido acético, tempo de leitura e volume cloreto de alumínio na robustez do método espectrofotométrico para quantificação de flavonoides totais (média, $n = 6$).

Após análise de variância e teste de Tukey os dados não indicaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os teores frente às variações testadas e, portanto, o complexo formado pela reação com cloreto

de alumínio mantém-se estável mesmo frente à alterações deliberadas inseridas na execução do método.

5.3 Desenvolvimento e validação do método para quantificação de marcadores em *S. pseudoquina* por HPLC-DAD.

A fim de quantificar os flavonoides quercetina 3-O-metil-éter e strychnobiflavona presentes na entrecasca da *S. pseudoquina*, responsáveis pela atividade leishmanicida da droga vegetal, um método utilizando técnicas de HPLC foi desenvolvido e validado. Análise preliminar foi realizada visando a análise da mistura dos dois marcadores, Foi utilizado gradiente segmentado composto pelas fases móveis acetonitrila e água ultra pura acidificada com 2,0% de ácido acético. A condição cromatográfica está descrita na Tabela 17 e o resultado obtido está exposto na Figura 14. Coluna shim-pack C18, de 15 cm de comprimento por 4,6mm de diâmetro e partículas de 5,0µm foi empregada.

Tabela 17: Condição cromatográfica utilizada para análise preliminar dos marcadores SPEA 1 e SPEA 2.

Tempo (min)	Eluente (%)		Coluna	Vazão (mL/min)	Tem (°C)
	A	B			
Condição analítica A					
0	95	5	C18: 15cm x 4,6mm; partículas de 5µm	1,0	40
5	95	5			
30	80	80			
35	80	90			
37	65	90			
40	10	5			
45	95	5			

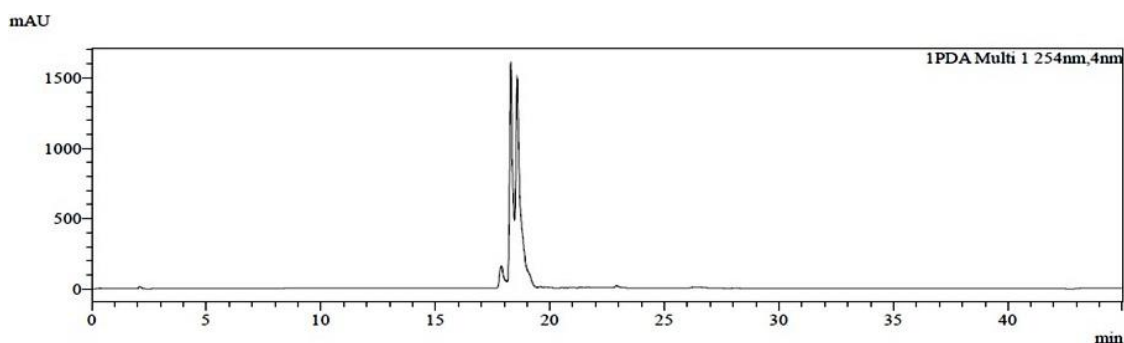


Figura 14: Cromatograma em HPLC-DAD resultante da análise preliminar de SPEA 1 e SPEA 2.

Como pelas condições cromatográficas iniciais não foi possível obter resolução satisfatória dos dois marcadores, outros métodos foram propostos e otimizados a fim de atender todos os parâmetros cromatográficos para que as premissas da validação fossem testadas. A tabela 18 resume a otimização das condições cromatográficas visado a quantificação de SPEA 1 e SPEA 2 em *S. pseudoquina*.

Tabela 18: Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método por HPLC-DAD para a quantificação dos marcadores SPEA 1 e SPEA 2 em *S. pseudoquina*.

Tempo (min)	Eluente (%)		Vazão (mL/min)	Tem. (°C)	Tempo (min)	Eluente (%)		Vazão (mL/min)	Tem. (°C)
	A	B				A	B		
Condição analítica A*					Condição analítica B*				
0	95	5			0	95	5		
5	95	5			10	45	55		
30	80	80			11	45	55		
35	80	90	0,8	40	15	40	80	0,6	40
37	65	90			20	95	5		
40	10	5			25	95	5		
45	95	5							
Condição analítica C*					Condição analítica D*				
0	95	5			0	95	5		
5	50	50			15	20	80		
10	50	50			20	95	5		
15	20	80	0,8	40	25	95	5	0,6	40
20	95	5							
25	95	5							

Tempo (min)	Eluente (%)		Vazão (mL/min)	Tem. (°C)	Tempo (min)	Eluente (%)		Vazão (mL/min)	Tem. (°C)
	A	B				A	B		
Condição analítica E*					Condição analítica F*				
0	95	5			0	95	5		
5	90	10			15	10	90		
10	80	20			20	95	5		
12	70	30			25	95	5		
14	60	40						0,6	40
16	50	50	0,6	40					
18	40	60							
20	20	80							
22	95	5							
25	95	5							
Condição analítica G*					Condição analítica H**				
0	95	5			0	80	20		
15	10	90			10	20	80		
20	95	5			12	20	80		
25	95	5			15	10	90		
			0,8	40	17	10	90	0,8	40
					22	80	20		
					25	80	20		
Condição analítica I***					Condição analítica J****				
0		50			0		50		
5		70			5		70		
10		90	0,6	40	10		90	0,8	40
14		50			14		50		
15		50			15		50		
Condição analítica K****					Condição analítica L****				
0	50	50			0	45	55		
9	35	65			10	35	65		
12	35	65			13	35	65		
13	10	90			13,5	10	90		
16	10	90	1,0	40	16	10	90	1,0	40
18	50	50			18	45	55		
20	50	50			20	45	55		
Condição analítica M****					Condição analítica N****				
0	50	50			0	50	50		
14	35	65			16	35	65		
14,5	10	90			16,5	10	90		
16,5	10	90	1,0	40	18	10	90	1,0	40
18,0	50	50			18,5	50	50		
20	50	50			20	50	50		

Tempo (min)	Eluente (%)		Vazão (mL/min)	Tem. (°C)	Tempo (min)	Eluente (%)		Vazão (mL/min)	Tem. (°C)
	A	B				A	B		
Condição analítica O****					Condição analítica P****				
0	50	50	1,0	10	0	50	50	1,0	30
16	40	60			16	40	60		
16,5	10	90			16,5	10	90		
18	10	90			18	10	90		
18,5	50	50			18,5	50	50		
20	50	50			20	50	50		
Condição analítica Q****					Condição analítica R****				
0	60	40	1,0	40	0	55	45	1,0	40
16	40	60			16	40	60		
16,5	10	90			16,5	10	90		
18	10	90			18	10	90		
18,5	50	50			18,5	50	50		
20	60	40			20	55	45		
Condição analítica S****					Condição analítica T****				
0	55	45	1,2	35	0	50	50	0,8	30
16	35	65			16	30	70		
16,5	10	90			16,5	10	90		
18	10	90			18	10	90		
18,5	50	50			18,5	50	50		
20	55	45			20	50	50		
Condição analítica U****					Condição analítica V****				
0	60	40	0,8	30	0	50	50	0,8	30
16,5	10	90			15	30	70		
18	10	90			15,1	10	90		
18,5	60	40			18	10	90		
20	60	40			18,5	50	50		
			20	50	50				
Condição analítica W****					Condição analítica X****				
0	50	50	0,8	30	0	50	50	0,8	30
15	45	65			16	30	70		
15,1	10	90			16,1	10	90		
18	10	90			18	10	90		
18,5	50	50			18,1	50	50		
20	50	50			20	50	50		
Condição analítica Y****					Condição analítica Z****				
0	50	50	0,8	30	0	70	30	0,8	30
16	30	70			30	30	70		
16,5	10	90			30,5	10	90		
18	10	90			32,5	10	90		
18,5	50	50			33	70	30		
20	50	50			35	70	30		

Tempo (min)	Eluente (%)		Vazão (mL/min)	Tem. (°C)	Tempo (min)	Eluente (%)		Vazão (mL/min)	Tem. (°C)
	A	B				A	B		
Condição analítica A2*****					Condição analítica B2*****				
0	50	50			0	50	50		
9	35	65			9	35	65		
12	35	65			12	35	65		
13	10	90	1,0	30	13	10	90	1,2	30
16	10	90			16	10	90		
18	50	50			18	50	50		
20	50	50			20	50	50		
Condição analítica C2*****					Condição analítica D2*****				
0	50	50			0	50	50		
9	35	65			11	36	64		
12	35	65			12	35	65		
13	10	90	1,1	30	15	35	65	1,0	30
16	10	90			15,5	10	90		
18	50	50			18	10	90		
20	50	50			20	50	50		
Condição analítica E2*****					Condição analítica F2*****				
0	50	50			0	50	50		
11	38	62			25	30	70		
15	38	62			25,5	10	90		
15,5	10	90	1,0	30	27,5	10	90	1,0	30
18	10	90			28	50	50		
18,1	50	50			30	50	50		
20	50	50							
Condição analítica G2*****					Condição analítica H2*****				
0	50	50			0	50	50		
17	37	63			12	40	60		
17,5	10	90			17,5	10	90	1,0	30
20,5	10	90	1,0	30	20,5	10	90		
21	50	50			21	50	50		
25	50	50			25	50	50		

Nota: * Eluentes: Água acidificada com AcOH 0,5% (A), Acetonitrila (B), coluna Shim-pack CLC-ODS-C18-M (150 x 4,6 mm i.d., 4,8µm). **Eluentes: Água acidificada com AcOH 0,5% (A), MeOH (B), coluna Shim-pack CLC-ODS-C18-M (150 x 4,6 mm i.d., 4,8µm). *** Eluentes: Água acidificada com AcOH 0,5% (A), MeOH (B); coluna Shim-pack CLC-ODS-C18-M (150 x 2,0 mm i.d., 4,8µm). **** Eluentes: Água acidificada com AcOH 0,5% (A), MeOH (B); coluna Shim-pack CLC-ODS-C18-M (250 x 4,6 mm i.d., 4,8µm). *****Eluentes: Água acidificada com AcOH 1,0% (A), MeOH (B); coluna Shim-pack CLC-ODS-C18-M (250 x 4,6 mm i.d. 4,8µm). *****Eluentes: Água acidificada com AcOH 0,5% (A), MeOH (B); coluna Shim-pack CLC-ODS-C18-M (250 x 4,6 mm i.d. 4,8µm).

