

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA

CINCHONAÍNAS – MÉTODO CROMATOGRÁFICO E
PRODUÇÃO DE PADRÕES PARA CONTROLE DE
QUALIDADE DE EXTRATOS POLARES DE CATUABA
(*Trichilia catigua* Adr. Juss)

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Araraquara

2010

FERNANDA RODRIGUES MARTINELLI

CINCHONAÍNAS – MÉTODO CROMATOGRÁFICO E
PRODUÇÃO DE PADRÕES PARA CONTROLE DE
QUALIDADE DE EXTRATOS POLARES DE CATUABA
(*Trichilia catigua* Adr. Juss)

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos necessários para
obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Araraquara

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

M385c Martinelli, Fernanda Rodrigues
Cinchonaínas - Método Cromatográfico e produção de
padrões para controle de qualidade de extratos polares de
catuaba (*Trichilia catigua* Adr. Juss) / Fernanda Rodrigues
Martinelli. - Araraquara : [s.n], 2010
138 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Alberto José Cavalheiro

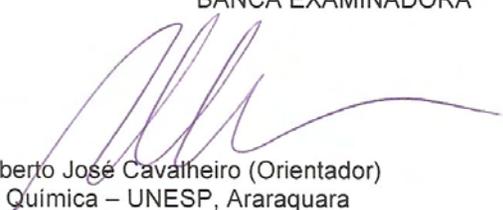
.....1. Química orgânica. 2. Validação. 3. Estabilidade.
4. Determinação de pureza. I. Título.

FERNANDA RODRIGUES MARTINELLI

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 17 de agosto de 2010.

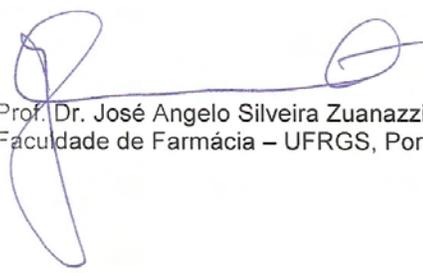
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alberto José Cavalcheiro (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi
Faculdade de Farmácia – UFRGS, Porto Alegre

*Aos meus pais, Marcos e Aparecida
pelos ensinamentos, companheirismo e
apoio em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Alberto José Cavalheiro, pela orientação, respeito e confiança, que resultaram em um crescimento profissional e pessoal.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química que sempre estiveram dispostos a ajudar com esclarecimentos.

Ao grupo Centroflora pela oportunidade e incentivo.

Ao Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, NuBBE, do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara- UNESP.

Ao Dr. Nivaldo Borale pelos experimentos de ressonância magnética nuclear.

Ao prof. Dr. Norberto Peporine Lopes e ao Químico José Carlos Tomaz pelos experimentos de massas.

Ao prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro pela realização das análises térmicas.

A todos os meus amigos do trabalho, especialmente ao Hernani pelas amostragens de planta, objeto deste trabalho, ao João e ao Marino pela amizade e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Agradeço a minhas amigas Fernanda e Mariana ao apoio em diferentes momentos dessa caminhada.

Aos meus queridos irmãos, Fabiana e Júnior, por inúmeras vezes acreditarem e torcerem por mim, dando apoio e incentivo.

Aos meus pais Aparecida e Marcos, porque sem eles eu nada seria. E porque os amo a perder de vista...

E obviamente a Deus que me provou por inúmeras vezes a sua presença.

“A educação sozinha não transforma a sociedade, sem
ela tampouco a sociedade muda.”
(Paulo Freire)