A condição cromatográfica H2 resultou na melhor e mais adequada resolução dos flavonoides quercetina 3-O-metil-éter e strychnobiflavona (Figura 15), sendo a mesma usada para validação segundo critérios da ANVISA e AOAC (AOAC, 2002; BRASIL, 2003). Os testes de adequabilidade do sistema foram realizados conforme descrito no item 5.3.1. O tempo morto da corrida cromatográfica foi determinado pela injeção de 10 μ L de metanol.

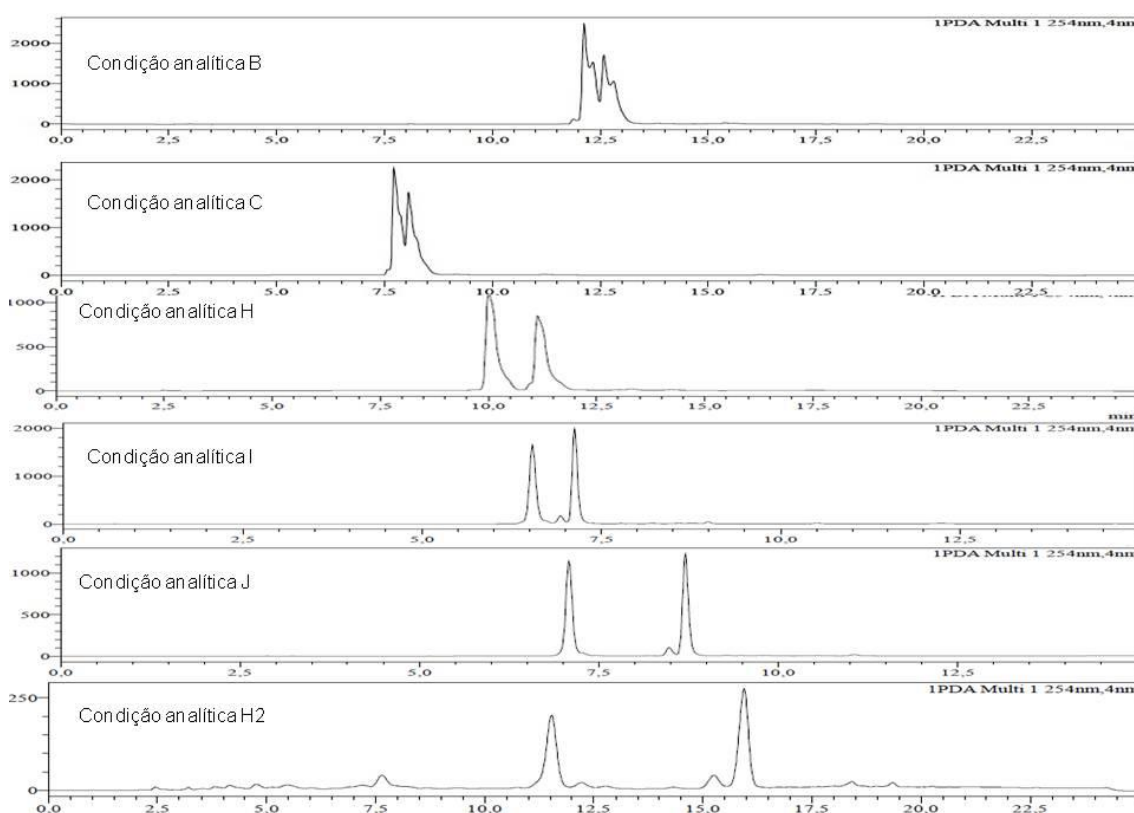


Figura 15: Cromatogramas em HPLC-DAD gerados durante o desenvolvimento e otimização do método para quantificação dos marcadores SPEA 1 e SPEA 2 em *S. pseudoquina*.

5.3.1 Seletividade

A seletividade da condição cromatográfica estabelecida (item 5.3.1) foi avaliada para os extratos em soluções metanólicas (item 4.2.2). Na Figura 16 estão representadas as sobreposições dos espectros extraídos pelo detector DAD nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos correspondentes aos flavonoides quercetina 3-O-metil-éter e strychnobiflavona. Observa-se coincidência nos máximos de absorção,

indicando a seletividade do método e, portanto, que ele não está sujeito a interferências de componentes presentes na matriz (RIBANI et al., 2004).

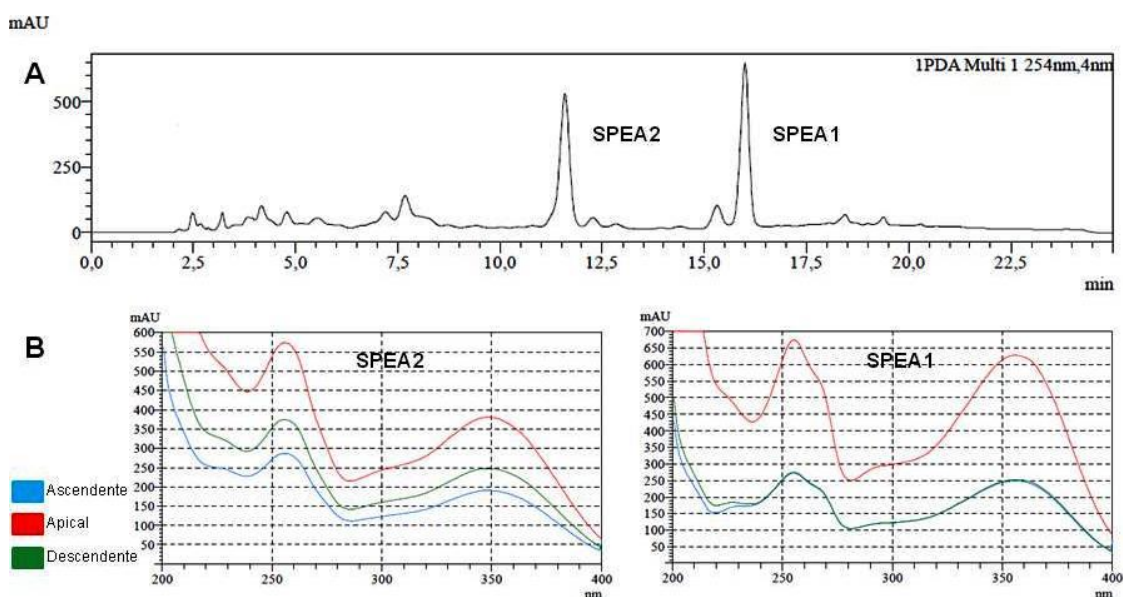


Figura 16: Cromatograma (A) obtido por HPLC-DAD. As condições cromatográficas estão descritas no item 5.3.1.

Nota: Os espectros no UV (B) foram extraídos on-line pelo detector DAD nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos correspondentes.

Para avaliar a confiabilidade da condição cromatográfica estabelecida, testes de adequabilidade do sistema foram realizados, analisando-se os parâmetros: resolução, fator de cauda, número de pratos teóricos, fator de retenção e repetibilidade da resposta dos picos, avaliada pelo DPR do tempo de retenção de seis determinações ($n = 6$), para cada pico de interesse (Tabela 19).

Tabela 19: Parâmetros de adequabilidade do sistema determinados para os picos dos analitos no extrato de *S. pseudoquina* obtido por sonicação, empregando a condição cromatográfica estabelecida.

Analitos	Parâmetros					
	R_s	T	N	k	TR	RSD % TR (n = 6)
SPEA 1	1,65	0,94	25.629	9,8	16	0,05
SPEA 2	2,03	0,84	10.831	6,82	11,59	0,08
	$R_s > 2/$					
Valores recomendados pelo FDA (FDA, 2000)	$R_s >$ 1,5	$T \leq 2$	> 2.000	$K > 2$	-	RSD $\leq 1\%$ para $n \geq 5$

Os resultados dos testes de adequabilidade do sistema estão de

acordo com as recomendações do FDA (2000). Valores de resolução menores que 2 são aceitos para testes de adequabilidade do sistema em matrizes biológicas e análise de traços (DONG et al., 2001). Em relação ao fator de retenção (k), alguns autores recomendam valores de k entre 0,5 e 20 para matrizes complexas, como extratos vegetais (SNYDER et al, 1997).

5.3.2 Linearidade

A fim de avaliar as variações de concentração dos marcadores presentes nos diferentes acessos de *S. pseudoquina* e amostras de drogas vegetais comercializadas como quina-quina ou quina, uma ampla faixa de concentração foi empregada, contemplando concentrações no intervalo de 50 a 550 μ g/mL para ambas as substâncias quercetina 3-O-metil-éter (SPEA 1) e strychnobiflavona (SPEA 2).

Duas curvas analíticas, foram obtidas em dois dias diferentes. Uma solução contendo os dois flavonoides foi preparada, em cada dia de análise, como descrito no item 4.5.5.2. Volumes de 10 μ L dessas soluções foram injetados automaticamente no sistema de HPLC, em triplicata. A Tabela 20 apresenta as concentrações injetadas de quercetina 3-O-metil-éter (SPEA 1) e strychnobiflavona (SPEA 2) e suas respectivas áreas e desvios padrão relativos, para os dois dias de análise.

Tabela 20: Concentrações, média das áreas (n = 3), e desvio padrão relativo (DPR), obtidos através das curvas analíticas, para cada analito, em dois dias distintos.