RESUMO

A espécie *Trichilia catigua*, é uma árvore de 3 a 5 metros de altura, de distribuição ampla nos países da América do Sul, é conhecida como catuaba ou catiguá ou Angelim rosa, é utilizada popularmente como tônico mental e físico e especialmente como estimulante sexual. Cinchonaínas A e B foram escolhidas como marcadores químicos para a padronização do extrato hidroalcólico de cascas de catuaba por serem as substâncias majoritárias desse extrato e também possuírem atividades antioxidante e antibacteriana. Como os padrões de cinchonaínas ainda não são comercializados foi realizado, neste trabalho, o isolamento, identificação, determinação de pureza absoluta e estudo de estabilidade destes compostos para que possam ser utilizados adequadamente como padrões de trabalho. A purificação das cinchonaínas foi feita em CLAE preparativo, utilizando coluna de fase reversa C18 e gradiente linear de CH₃COOH (0,1%) em H₂O/MeOH e a identificação foi realizada através da análise dos espectros de massas de alta resolução e RMN de ¹H e ¹³C. Foram realizados também estudos de estabilidade em solução para cinchonaína A, B e extrato hidroalcólico da casca de catuaba em diferentes condições de armazenamento. Os estudos de estabilidade acelerada foram realizados de acordo com RE 398 da ANVISA em condições de temperatura (40°C) e umidade (75% UR). Estes estudos indicaram que os padrões de cinchonaína A e B são estáveis quando mantidos secos sob condições ambientais, com prazo de validade estimado de dois anos. No entanto, em solução hidrometanólica (MeOH:H₂O 1:1) ocorre rápida oxidação com formação das di - orto – quinonas, indicando que as soluções mães desses padrões não podem ser estocadas por mais de 1 dia. O estudo de estabilidade em solução, mostrou que o perfil cromatográfico das soluções hidroalcólicas da planta não apresentou alteração durante o período de 7 dias, indicando que amostras podem ser preparadas e estocadas por esse período. Os parâmetros para preparação de extrato hidroalcólico de cascas e catuaba, visando a maximização do teor de cinchonaínas, foram determinados, resultando nas seguintes condições: EtOH:H₂O (1:1) como solvente mais eficiente na extração por 30min, em refluxo e aquecimento a 60°C e proporção droga solvente de 1:10. Para a quantificação dos extratos de catuaba e para a realização do estudo de estabilidade das cinchonaínas isoladas e da planta de catuaba o método cromatográfico proposto, que utiliza coluna de fase reversa C18 e gradiente linear de CH₃COOH (0,1%) em H₂O/MeOH foi validado de acordo com parâmetros descritos na resolução RE899, da ANVISA para métodos analíticos.

Palavras - chave: Cinchonaínas. *Trichilia catigua*. Estabilidade. Validação. Determinação de pureza.

ABSTRACT

Trichilia catigua, is a tree which grows 6.56 to 13.12 feet, widely distributed in South America, and is known as catuaba, catiguá or Angelim renders rose-colored and is popular used as mental and physical tonic and especially as sexual stimulant. Cinchonains A and B were chosen as chemical markers to standardize the extract in focus due the major concentration of those substances in the hydroalcoholic extract from bark of catuaba and also due to antioxidant and anti bacterial activities related to them. Since the cinchonains standards are not commercialized, we had to perform the isolation, identification, absolute purity and stability study of these compounds, so that they could be properly used as standards. The cinchonains purification was performed in HPLC using preparative C-18 reverse phase column and H₂O/MeOH as solvent, by running a linear gradient. The identification was obtained through high resolution mass spectrum and ¹H e ¹³C NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Stability studies were executed in solution of cinchonain A, B and hydroalcoholic extract from bark of catuaba in different storage conditions. The accelerated stability studies were performed according to RE 398, November 12nd of 2004 - ANVISA under temperature of 40 °C and humidity of 75% UR. These studies indicated that standards of cinchonain A and B are stable when they are dried and kept under ambient conditions, having a shelf life estimated of two years. However, in hydromethanol solution (MeOH:H₂O 1:1), rapid oxidation occurs leading to di-ortho-quinones formation, indicating that stock standards solutions cannot be stored more than 1 day. The stability study on solution showed that the chromatographic profile of the plant hydroalcoholic solution did not present alteration within 7 days, indicating that samples can be prepared and stored during this period. The parameters for preparation of hydroalcoholic extract from bark of catuaba, aiming the maximization of cinchonains content, were determined, resulting in the following conditions: solvent EtOH:H₂O (1:1), under reflux and heating at 60°C, for 30min and drugs solvent ratio of 1:10. In order to quantify the catuaba extract, perform the stability study of isolated cinchonanins and catuaba plant, the chromatography method proposed, which uses preparative C-18 reverse phase column and H₂O/MeOH as solvent, running in a linear gradient, was validated in accordance to the RE 398, November 12nd of 2004 – ANVISA.