Pontos	Concentração (µg/mL)	Dia 1		Dia 2	
		Área média	DPR%	Área média	DPR%
SPEA 1					
1	50,0	1844117	0,71	1794425	0,64
2	150,0	6139663	0,29	6163125	0,12
3	250,0	10358561	0,52	10356362	0,33
4	350,0	14501465	0,20	14512542	0,51
5	450,0	18663349	0,31	18617703	0,44
6	550,0	22827135	0,44	22825796	0,24
SPEA 2					
1	50,0	1566374	0,48	1548026	0,57
2	150,0	5524188	0,65	5556379	0,12
3	250,0	9319780	0,29	9356286	0,22
4	350,0	13082647	0,14	13084623	0,19
5	450,0	16832777	0,42	16807899	0,15
6	550,0	20591683	0,54	20635223	0,25

Ambas as curvas analíticas indicaram relação linear entre a concentração injetada e a área dos picos correspondentes, sendo obtidos coeficientes de determinação (r^2) com valores superiores a 0,99. Os dados da análise de regressão linear, dos dois dias de análises, e as curvas analíticas obtidas pela média das duas curvas para SPEA1 e SPEA 2 estão apresentados na Figuras 17 e Tabela 21.

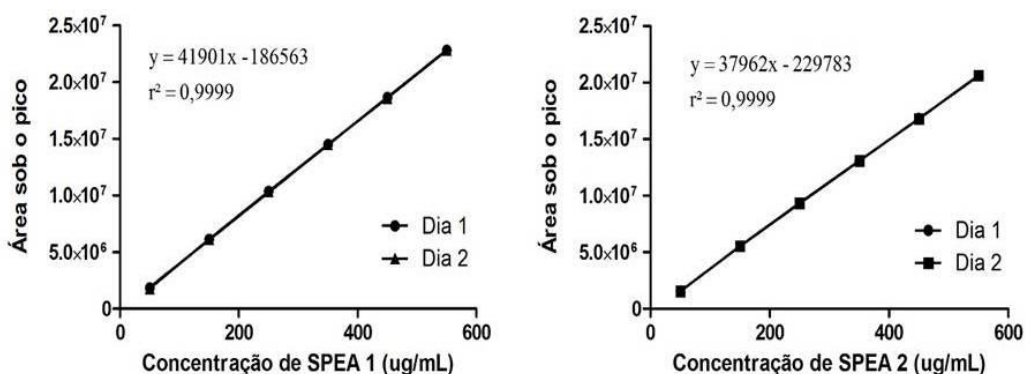


Figura 17: Curvas analíticas obtidas por HPLC-DAD, em dois dias consecutivos, para SPEA 1 e SPEA 2.

Nota: A equação da reta e o valor do coeficiente de determinação (r^2) se referem à curva média.

Tabela 21: Regressão linear para as curvas analíticas de SPEA1 e SPEA2 em dois dias distintos.

Parâmetros estatísticos	SPEA1		SPEA2	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
Faixa linear ($\mu\text{g/mL}$)	50-550		50-550	
Coefficiente de determinação (r^2)	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
DPR curva (%)	0,67	0,84	0,81	0,84
Inclinação	41894	41907	37947	37977
Erro padrão da inclinação ($\times 10^5$)	0,00092	0,00115	0,00111	0,00116
Intercepto ($\times 10^5$)	-	-193969	-231250	-228315
Erro padrão do intercepto ($\times 10^5$)	179156	0,31	0,38	0,40

As curvas obtidas nos dois dias de análise não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). Portanto, dentro das faixas de concentração propostas para os analitos, o método apresentou relação linear adequada.

5.3.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação do analito foi calculado empregando-se a equação que considera os parâmetros das curvas analíticas (desvio padrão do intercepto e a inclinação das curvas analíticas), mensurados em dois dias distintos, sendo eles $8,57 \mu\text{g/mL}$ para SPEA 1 e $10,34 \mu\text{g/mL}$ para SPEA 2 equivalentes a 311823 e 322028 respectivamente quando relacionados a área dos picos.

5.3.4 Limite de detecção

O LD foi calculado empregando-se a equação que considera os parâmetros das curvas analíticas, obtidas em dois dias distintos, sendo eles $2,83 \mu\text{g/mL}$ para SPEA 1 e $3,41 \mu\text{g/mL}$ para SPEA 2 equivalentes a 102970 e 106201 respectivamente quando relacionados a área dos picos.

5.3.5 Precisão

5.3.5.1 Precisão intradia

Seis soluções metanólicas do extrato foram preparadas conforme já

descrito no item 4.2.2. A fim de que as concentrações dos marcadores se aproximassem do ponto médio de concentração da quercetina 3-O-metil-éter e strychnobiflavona na curva analítica, 10µL foram injetados e analisados por HPLC-DAD conforme descrito no item 4.5.5.5. A partir dos teores de SPEA 1 e SPEA 2 obtidos ($n = 6$), calculou-se o desvio padrão relativo e determinou-se a precisão intradia, cujos dados são apresentados na Tabela 22. Segundo critérios da ANVISA (BRASIL, 2003), valor de DPR menor que 5,0% indica que o método desenvolvido apresenta precisão intradia adequada.

Tabela 22: Teores percentuais de SPEA 1 e SPEA 2 em *S. pseudoquina* e valores de DPR utilizados para a determinação da precisão intradia do método.

Amostra	Conc. SPEA 1 (mg/g)	Teor de SPEA 1 (%)	Conc. SPEA 2 (mg/g)	Teor de SPEA 2 (%)
1	3,02	0,30	2,75	0,27
2	3,03	0,30	2,75	0,28
3	3,04	0,30	2,76	0,28
4	3,03	0,30	2,74	0,27
5	3,02	0,30	2,74	0,27
6	3,03	0,30	2,75	0,27
Teor médio	3,03	0,30	2,75	0,27
DPR (%)	0,259		0,213	

5.3.5.2 Precisão interdia

A precisão interdia foi avaliada por meio de doze determinações dos teores dos analitos no extrato, em dois dias consecutivos, com analistas diferentes ($n = 24$). O desvio padrão relativo dos teores também foi calculado. A Tabela 23 apresenta os valores para a precisão interdia obtidos para o método em questão.

Os valores de desvio padrão relativo abaixo de 5,0% indicam que o método desenvolvido apresenta precisão interdia adequada, segundo critérios da ANVISA (BRASIL, 2003).

As médias dos teores entre os dois dias de determinações foram expressas em concentração (mg/g) na droga vegetal e comparadas pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$). Os teores não diferiram entre o primeiro e o segundo

dias de análises.

Tabela 23: Teores percentuais de SPEA 1 e SPEA 2 em *S. pseudoquina* e valores de DPR utilizados para a determinação da precisão interdias do método.

Dia	Conc. SPEA 1 (mg/g)	Teor de SPEA 1 (%)	Conc. SPEA 2 (mg/g)	Teor de SPEA 2 (%)
1	3,04	0,30	2,77	0,28
	3,03	0,30	2,77	0,28
	3,04	0,30	2,77	0,28
	3,05	0,30	2,77	0,28
	3,04	0,30	2,75	0,28
	3,05	0,30	2,76	0,28
	3,04	0,30	2,76	0,28
	3,04	0,30	2,76	0,28
	3,02	0,30	2,75	0,28
	3,04	0,30	2,77	0,28
	3,04	0,30	2,76	0,28
	3,04	0,30	2,76	0,28
2	3,05	0,30	2,71	0,27
	3,03	0,30	2,74	0,27
	3,03	0,30	2,76	0,28
	3,03	0,30	2,75	0,27
	3,03	0,30	2,75	0,27
	3,03	0,30	2,75	0,27
	3,02	0,30	2,76	0,28
	3,03	0,30	2,76	0,28
	3,03	0,30	2,75	0,27
	3,03	0,30	2,76	0,28
	3,03	0,30	2,75	0,28
	3,04	0,30	2,74	0,27
Média	3,03	0,30	2,75	0,27
DPR (%)	0,213		0,323	

5.3.6 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em testes de recuperação, a partir da fortificação do extrato com concentrações conhecidas de SPEA 1 e SPEA 2 iguais às utilizadas para a curva analítica. Na tabela 24 estão apresentados os resultados para o ensaio, em cada um dos níveis de concentração avaliados.

Tabela 24: Média (n = 3), da recuperação de SPEA 1 e SPEA 2 no extrato de *S. pseudoquina*. Os níveis fortificados são referentes ao início meio e fim da curva de calibração.

Amostras	Níveis de fortificação	A	B	C	D	Recuperação Aparente (%)	DPR (%)
SPEA 1	1	47,8	42,0	89,8	86,2	95,84	0,54
	2	350,7	71,9	422,6	419,9	99,36	0,10
	3	549,2	109,5	658,7	658,7	100,00	0,15
SPEA 2	1	47,1	42,2	89,3	83,9	94,01	0,56
	2	350,7	64,4	415,1	407,5	98,03	0,41
	3	549,6	96,7	643,3	634,2	98,22	0,68

Nota: A= Concentração experimental de marcadores adicionados ao extrato vegetal ($\mu\text{g/mL}$); B = Concentração experimental de marcadores contidos no extrato vegetal - branco da matriz - ($\mu\text{g/mL}$); C = Somatório dos marcadores contidos no extrato fortificado - A + B - ($\mu\text{g/mL}$); D = Concentração experimental dos marcadores contidos no extrato fortificado ($\mu\text{g/mL}$)

A recuperação do SPEA 1 compreendeu a faixa de 95,84 a 100,00% e para a SPEA 2 de 94,01 a 98,22%. Esses valores estão dentro da faixa de recuperação estabelecida pela AOAC (2002), considerando-se que o teor dos analitos em *S. pseudoquina* varie de 1 a 10% e, portanto, que a recuperação deve situar-se entre 92 – 105%.

5.3.8 Robustez

A avaliação da robustez do método foi realizada por análises comparativas de amostras obtidas e quantificadas nas condições cromatográficas estabelecidas e com alterações deliberadas desta, como fluxo (0,95 e 1,05mL/min), temperatura da coluna (29 e 31°C) e concentração de ácido acético na fase móvel (0,4 e 0,6%).

Os resultados obtidos no ensaio de robustez do método estão dispostos na Figura 18.

Os resultados da análise de variância e do teste de Tukey indicaram que não há diferenças estatísticas entre as médias obtidas para quantificação dos analitos nas variações avaliadas ($p > 0,05$). Esses dados indicam que o método é robusto para as pelo fato dos resultados obtidos não terem sido afetados pelas pequenas alterações introduzida na condição cromatográfica, como alterações no fluxo da fase móvel e concentração da solução tampão na fase móvel.

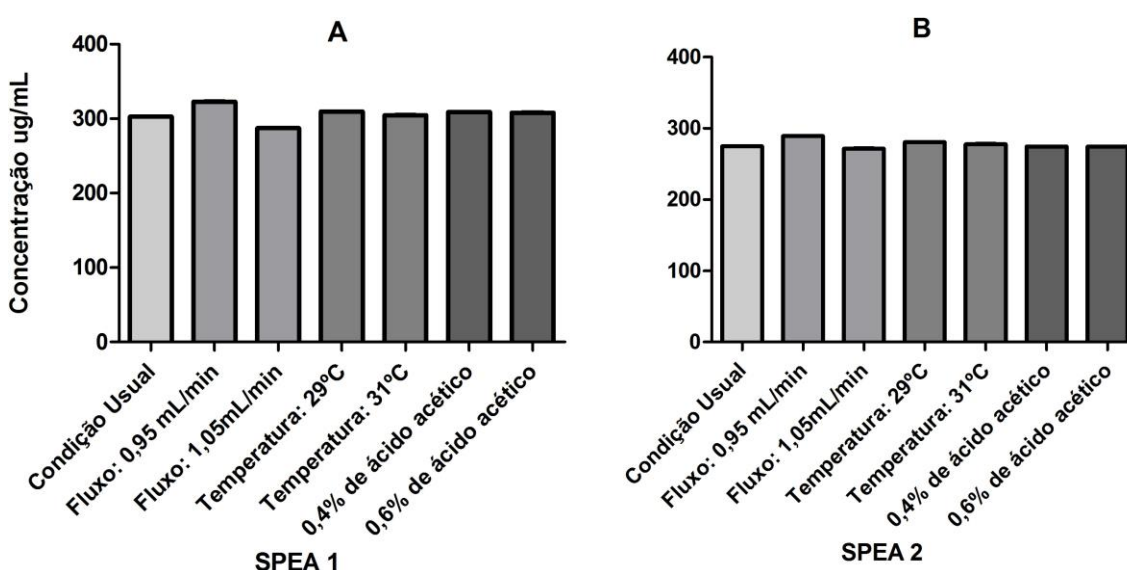


Figura 18: Influência do fluxo da fase móvel, temperatura e porcentagem de ácido acético na robustez do método cromatográfico para quantificação de A (SPEA 1) e B (SPEA 2)

Nota: As médias ($n=6$) identificadas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Turkey ($p > 0,05$).

5.4 Estabilidade da quercetina 3-O-metil-éter e strychnobiflavona em solução metanólica do extrato da entrecasca de *S. pseudoquina*

A estabilidade dos flavonoides quercetina 3-O-metil-éter e strychnobiflavona em soluções metanólicas foi avaliada à temperatura ambiente (23 ± 2 °C), em diferentes intervalos de tempo (0, 12, 24, 48, e 72 h).

As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.2.2 e 10 μ L da solução foi injetado no sistema HPLC para a análise cromatográfica. As médias dos teores obtidos em cada intervalo de tempo, para ambos os

analitos, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando submetidos à análise de variância e pós-teste de Tukey ($p > 0,05$), conforme representado na Figura 19.

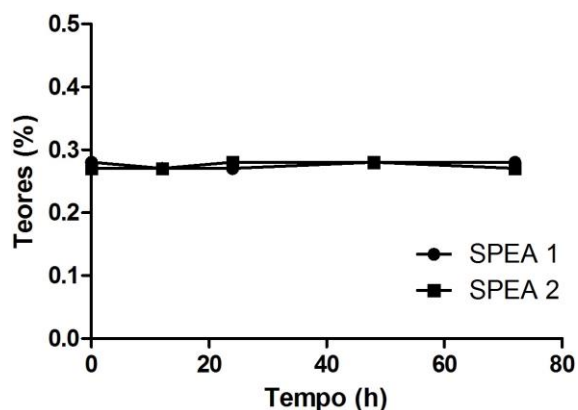


Figura 19: Teores médios de analitos em solução metanólica, mantidas à temperatura ambiente.

Nota: Os dados são expressos como teor médio de três determinações ($n = 3$). As médias dos teores de todos os analitos em cada intervalo de tempo analisado não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.5 Quantificação de flavonoides totais e dos marcadores quercetina 3-O-metil-éter e strychnobiflavona em extratos de *S. pseudoquina* de diferentes acessos e amostras comerciais

Amostras provenientes de diferentes acessos e amostras comerciais foram preparadas e analisadas utilizando o método de UV-Vis para quantificação de flavonoides totais e HPLC-DAD para a quantificação dos marcadores.

As amostras comerciais, bem como os acessos, foram preparadas conforme descrito no item 4.2.2 Os cálculos realizados para o doseamento estão detalhados no apêndice 1 para flavonoides totais, apêndice 2 para SPEA 1 e apêndice 3 para SPEA 2. As análises espectrofotométricas foram realizadas conforme descrito no item 4.5.1.1 e as análises por HPLC-DAD conforme descrito no item 4.4.3. A Tabela 25 relaciona os resultados obtidos em miligrama por grama (mg/g) da droga vegetal.

Tabela 25: Resultados obtidos para flavonoides totais e marcadores SPEA 1 e SPEA 2 para os acessos de *S. pseudoquina* e amostras comerciais de quina.

Acessos						
Amostras	Flavonoides totais (mg/g)	DPR (%)	SPEA 1 (mg/g)	DPR (%)	SPEA 2 (mg/g)	DPR (%)
A1	10,66	1,40	2,65	0,08	2,7	0,05
A2	34,02	2,29	3,66	0,54	10,79	0,19
A3	0,01	99,88	0,15	1,24	1,41	0,23
A4	0,10	10,45	0,23	0,31	0,18	0,54
Amostras comerciais						
C1	*	*	0,06	0,0	0,08	0,0
C2	0,55	0,0	0,06	0,0	0,08	0,0
C3	*	*	0,06	0,0	0,08	0,0

Nota: Cada amostra foi analisada em triplicata (n=3). A1: Acesso Jaboticatubas, A2: Acesso Uberlândia A3: Acesso Rio Verde, A4: Acesso Montes Claros, C1: Amostra comercial 1; C2: Amostra Comercial 2, C3: Amostra Comercial 3.

O acesso A2, apresentou-se com a maior média de concentração de flavonoides totais, 34,02 mg/g, e dos marcadores quercetina 3-O-metil-éter, (3,66 mg/g) e strychnobiflavona (10,79 mg/g), seguido do acesso de A1, que exibiu as concentrações de 10,66; 2,65 e 2,7 mg/g respectivamente. Os acessos A3 e A4, embora apresentem traços, não exibiram concentrações significativas para flavonoides e para os marcadores, (Figuras 20 e 21).

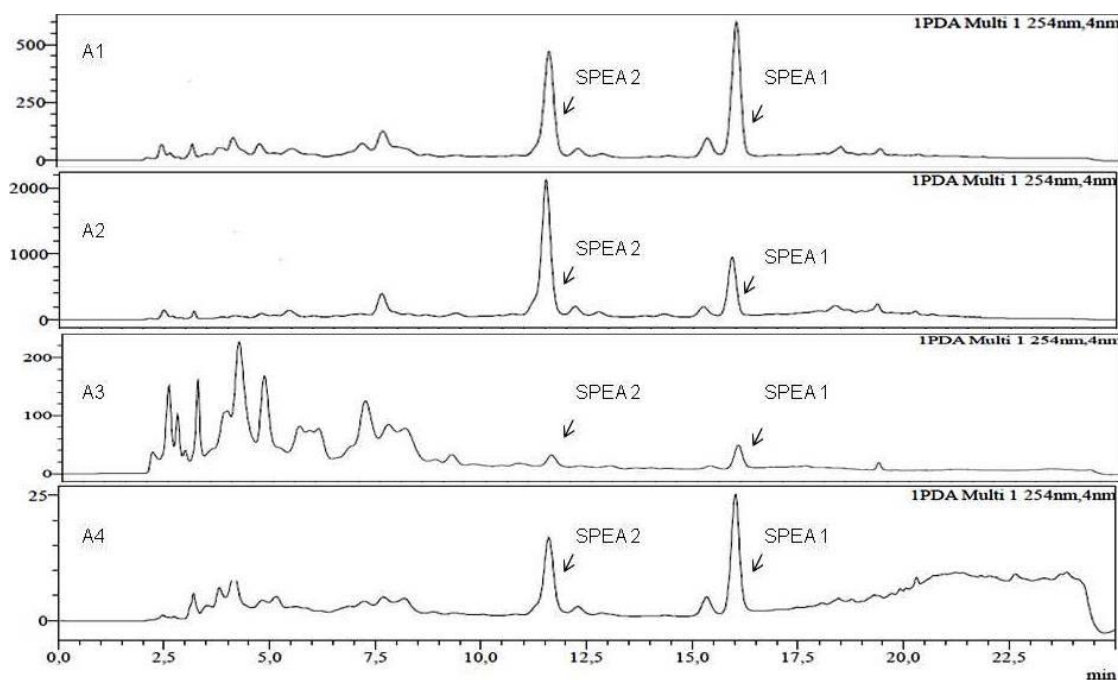


Figura 20: Perfil cromatográfico por HPLC-DAD dos acessos de *S. pseudoquina*.