Key-words: Cinchonains. *Trichilia catigua*. Stability. Validation. Purity determination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Árvore, folhas e cascas de <i>T. catigua</i> .	23
Figura 2 – <i>Trichilia catiguá</i> Adr. Juss., Meliaceae.	24
Figura 3 – Limonóides isolados de <i>T. catigua</i> .	25
Figura 4 – Catiguanina A (1), catiguanina B (2), cinchonaína A (3), cinchonaína B (4), cinchonaína C e D (5, 6) isoladas de <i>T. catigua</i> .	26
Figura 5 – Biossíntese da catiguanina B.	27
Figura 6 – Sequência experimental para elaboração do extrato clorofórmico de catuaba.	35
Figura 7 – Cromatogramas obtidos nos estudos preliminares das condições cromatográficas em $\lambda = 254$ nm.	51
Figura 8 – Cromatograma preparativo obtido da fase clorofórmica de catuaba, $\lambda = 254$ nm .	51
Figura 9 – Cromatogramas da fase clorofórmica e das subfrações 1 e 2 respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	52
Figura 10 – Subfração 1 – Cinchonaína B.	57
Figura 11 – Subfração 2 – Cinchonaína A.	57
Figura 12 – Aspecto das subfrações isoladas, cinchonaína A e B respectivamente.	57
Figura 13 – Conformação de menor energia para cinchonaína B – visão frontal e lateral.	58
Figura 14 – Conformação de menor energia para cinchonaína A – visão frontal e lateral.	58
Figura 15 – Cromatogramas obtidos na análise de pureza cromatográfica da cinchonaína A em coluna fenilexil (1 – branco e 2 – cinchonaína A) e c18 (3 – branco e 4 – cinchonaína A), $\lambda = 254$ nm.	59
Figura 16 – Cromatogramas obtidos na análise de pureza cromatográfica da cinchonaína B em coluna fenilexil (1 – branco e 2 – cinchonaína B) e c18 (3 – branco e 4 – cinchonaína B), $\lambda = 254$ nm.	60
Figura 17 – Curvas da perda de massa (verde), derivada da perda de massa (azul) e diferença de temperatura (vermelha) para cinchonaína A.	61
Figura 18 – Curva da perda de massa por aquecimento da cinchonaína	62

A.

Figura 19 – Curvas da perda de massa (preta), derivada da perda de massa (pontilhada) e diferença de temperatura (vermelha) para cinchonaína B.	62
Figura 20 – Curva da perda de massa por aquecimento da cinchonaína B.	63
Figura 21 – Avaliação onset – cinchonaína A.	63
Figura 22 – Avaliação onset – cinchonaína B.	64
Figura 23 – Superfície de resposta para T.A em função da porcentagem de etanol e temperatura.	66
Figura 24 – Superfície de resposta para T.A em função do tempo de extração e da porcentagem de etanol.	67
Figura 25 – Superfície de resposta para T.A em função da porcentagem de etanol e proporção droga/solvente.	67
Figura 26 – Superfície de resposta para T.A em função da temperatura e proporção droga solvente.	68
Figura 27 – Cromatograma e espectros de UV referente aos padrões de cinchonaína A e B, $\lambda = 254$ nm.	69
Figura 28 – Cromatograma e espectros de UV referente ao extrato hidroalcolico de catuaba, $\lambda = 254$ nm.	70
Figura 29 – Curva analítica referente ao padrão de cinchonaína A.	71
Figura 30 – Curva analítica referente ao padrão de cinchonaína B.	72
Figura 31 – Cromatogramas referentes aos padrões de cinchonaínas A e B, nos cinco níveis de concentração utilizados para preparar as curvas analíticas, $\lambda = 254$ nm.	73
Figura 32 – Cromatogramas do ruído da linha de base, $\lambda = 254$ nm.	73
Figura 33 – Cromatograma representando o limite de detecção do método, $\lambda = 254$ nm.	74
Figura 34 – Cromatograma representando o limite de quantificação do método, $\lambda = 254$ nm.	74
Figura 35 – Cromatogramas obtidos das análises de exatidão nas concentrações baixa, média e alta respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	76