Nota: A1: Acesso Jaboticatubas, A2: Acesso Uberlândia A3: Acesso Rio Verde, A4: Acesso Montes Claros.

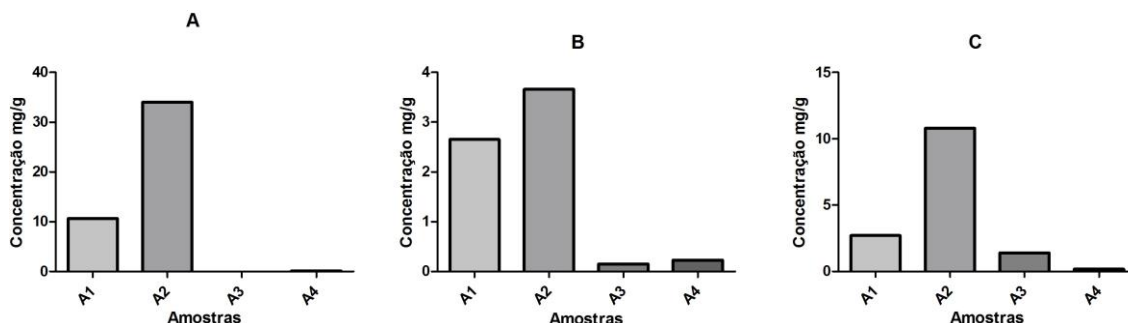


Figura 21: Concentração (mg/g) na droga vegetal de: A: flavonoides totais; B: SPEA 1 e C: SPEA 2 nos acessos de *S. pseudoquina*.

Nota: Nota: A1: Acesso Jaboticatubas, A2: Acesso Uberlândia A3: Acesso Rio Verde, A4: Acesso Montes Claros.

A Figura 21, exibe a relação existente entre as concentrações expressas em miligrama por grama da droga vegetal dos flavonoides totais obtidos por espectrofotometria e dos marcadores quercetina 3-O-metil-éter (SPEA 1) e strychnobiflavona (SPEA 2) para os acessos de *S. pseudoquina*.

Observa-se que tanto os teores de flavonoides totais quanto dos marcadores SPEA 1 e SPEA 2 também variaram bastante dentre as amostras analisadas (Figura 21). No entanto, as concentrações de SPEA 1 e SPEA 2

presentes nas amostras é considerável, quando comparados aos teores de todos os flavonoides presentes na droga vegetal, tanto para A1, quanto para A2.

Fatores externos tais como as condições ambientais, bem como o estágio de desenvolvimento e idade, podem refletir na composição química das plantas e conseqüentemente na síntese de metabólitos secundários (GABBO-NETO & LOPES, 2007).

Alguns estudos relatando as variações na constituição química de plantas medicinais já foram realizados. Yariwake et al. (2005) retratou a variabilidade sazonal de triterpenos, flavonoides e polifenóis em folhas de *Maytenus aquifolium*, já Santos et al. (1998), a variação do teor de flavonoides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta*. O controle de qualidade e a padronização da matéria-prima vegetal utilizada para a produção de fitoterápicos representa um importante papel para obtenção de produtos com de composição constante e propriedades terapêuticas reprodutíveis (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Aprimorar e investir em estudos de domesticação, produção biotecnológica através da cultura de tecido vegetal e melhoramentos genéticos de plantas medicinais, em substituição ao uso de plantas selvagens coletadas diretamente no campo, tende a levar à obtenção de matérias-primas uniformes e de alta qualidade, preservando ainda a diversidade vegetal e garantindo o uso sustentável das mesmas (XAVIER, 2015).

As amostras comerciais de quina, além de não possuírem concentrações significativas para flavonoides, não apresentaram os picos referentes aos marcadores quando analisadas por HPLC-DAD (Figura 22).

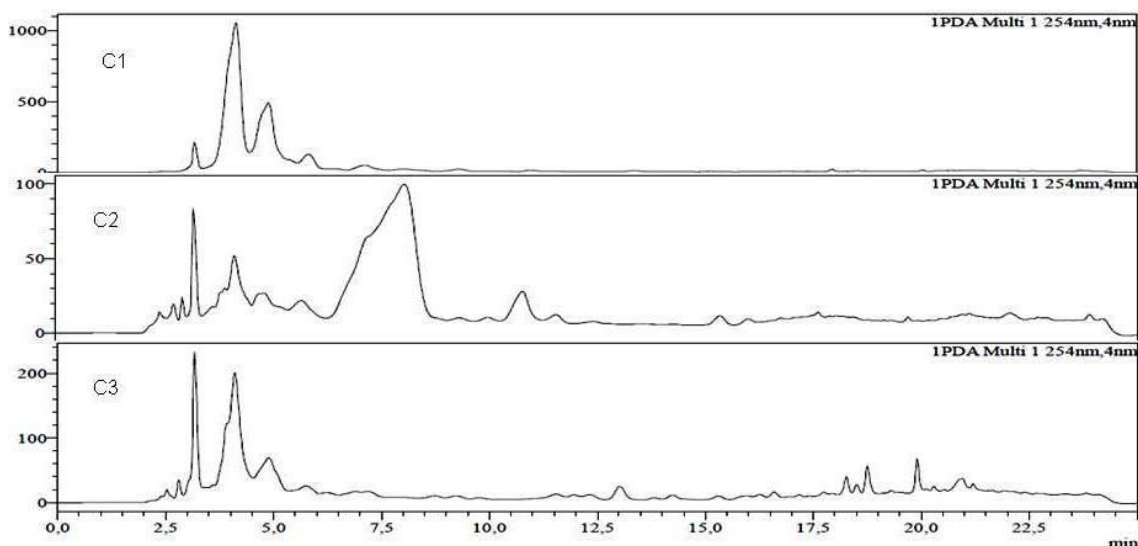


Figura 22: Perfil cromatográfico por HPLC-DAD das amostras comerciais.
 Nota: C1: Amostra comercial 1; C2: Amostra Comercial 2, C3: Amostra Comercial 3.

De modo geral, foi observado uma má qualidade das drogas vegetais comercializadas, apresentando no rótulo apenas o nome popular da espécie. Os constituintes químicos SPEA1 e SPEA2, presente na *S. pseudoquina*, não foram detectados nas amostras.

A falta de padronização e qualidade das drogas vegetais brasileiras, especialmente daquelas comercializadas por raizeiros, mercados e ervanários, comprometem a importância que as plantas medicinais possam representar na saúde pública brasileira, e confirmam a necessidade urgente da padronização e controle de qualidade das mesmas (BRANDÃO et al., 1998).

Embora se tenha parâmetros específicos para a produção e comércio de fitoterápicos, a fraude e a má qualidade têm preocupado profissionais da área de saúde, e a comunidade científica. A ausência de qualidade, a adulteração e a incorreta utilização, interferem na eficácia e até mesmo na segurança do produto, somando-se a isto um serviço de fiscalização não muito eficiente (MELO et al., 2004)

5.6 Atividade tripanocida

Os resultados dos testes *in vitro* contra formas epimastigotas do *T. cruzi* para os extratos EH, EAE, EEt e EAq e para os flavonoides SPEA 1 e SPEA 2 foram avaliados pela inibição do crescimento dos parasitos em

cultura, após 24, 48 e 72 horas (Figura 23).

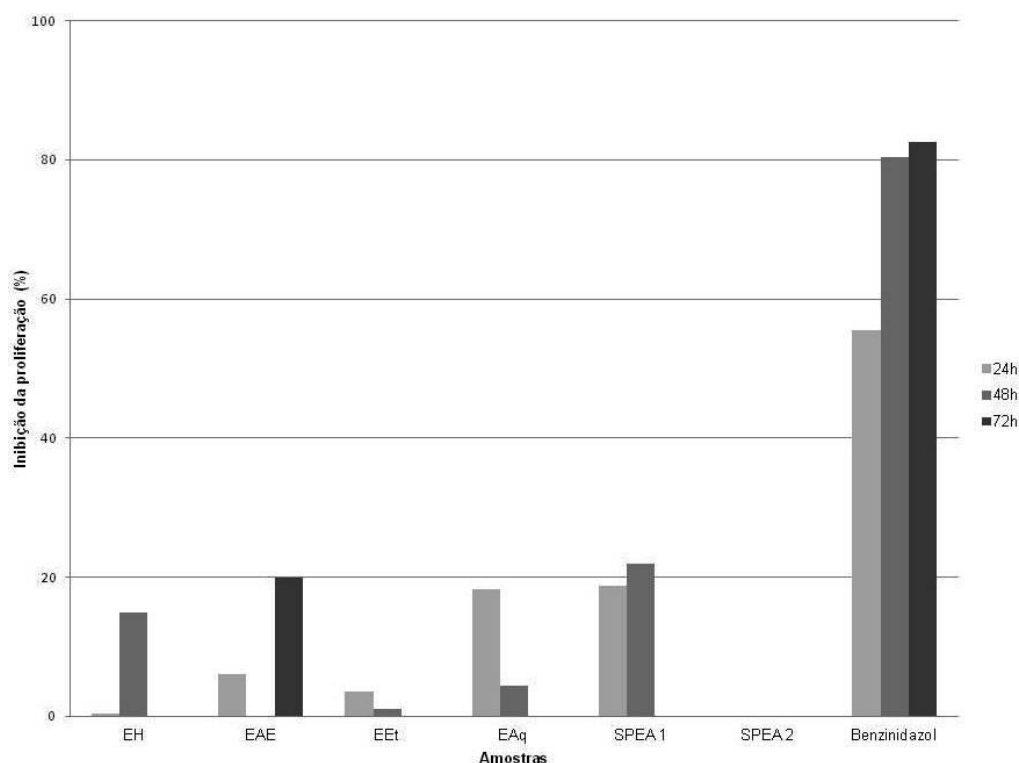


Figura 23: Ensaio de viabilidade de epimastigotas.