Figura 36 – Cromatogramas das análises de repetibilidade nas concentrações baixa, média e alta respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	78
Figura 37 – Cromatogramas obtidos da análise de precisão intermediária realizada no primeiro dia de análise, $\lambda = 254$ nm.	79
Figura 38 – Cromatogramas obtidos da análise de precisão intermediária realizada no segundo dia de análise, $\lambda = 254$ nm.	79
Figura 39 – Cromatogramas obtidos da análise de precisão intermediária realizadas pelo analista 1, $\lambda = 254$ nm.	80
Figura 40 – Cromatogramas obtidos da análise de precisão intermediária realizadas pelo analista 2, $\lambda = 254$ nm.	81
Figura 41 – Cromatogramas referentes às análises de robustez modificando-se a vazão da fase móvel, $\lambda = 254$ nm.	82
Figura 42 – Cromatogramas referentes às análises de robustez modificando-se a composição da fase móvel, $\lambda = 254$ nm.	83
Figura 43 – Cromatogramas referentes às análises de robustez utilizando dois lotes diferentes de coluna do mesmo fabricante, $\lambda = 254$ nm.	85
Figura 44 – Cromatogramas da cinchonaína A durante os seis meses do estudo de estabilidade acelerada, $\lambda = 254$ nm.	85
Figura 45 – Cromatogramas da cinchonaína B durante os seis meses do estudo de estabilidade acelerada, $\lambda = 254$ nm.	88
Figura 46 – Cromatogramas da cinchonaína A na condição A, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	90
Figura 47 – Cromatogramas da cinchonaína A na condição B, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	91
Figura 48 – Cromatogramas da cinchonaína A na condição C, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	93
Figura 49 – Cromatogramas da cinchonaína A na condição D, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	94
Figura 50 – Cromatogramas da cinchonaína A na condição E, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	95
Figura 51 – Aspecto das soluções (MeOH:H ₂ O 1:1) de cinchonaína A no tempo zero, e após o período de 14 dias nas condições A, B, C, D e E respectivamente.	96

Figura 52 – Gráfico do decaimento da área do pico de cinchonaína A durante o período do estudo de estabilidade em solução nas condições A, B, C, D e E.	97
Figura 53 – Cromatogramas da cinchonaína B na condição A, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	98
Figura 54 – Cromatogramas da cinchonaína B na condição B, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	99
Figura 55 – Cromatogramas da cinchonaína B na condição C, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	100
Figura 56 – Cromatogramas da cinchonaína B na condição D, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	102
Figura 57 – Cromatogramas da cinchonaína B na condição E, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	103
Figura 58 – Aspecto das soluções (MeOH:H ₂ O 1:1) de cinchonaína B no tempo zero, e após o período de 14 dias nas condições A, B, C, D e E respectivamente.	104
Figura 59 – Gráfico do decaimento da área do pico de cinchonaína B durante o período do estudo de estabilidade em solução nas condições A, B, C, D e E.	105
Figura 60 – Cromatogramas do extrato, na condição A, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	106
Figura 61 – Cromatogramas do extrato, na condição B, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	107
Figura 62 – Cromatogramas do extrato, na condição C, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	109
Figura 63 – Cromatogramas do extrato, na condição D, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	110
Figura 64 – Cromatogramas do extrato, na condição E, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.	111
Figura 65 – Gráfico do decaimento de área das cinchonaínas A (esquerda) e B (direita) durante o estudo de estabilidade em solução da planta de catuaba.	113
Figura 66 – Cromatogramas obtidos por CLAE-EM para identificação do composto de degradação.	114
Figura 67 – Espectro de UV e EM da cinchonaína B.	115