Nota: Foram semeados 5×10^6 epimastigotas por poço. Logo após, $100 \mu\text{g/mL}$ dos extratos e $100 \mu\text{M}$ de SPEA 1 e SPEA 2 foram adicionados aos poços contendo os epimastigotas. As placas foram incubadas em estufa BOD, a 28°C , por 24 h, 48 e 72 horas. Após esse período foram adicionados $20 \mu\text{L}$ de resazurina 1mM/poço e após 2, 3 ou 4 horas foi realizada a leitura da reação a 570nm e 600nm . Foram adicionados, a cada placa, controles negativos (meio) e (meio + amostras), controles positivos (meio + parasitos) e (meio + DMSO + parasitos). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com no mínimo 3 repetições. A porcentagem de inibição da proliferação foi calculada conforme descrito em material e métodos.

Como pode ser observado na figura 23, os extratos testados, bem como os flavonoides SPEA 1 e SPEA 2, apresentaram baixa atividade quando comparados ao controle positivo, benzonidazol. Dentre os extratos testados, EAE demonstrou uma maior eficiência de inibição da proliferação, chegando à 24% do potencial do fármaco de referência no tempo de 72 horas. Já o SPEA 1 apresentou melhores resultados no tempo de 24h representando 34% da capacidade inibitória do benzonidazol neste mesmo período de tempo.

Baseando-se nos estudos realizados por Lage et al. (2013), que testou o potencial leishmanicida para a *S. pseudoquina*, presumia-se que o EAE apresentasse os melhores resultados quando comparado aos demais

extratos, o mesmo também era almejado para o SPEA 1 e 2. No entanto, particularidades na constituição estrutural, bem como nas funções bioquímicas do protozoário pode justificar o ocorrido (DIAS et al, 2009).

Segundo Faria et al., (2007), diversos metabólitos secundários de origem natural de diferentes classes, como quinonas, flavonoides e terpenos mostraram-se ativas contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Ainda segundo o autor, o flavonoide mais ativo foi a quercetina-3-metil éter. Em trabalho realizado por Marin et al. (2011), foi avaliado o potencial tripanocida contra forma epimastigota de 9 flavonoides e entre eles 3 apresentaram resultados satisfatórios.

Muitos estudos objetivando detectar metabólitos secundários provenientes de plantas com atividade tripanocida, utilizam a forma extracelular epimastigota de *T. cruzi* para facilitar a manutenção sob as condições *in vitro* do experimento. No entanto, uma vez que as formas extracelulares não são a forma desenvolvida do parasita no hospedeiro vertebrado, avaliações preliminares precisam ser complementadas através de formas intracelulares (amastigotas em células hospedeiras), e por tripomastigotas (MARIN et al., 2011). Outros estudos serão realizados para avaliar a atividade da quercetina 3-O-metil-éter e da strychnobiflavona bem como dos demais extratos em diferentes formas e cepas do *T. cruzi*.

Devido à alta complexidade dos metabólitos secundários que compõem os vegetais e conseqüentemente os extratos obtidos através deles, os mesmos podem apresentar atividade ou não em estudos *in vitro*, sendo passíveis de testes para avaliar o potencial sinérgico existente (XAVIER, 2015). Assim sendo, sugere-se que a ação combinada de diferentes compostos, estruturalmente distintos, presentes em baixas concentrações possam apresentar melhores resultados tripanocida.

Embora os extratos e os flavonoides SPEA 1 e SPEA 2 não tenham afetado os parasitos de forma relevante, os mesmos foram testados nas células Vero (Figura 24), uma avaliação da citotoxicidade foi realizada a fim de determinar se a atividade *in vitro* das amostras testadas foi devido ao seu potencial citotóxico geral, ou se é seletiva para o parasito, (MARIN, 2011) dando respaldo para avaliações posteriores em ensaios de infecção, para as formas amastigotas e tripomastigotas, tal perspectiva se baseia nas

diferenças que as formas do *trypanosoma cruzi* apresentam, por exemplo, quanto às proteínas de superfície, na infecção das células (DOSREIS, 2011).

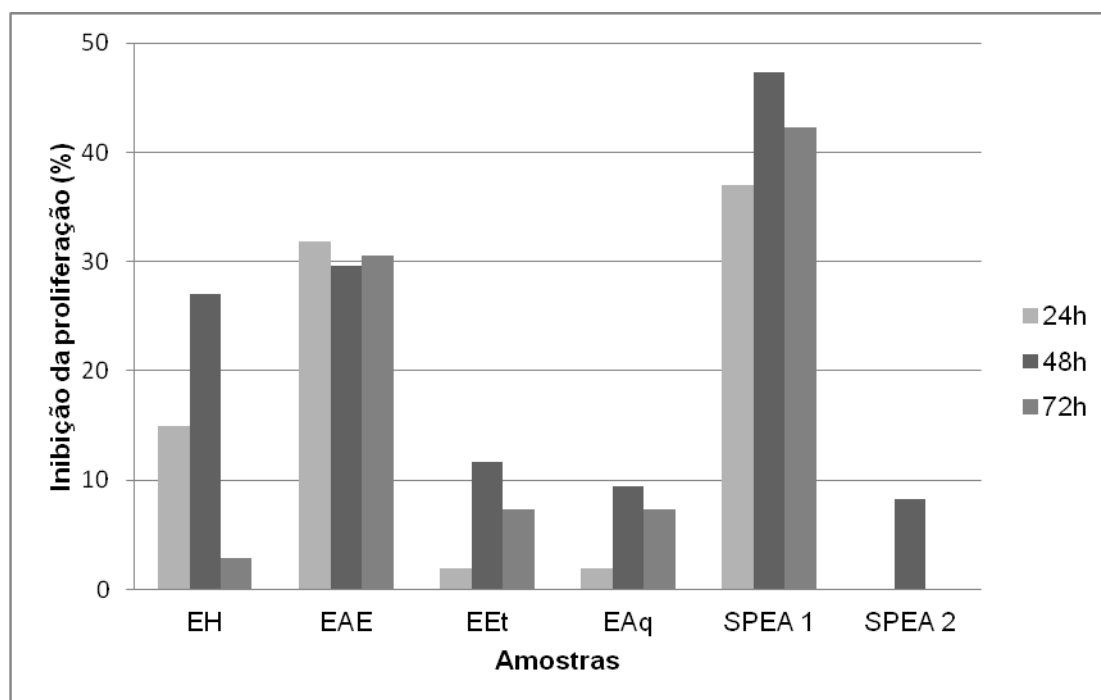


Figura 24: Ensaio de citotoxicidade em células Vero.

Nota: Foram semeadas $2,5 \times 10^4$ células por poço. Logo após, $100 \mu\text{g/mL}$ dos extratos e $100 \mu\text{M}$ do SPEA E e SPEA 2 foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas em estufa BOD, a 37°C , $5\% \text{CO}_2$ por 24 h, 48 h e 72 horas. Após esse período foram adicionados $20 \mu\text{L}$ de resazurina 1mM/poço e após 2 horas foi realizada a leitura da reação a 570nm e 600nm . Foram adicionados, a cada placa, controles negativos (meio) e (meio + amostra), controles positivos (meio + parasitos) e (meio + DMSO + parasitos). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com no mínimo 3 repetições. A porcentagem de inibição da proliferação foi calculada conforme descrito em material e métodos.

Conforme ilustra a figura 24, o EAE e o SPEA 1, que demonstraram melhores performances contra os epimastigotas, também apresentaram ação citotóxica, no entanto, os mesmos foram testados em uma concentração de $100\mu\text{g/mL}$ para o extrato e $100 \mu\text{M}$ para o SPEA1, dados da literatura sugerem que o parâmetro quantitativo de potência inibitória (IC_{50}) para cultura de células Vero tratadas com Benzonidazol por 72horas seja de $15,8 \mu\text{M}$, indicando que o potencial citotóxico das amostras podem estar relacionadas às altas concentrações testadas (MARIN et al, 2011).

No entanto, segundo MOURA, 2014, o efeito citotóxico parece ser revertido, após 72 horas, enquanto que o possível efeito tripanocida pode ser mantido.

Dentre as exigências estabelecidas pela OMS para candidatos promissores a fármacos tripanocidas estão alta potência (baixa dosagem e efeito satisfatório) e seletividade contra as formas mamíferas do *T. cruzi*. Para atingir estes objetivos, é necessário passar por diferentes etapas da pesquisa, abrangendo desde a identificação de moléculas bioativas até a otimização e desenvolvimento de novas identidades químicas (NCEs – *New Chemical Entities*) (DIAS et al, 2009).

Somado a isso, um dos obstáculos encontrados pelos pesquisadores na área de doença de Chagas está na falta de padronização de protocolos experimentais e de cepas do *T. cruzi* para avaliação de substâncias com atividade tripanocida. Estima-se que há catalogadas mais de 35 cepas do *T. cruzi*, as quais apresentam perfis de resistência e susceptibilidade distintos aos fármacos padrões Nifurtimox e Benzonidazol. Um número também considerável de protocolos pode ser encontrado na literatura, apresentando variações significativas. Esses fatores fazem com que as análises de diferentes resultados e experimentos sejam muito difíceis, levando geralmente a informações de pouca importância prática para o desenvolvimento de um novo candidato a fármaco (DIAS et al, 2009).

6. CONCLUSÕES

1) Dois flavonoides foram isolados do extrato em acetato de etila das entrecascas de *S. pseudoquina*, sendo identificados como quercetina 3-O-metil-éter e strychnobiflavona. Este flavonoides já haviam sido isolados anteriormente por Lage et al. (2013) e mostrado atividade leishmanicida.