Figura 68 – Espectro de UV e EM da cinchonaína A.	115
Figura 69 – Espectros de UV e EM da degradação da cinchonaína A.	115
Figura 70 – Espectros de UV e EM da degradação da cinchonaína B.	115
Figura 71 – Oxidação da cinchonaína.	116
Figura 72 – Cromatogramas do extrato clorofórmico de catuaba com detalhe para os picos com mesmo m/z.	117
Figura 73 – Espectros de massas dos picos destacados na figura 72.	118
Figura 74 – Estruturas químicas das cinchonaínas A/B (1), cinchonaínas C/D (2) e estruturas propostas para cinchonaínas E/F (3).	119
Figura 75 – Cromatograma do extrato clorofórmico para determinação de cinchonaínas totais, $\lambda = 254$ nm.	120
Figura 76 – Espectros de UV dos picos correspondentes ao cromatograma apresentado na figura 75.	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Zonas climáticas e critérios de temperatura e umidade.	30
Tabela 2 - Parâmetros cromatográficos utilizados na análise por CLAE-analítico.	34
Tabela 3 - Condições cromatográficas avaliadas.	34
Tabela 4 -Parâmetros cromatográficos utilizados na análise por CLAE – preparativo da fase clorofórmica do extrato hidroalcolico de catuaba.	36
Tabela 5 - Condição cromatográfica utilizada para fracionamento em CLAE – preparativo.	36
Tabela 6 - Planejamento experimental para otimização da extração de cinchonaína A e B de cascas de catuaba.	39
Tabela 7 - Valores de concentração dos padrões de cinchonaína A e B utilizados para a preparação da curva analítica.	42
Tabela 8 – Gradiente cromatográfico utilizado no método e alterações para realização dos testes de robustez do método.	47
Tabela 9 – Condições experimentais utilizadas nos testes de estabilidade dos padrões e extrato hidroalcolico de catuaba.	49
Tabela 10 - Massas das subfrações obtidas do fracionamento em CLAE – Preparativo.	52
Tabela 11 - Dados de RMN da subfração 1 e subfração 2 do extrato clorofórmico. (MeOD, δ ppm).	54
Tabela 12 - Dados espectroscópicos de RMN (^1H , ^{13}C) para as Cinchonaínas A e B (CD ₃ OD) (Pizzolatti et al ., 2002).	55
Tabela 13 - Dados espectroscópicos de RMN (^1H , ^{13}C) para as Cinchonaínas C e D (CD ₃ OD) (Chen, et al., 1992).	56
Tabela 14 - Valores de área obtidas da análise de pureza por CLAE.	61
Tabela 15 - Variáveis e respostas do planejamento experimental real paraparaa otimização da extração de cinchonaínas em casca de catuaba.	65
Tabela 16 - Respostas de área em função das concentrações dos padrões de Cinchonaína A e B no teste de linearidade.	72

Tabela 17 - Resultados obtidos no ensaio de exatidão para cinchonaína A.	75
Tabela 18 - Resultados obtidos no ensaio de exatidão para cinchonaína B.	76
Tabela 19 - Resumo dos resultados obtidos no teste de repetibilidade.	77
Tabela 20 - Resumo dos resultados obtidos no teste de precisão intermediária –Mesmo analista em dias diferentes.	79
Tabela 21 - Resumo dos resultados obtidos no teste de precisão intermediária – Analistas diferentes.	80
Tabela 22 - Resultados experimentais da análise de robustez variando-se o fluxo da fase móvel.	81
Tabela 23 - Resultados experimentais da análise de robustez variando-se a composição da fase móvel.	83
Tabela 24 - Resultados das análises de robustez variando-se o lote da coluna	84
Tabela 25 - Valores da concentração injetada, área e área corrigida obtidas das análises do estudo de estabilidade para cinchonaína A.	87
Tabela 26 - Valores da concentração injetada, área e área corrigida obtidas das análises do estudo de estabilidade para cinchonaína B.	89
Tabela 27 - Valores das porcentagens normalizadas da área do pico de cinchonaína A durante o estudo de estabilidade em solução nas diferentes condições de armazenamento.	97
Tabela 28 - Valores das porcentagens normalizadas da área do pico de cinchonaína B durante o estudo de estabilidade em solução nas diferentes condições de armazenamento.	105
Tabela 29 - Valores das porcentagens normalizadas da área do pico de cinchonaína B durante o estudo de estabilidade do extrato hidroalcolico de catuaba.	112
Tabela 30 - Valores de área da cinchonaína B durante o estudo de estabilidade em solução do extrato hidroalcolico de catuaba.	113
Tabela 31 - Condição cromatográfica para determinação de cinchonaínas totais.	120