2) O método para quantificação de flavonoides totais em extratos de *S. pseudoquina* por espectrofotometria no UV-Vis foi validado e atendeu todos os parâmetros de validação (linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez) preconizados pela legislação vigente.

- 3) Foi desenvolvido e validado método analítico por HPLC-DAD para quantificação concomitante de quercetina 3-O-metil-éter e strychnobiflavona na droga vegetal de *S. pseudoquina*. O método demonstrou linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez adequadas, conforme preconizado pela legislação vigente.
- 4) Drogas vegetais provenientes de quatro diferentes acessos de *S. pseudoquina* apresentaram diferenças significativas nos teores dos marcadores flavonoídicos SPEA1 e SPEA2, indicando a necessidade de realizar a domesticação dessa espécie, visando a produção de fitoterápicos.
- 5) A composição química quantitativa em *S. pseudoquina*, preparados com drogas vegetais provenientes de acessos distintos apresentou diferença significativa nos teores dos marcadores químicos. SPEA 2 foi o constituinte majoritário no acesso de Uberlândia, enquanto o SPEA 1 apresentou maiores concentrações no demais acessos.
- 6) Amostras comerciais de *S. pseudoquina* analisadas mostraram diferenças na impressão digital e nos teores de flavonoides entre si, indicando não se tratarem da espécie *S. pseudoquina*. Ficou evidente, que as três amostras comercializadas como quina tratam-se de espécies diferentes, o que representa um risco para o consumidor, uma vez que não se sabe a segurança e a eficácia dessas drogas vegetais.
- 7) Apesar da espécie *S. pseudoquina* apresentar ação leishmanicida, esta droga vegetal não apresentou potencial tripanocida contra formas epimastigota de *T. cruzi*.
- 8) As amostras testadas apresentaram citotoxicidade frente às células Vero.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA: CPAC. p. 464, 1998.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2002. Disponível em : <http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf> Acesso em: 02/07/2015

BARROS, C. B. Validação de Métodos Analíticos. *Biológico*, v. 64, p. 175-177, 2002.

BEHLING, E., B. . Flavonóide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. *Alim. Nutr*, v. 15, n. 3, p. 9, 2004.

BETZ, J. M., BROWN, P. N., ROMAN, M. C. Accuracy, precision, and reliability of chemical measurements in natural products research. *Fitoterapia*. v. 82, n. 1, p. 44-52, 2011.

BONNEY, K. M.; AYLOR, J. M.; DANIELS, M. D.; EPTING, C. L.; ENGMAN, D. M.. HEAT-KILLED *Trypanosoma cruzi* induces acute cardiac damage and polyantigenic autoimmunity. *PLoS One*. v. 6, n. 1, 2011.

BOUTALED-CHARKI, S. et al. Activity and Mode of Action of Flavonoids Compounds Against Intracellular and Extracellular Forms of *Trypanosoma cruzi*. *The Open Natural Products Journal*, v. 4, p. 1-7, 2011.

BRANDÃO, Maria G. Lins; FREIRE, Noélia; VIANNA-SOARES, Cristina D. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais. Verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila Surveillance of phytotherapeutic drugs in the State of Minas Gerais. Quality assessment of commercial. *Cad. Saúde Pública*, v. 14, n. 3, p. 613-616, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29.05.03. Determina a Publicação do “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. *Diário Oficial da União*, 02.06.03.

BRASIL. RDC nº 26 de 13.05.14. Determina a Publicação do “O Registro de Medicamentos Fitoterápicos e o Registro e a Notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos.”. *Diário Oficial da União*, 09.05.14.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm>. Acessado em: 22 de outubro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+fitoterapicos>>. Acessado em 02 de novembro de 2014.

BRASIL. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Departamento de Assistência Farmacêutica da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde (DAF/SCTIE/MS). Fev. 2009. Disponível em <http://189.28.128.100/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>. Acessado em 02 de novembro de 2014.

BRASIL. A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. 2006

BRASIL. Presidência da República. Decreto 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. 2006.

BRUCE, B.; MINKKINEM, P.;RIEKKOLA, M. L. Pratical methos validation: validation sifficient for na analysis method. *Mikrochim. Acta*. V. 128, p. 93-106, 1998.

BUCKNER, F. S.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. *Curr Opin Infect Dis*. v. 23, n. 6, p. 609-616, 2010.

CARVALHO, A. C. B. Plantas medicinais e fitoterápicos: regulamentação sanitária e proposta de modelo de monografia para espécies vegetais oficializadas no Brasil. Brasília: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. 318p., 2011.

CARVALHO, A. C. B; SANTOS, L. A.; SILVEIRA, D. La regulaci3n de l3s medicamentos berbarios em Brasil. *Boletim Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. v. 8, n. 1, p. 7-11, 2008.

CAZAROLLI, Luisa H. et al. Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini reviews in medicinal chemistry*, v. 8, n. 13, p. 1429-1440, 2008.

CLAYTON J. Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature*: S12-S15, 2010.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 104, n.1, p. 31- 40, 2009.

COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 104, n. 4, p. 549-54, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1830, n. 6, p. 3670-95, 2013.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THEIEMANN, O. H.; OLIVEIRA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos f3rmacos. *Química Nova*. v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DIAS, J. C. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusion Chagas disease: historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 102, p. 11-18, 2007.

DIAS, J. C. The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). *Ann Intern Med* 144:772-774, 2006.

DONG, M.; PAUL, R.; GERSHANOV, L. Getting the peaks perfect: System Suitability for HPLC. *Today's chemist at work [on-line]*, v.10, n.9, p.38-40, 2001.

Disponível em: <http://pubs.acs.org/subscribe/journals/tcaw/10/i09/html/09dong.html>. Acesso em: 15/05/2015

DOSREIS, G. A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. *Braz J Med Biol Res*, v. 44, n. 2, p. 84-90, 2011.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC, 1998. 61p.

FAGUNDES, E. M. de S., et al. Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas como Fontes Inovadoras para o Tratamento de Doenças Negligenciadas. *Gerai: Revista de Saúde Pública do SUS/MG-1ª ed.*, v. 1, n. 1, 2013.

FARIA, Angélica R. et al. Natural compounds with anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 3, p. 455-465, 2007.

FEBRAFAR. Sem patente, medicamentos fitoterápico não atrai as multinacionais. *Federação Brasileira das Redes Associativas de Farmácias*; 2010 [acesso em 04 nov. 2014]. Disponível em: <http://www.febrifar.com.br/index.php?cat_id=5&pag_id=7042>.

FELFILI, J. M.; FAGG, C. W.; SILVA, J.C.S. da; OLIVEIRA, E.C.L. de; PINTO, J.R.R.; SILVA JÚNIOR, M.C. da; RAMOS, K.M.O. Plantas da APA Gama e Cabeça de Veado: espécies, ecossistemas e recuperação. Brasília: Universidade de Brasília, Departamento de Engenharia Florestal, 52p, 2002.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 81, n. 5, p. 755-9, 1987.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for industry: analytical procedures and methods validation. 2000. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122858.pdf>> Acesso em: 29/05/2015.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

GARCIA E. F. Quantificação de marcadores químicos e avaliação da

atividade anti-inflamatória de *Echinodorus grandiflorus* (cham & schltl) *Micheli* (chapéu-de-couro). Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 260p, 2011.

GUTIERREZ, F. R, GUEDES, P. M, GAZZINELLI, R. T, SILVA J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* n. 31, v. 11, p. 673- 685, 2009.

GRANDI, T.S.M.; TRINDADE, J.A. da; PINTO, M.J.F.; FERREIRA, L.L.; CATELLA, A.C. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. *Acta Botânica Brasílica*, v.10, n.2, p.3329-376. 1996.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. Brasil, 2010.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro. p.25, 2007.

IUFRO. International Union of forest Research Organizations; 2015 [acesso em 15 mai. 2015]. Disponível em:< <http://www.iufro.org/science/gfep/forests-and-food-security-panel/report/>>.

JANNIN, J.; VILLA L. An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102:95-97, 2007.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um Mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.* N. 30, v. 3, p.241-248. 2011

KNAPP, L. Fitoterapia abre novos campos de pesquisa. *Gazeta Mercantil*, São Paulo, 18 set. Caderno 1, p. 6; 2001.

KREFT, S.; STRUKELJ, B.; GABERSCIK, A.; KREFT, I. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *Journal of Experimental Botany*, v.53, p.1801-1804, 2002.

LAGE, P. S. et al. *Strychnos pseudoquina* and Its Purified Compounds Present an Effective *In Vitro* Antileishmanial Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, p. 1-9, 2013

LAMAISON, J.L.C., CARNET, A. Teneurs em principaux flavonoides des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D.C) em fonction de La vegetation. *Pharmaceut Acta Helve* 65: 315-320, 1990.

LEITE, J.P.V. Estudo fitoquímico de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. *Ex Reiss* e variação sazonal e intra-específica de polifenóis em populações nativas. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, 299p, 2002.

LEITE, J.P.V, Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Editora Atheneu. 2009. 328p. In: Borella, J.C. et al. Influência do processo extrativo nas propriedades físico-químicas dos extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Revista Eletrônica de Farmácia*, Vol. IX (2), 25 – 36, 2012.

LOPES, A. S. Estudo fitoquímico de extratos de cascas de *Strychnos pseudoquina* a. St. -Hil. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 76p. 2012. (Monografia, Graduação em Bioquímica).

LORENZI, H. Árvores brasileiras - Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, SP, Editora Plantarum, Vol. II, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Plantarum, 512p, 2002.

LUENGAS-CAICEDO, P.E. Contribuição para a padronização de extratos de folhas de *Cecropia glaziovii* Snethl.: estudos de variação sazonal e intra-específica de flavonoides e proantocianidinas, de metodologias de extração e de atividade vasorelaxante. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2005. 259p.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Revista Química Nova*, São Paulo, v. 25, n.3, p. 429-438, 2002.