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

d – dubleto

dd – duplo dubleto

DAD - Detector de arranjos de diodos

DSC - Calorimetria exploratória diferencial (*Differential Scanning Calorimetry*)

DTA - Análise térmica diferencial

DTG - Derivada da termogravimetria

EM – Espectrometria de massa

EtOH – Etanol

FM - Fase móvel

H₂O - água

MeOH – Metanol

RE – Resolução

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

s- singleto

T – Temperatura

t – tempo

TG – Termogravimetria

U.R – Umidade relativa

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1. Introdução.....	19
2. Objetivos.....	21
3. Revisão Bibliográfica.....	21
3.1. A família Meliaceae.....	21
3.2. O gênero <i>Trichilia</i>	22
3.3. A espécie <i>Trichilia catigua</i>	22
3.4. Anatomia da casca do caule.....	23
3.5. Aspectos químicos.....	24
3.6. Aspectos farmacológicos.....	27
3.7. Estudo de estabilidade.....	27
4. Materiais.....	31
5. Métodos.....	33
5.1. Isolamento e caracterização estrutural das substâncias químicas majoritárias.....	33
5.1.1. Objetivos específicos.....	33
5.1.2. CLAE – Analítico.....	33
5.1.3. Preparo do extrato clorofórmico.....	35
5.1.4. CLAE – Preparativo.....	35
5.1.5. Análise das subfrações.....	36
5.1.6. Identificação das substâncias isoladas.....	37
5.1.7. Análise de pureza.....	37
5.1.7.1. CLAE.....	37
5.1.7.2. Análise Térmica.....	37
5.2. Otimização das condições de extração e validação do método por CLAE.....	38
5.2.1. Objetivos específicos.....	38
5.2.2. Otimização de extração.....	38
5.2.3. Validação do método por CLAE para determinação de cinchonaína A e cinchonaína B em extratos de catuaba..	39
5.2.3.1. Especificidade e seletividade.....	40
5.2.3.2. Intervalo.....	41
5.2.3.3. Linearidade.....	41
5.2.3.4. Limite de detecção.....	42
5.2.3.5. Limite de quantificação.....	43
5.2.3.6. Exatidão.....	43
5.2.3.7. Precisão.....	44
5.2.3.8. Robustez.....	45
5.3. Estudo de estabilidade.....	47
5.3.1. Objetivos específicos.....	47
5.3.2. Estudo da estabilidade acelerada.....	47
5.3.3. Avaliação da estabilidade das cinchonaínas A e B em solução e do extrato hidroalcoólico de catuaba.....	48
5.3.4. Caracterização do composto de degradação das cinchonaínas.....	49
6. Resultados....	50
6.1. CLAE – Analítico.....	50
6.2. Fracionamento em CLAE – preparativo.....	51
6.3. Análise das subfrações.....	52