MAIA-FILHO, A. L. M et al. Efeito do gel da babosa (*Aloe barbadensis* Mill) associado ao ultrassom em processo inflamatório agudo. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, Botucatu, v.13, n.2, p. 146-150, 2011.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. Uso do Cloreto de Alumínio na Quantificação de Flavonoides em Amostras de Própolis. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm>. Acesso em 11/12/2013.

MARÍN, Clotilde et al. In vitro and in vivo trypanocidal activity of flavonoids from *Delphinium staphisagria* against Chagas disease. *Journal of natural products*, v. 74, n. 4, p. 744-750, 2011.

MARTINS, E.R. et al. *Planta Mediciniais*. UFV-imprensa Universitária. p. 220, 1998.

MATOS, A. T. S. Detecção *in silico* dos constituintes majoritários de *Strychnos brasiliensis* e *S. pseudoquina* (Loganaceae) usando CLAE-DAD/EMAR. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, p. 91, 2009. (Dissertação, Mestrado em Química).

MELO, JG de et al. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia* spp.) e ginko (*Ginkgo biloba* L.). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 14, n. 2, p. 111-120, 2004.

MOURA, C. M. Estudo biológico e bioquímico das ntpdases de *trypanosoma cruzi* e *leishmania infantum chagasi* e busca por novos compostos para o tratamento da doença de chagas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 140p. 2014. (Tese, Doutorado em Biologia Celular e Estrutural).

NAKAJIMA-SHIMADA, J.; HIROTA, Y.; AUKI, T. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, .v. 40, p. 2455-2458, 1996.

NICOLETTI, M.; GOULART, M. O. F.; LIMA, R. A.; GOULART, A. E.; MONACHE, F. D. ; BETTOLO, G. B. M. Flavonoids and alkaloids from *Strychnos pseudoquina*. *Journal of Natural Products*, v. 20, n. 6, p. 953-957, 1984.

NWAKA, S., HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat Rev Drug Discov.* v. 5, n. 11, p. 941-955, 2006.

OSUNA, A.; ADROHER, F.J.; LUPIAÑEZ, J.A. Influence of electrolytes and non-electrolytes on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Differ. Dev.*, v. 30, p. 89-95, 1990.

PARKER, E.R; SETHI A. Chagas Disease: Coming to a Place Near You. *Dermatol Clin.* v. 29, p. 53–62, 2011.

PATWARDHAN, B.; VAIDYA, A. D. B.; CHORGHADE, M. Ayurveda and natural products drug discovery. *Current Science*, v. 86, n. 6; 2004.

PECKOLT, W. Contribuição ao estudo das falsas quinas medicinais da América do Sul.. 255f. Dissertação (Mestrado em História Natural Médica) – Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1916.

PINTO DIAS, J. C. The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). *Ann Intern Med.* v. 144, n. 10, p. 772-774, 2006.

RASSI, A. Jr; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. *Lancet.* v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos *Química Nova*, v.27, p.771-780, 2004.

RICHARD, J. V.; WERBOVETZ, K. A. New Antileishmanial Candidates and Lead Compounds. *Opin Chem Biol.* v.14, n. 4, p.447-455, 2010.

RODRIGUES, V.E.G. Levantamento florístico e etnobotânico de plantas medicinais dos cerrados na região do alto Rio Grande. Minas Gerais. 1998.

RODRIGUES COURA, J.; de CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 97, n.1, p. 3-24, 2002.

RUSAK, G.; KUSTRAK, D.; MALES, Z.; PLESE, N. The determination of the content of the polyphenols in aerial parts of species *Centaurea rupestris* L. and *C. fritschii* Hayek (Asteraceae). *Acta Pharmaceutica*, v.43, p.121-125, 1993.

SANTOS, M. D.; BLATT, C. T. T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. *Brazilian Journal of Botany*, v. 21, n. 2, p. 135-140, 1998.

SILVA, L.H., NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* v 20, p. 191–207, 1953.

SILVA, M. A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; SANNOMIYA, M; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W.. Evaluation of *Strychnos pseudoquina* St. Hil. leaves extracts on gastrointestinal activity in mice. *Chemical Pharmaceutical Buletinil.* v. 53, n. 8, p. 881-885, 2005.

SIQUEIRA, J. C. de. Utilização popular das plantas do cerrado. Loyola, São Paulo, p. 60, 1981.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Practical HPLC Method Development. A Wiley-Interscience Publication. v. 2, p. 765, 1997.

SOEIRO M. N, DANTAS, A. P.; DALIRY, A.; SILVA, C. F.; BATISTA, D.G.; de SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, G. M.; SALOMÃO, K.; BATISTA, M. M.; PACHECO, M. G; SILVA, P. B.; SANTA-RITA, R. M.; BARRETO, R. F., BOYKIN, D. W.; CASTRO S. L. Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from *in vivo* and *in vitro* studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 104, p. 301-310, 2009.

SOEIRO, M. N.; DE CASTRO, S. L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets.* v. 13, n.1, p.105-121, 2009.

SOUZA, S. V.C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. p.297, 2007.

THE UNITED States pharmacopeia: USP29-NF24. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, Chromatography, p. 2644-2649, 2009.

VIEIRA, B. C. Análises fitoquímica, bromatológica, toxicológica e dos efeitos estimulante físico e antioxidante de extratos de folhas de *Psychotria vellosiana* Benth. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. (Dissertação, Mestrado em Bioquímica Agrícola). 95p. 2010.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no cerrado. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, Brasília, DF. Biodiversidade e produção sustentável de alimento e fibras nos cerrados. Anais. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, p.169-171, 1996.

VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v.3, n.1, p.13-36, 2000.

VILLA, L.; MOROTE, S.; BERNAL, O.; BULLA, D.; ALBAJAR-VINAS, P. Access to diagnosis and treatment of Chagas disease/infection in endemic and non-endemic countries in the XXI century. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 102, p. 87-94, 2007.

WHO. Control of Chagas disease. World Health Organ. *Tech. Rep. Ser.* 905, i-109, 2002.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> Acesso em: 02/07/2015.

XAVIER, A. A. Prospecção fitoquímica, avaliação (*in vitro*) de atividades cicatrizante e antibacteriana e desenvolvimento de método bioanalítico para extratos de *strychnos pseudoquina* A.St.-Hil. (Loganiaceae). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. (Dissertação, Mestrado em Bioquímica Agrícola). 119p. 2015.

YARIWAKE, Janete H. et al. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart.(Celastraceae). *Rev Bras Farmacognosia*, v. 15, p. 162-168, 2005.

APÊNDICE 1

Cálculo da porcentagem de flavonoides totais, expressos em Rutina, quantificados por espectrofotometria no ultravioleta visível em *S. pseudoquina*.

- Equação da reta

$$A = 0,0165 \times [R] + 0,0449 \quad (a)$$

Onde: [R] = Concentração de Rutina em $\mu\text{g/mL}$

A = Absorvância da amostra a 420 nm

- Quantidade de rutina em mg/g da droga vegetal

$$[R] \text{ mg/g} = (a \times S_L) \times S_E / A_L / 10000 / 2,0$$

Onde: [R] mg/g = concentração de rutina em mg por grama da droga vegetal

a = resultado obtido pela resolução da equação da reta em $\mu\text{g/mL}$

S_L = volume do balão utilizado para a solução de leitura

S_E = volume do balão utilizado para ressuspender o extrato (Solução estoque)

A_L = alíquota retirada da S_E .

- Quantidade de rutina em porcentagem

$$R\% = ([R] \text{ mg/g} \times 100) / 10000$$

Onde: R% = teor de rutina em porcentagem

[R] mg/g = concentração de rutina em mg por grama da droga vegetal

APÊNDICE 2

Cálculo da porcentagem de SPEA 1, quantificado por HPLC-DAD em *S. pseudoquina*.

- Equação da reta SPEA 1

$$A = 41901 \times [\text{SPEA 1}] + 186563 \quad (a)$$

Onde: [R] = Concentração de SPEA 1 em µg/mL

A = Área da amostra

- Quantidade de SPEA 1 em mg/g da droga vegetal

$$[\text{SPEA 1}] \text{ mg/g} = (a \times S_E) / 2 / 1000$$

Onde: [SPEA 1] mg/g = concentração de SPEA 1 em mg por grama da droga vegetal

a = resultado obtido pela resolução da equação da reta em µg/mL

S_E = volume do balão utilizado para ressuspender o extrato (Solução estoque)

- Quantidade de SPEA 1 em porcentagem

$$\text{SPEA 1\%} = ([\text{SPEA 1}] \text{ mg/g} \times 100) / 10000$$

Onde: SPEA 1% = teor de SPEA em porcentagem

[SPEA 1] mg/g = concentração de SPEA 1 em mg por grama da droga vegetal

APÊNDICE 3

Cálculo da porcentagem de SPEA 2, quantificado por HPLC-DAD

- Equação da reta SPEA 1

$$A = 37962 \times [\text{SPEA 1}] + 229783 \quad (a)$$

Onde: [R] = Concentração de SPEA 2 em $\mu\text{g/mL}$

A = Área da amostra

- Quantidade de SPEA 2 em mg/g da droga vegetal

$$[\text{SPEA 2}] \text{ mg/g} = (a \times S_E) / 2 / 1000$$

Onde: [SPEA 2] mg/g = concentração de SPEA 2 em mg por grama da droga vegetal

a = resultado obtido pela resolução da equação da reta em $\mu\text{g/mL}$

S_E = volume do balão utilizado para ressuspender o extrato (Solução estoque)

- Quantidade de SPEA 2 em porcentagem

$$\text{SPEA 1\%} = ([\text{SPEA 2}] \text{ mg/g} \times 100) / 10000$$

Onde: SPEA 2% = teor de SPEA em porcentagem

[SPEA 2] mg/g = concentração de SPEA 2 em mg por grama da droga vegetal