6.4.	Identificação dos compostos isolados.....	53
6.5.	Análise de pureza.....	59
6.5.1.	Análise de pureza por CLAE.....	59
6.5.2.	Análise térmica.....	61
6.6.	Otimização do preparo do extrato hidroalcolico.....	65
6.7.	Validação.....	69
6.7.1.	Especificidade e seletividade.....	69
6.7.2.	Intervalo.....	71
6.7.3.	Linearidade.....	71
6.7.4.	Limite de detecção e quantificação.....	73
6.7.5.	Exatidão.....	75
6.7.6.	Precisão.....	77
6.7.6.1.	Repetibilidade.....	77
6.7.6.2.	Precisão intermediária.....	78
6.7.7.	Robustez.....	81
6.7.7.1.	Vazão da fase móvel.....	81
6.7.7.2.	Composição da fase móvel.....	82
6.7.7.3.	Coluna.....	84
6.8.	Estabilidade acelerada.....	85
6.8.1.	Cinchonaína A.....	85
6.8.2.	Cinchonaína B.....	88
6.9.	Estabilidade em solução.....	90
6.9.1.	Cinchonaína A.....	90
6.9.2.	Cinchonaína B.....	98
6.9.3.	Estudo de estabilidade do extrato hidroalcolico de catuaba.....	106
6.10.	CLAE – EM.....	114
6.10.1.	Caracterização do produto de degradação das cinchonaínas.....	114
6.10.2.	Análise por CLAE – EM do extrato clorofórmico.....	116
7.	Discussão dos resultados.....	121
	Referências.....	123
	Anexos.....	128

1 - Introdução

O uso de produtos naturais iniciou-se há milhares de anos por populações de várias partes do mundo, com o intuito de tratar diversas patologias. Até os dias de hoje as plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial. Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna nas últimas décadas, elas continuam sendo utilizadas e, estima-se, que cerca de 25% a 30% de todas os fármacos avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR & MELLO, 2008).

No Brasil, o uso das plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura indígena. É um país rico em diversidade cujo território possui cinco principais biomas sendo designados como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga. Portanto, é uma rica fonte de produtos terapêuticos. No entanto, este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novos fármacos é pobremente explorado ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008).

No final do século passado, mais especificamente nos anos 60, ocorreu nos países desenvolvidos iniciando pela Alemanha, França e Reino Unido, e posteriormente difundindo-se para outros países da Europa e América do Norte, um interesse maior pela fitoterapia e, ao invés de utilizar a infusão, cozimento ou tintura de vegetais secos ou frescos, passam a usar formas farmacêuticas mais elaboradas, como os comprimidos, cápsulas e gélias (CUNHA *et al.*, 2003). Este interesse surgiu principalmente devido às populações acreditarem que os fitoterápicos são isentos ou possuem poucos efeitos colaterais, e que são aparentemente eficazes nos casos onde a medicina tradicional não alcançou resultados esperados, o que nem sempre é confirmado pelas pesquisas científicas que avaliam a eficácia e a segurança assim também como a garantia de qualidade na produção desses medicamentos (CALIXTO, 2000; CARVALHO *et al.*, 2008).

A busca da população por estas plantas incentivou os pesquisadores e a indústria farmacêutica a investirem mais nas pesquisas de novos fármacos. (CUNHA *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2006). Motivada por inúmeros fatores, tais como a necessidade de inovação e carência de novas drogas para tratamento de doenças

que ainda permanecem sem tratamento adequado, pressão entre as indústrias e, sobretudo, por vantagens competitivas e declínio de produtividade, as indústrias farmacêuticas vêm, ultimamente, investindo em recursos para o desenvolvimento de novos fármacos (CALIXTO, 2001), inclusive de fitoterápicos. Nesse sentido, é de suma importância o controle de qualidade de fitoterápicos, não apenas para aperfeiçoar e validar os processos de produção, mas principalmente, para assegurar os padrões de qualidade, que garantem a eficácia e segurança dos medicamentos (CORDEIRO, G. A., 2006)

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontra-se a espécie *Trichilia catigua* (Meliaceae), que é uma árvore de 3 a 5 metros de altura, de distribuição ampla nos países da América do Sul, tais como Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina (TANG *et al.*, 2007). Popularmente é conhecida como catuaba ou catiguá (KLEIN, 1984). Seus caules são utilizados em medicamentos populares como tônico mental e físico e especialmente como afrodisíaco.

Desta espécie foram isoladas 2 flavolignanas - cinchonaínas A e B - do extrato do caule da planta. Estas substâncias exibiram forte atividade antibacteriana e antioxidante (TANG *et al.*, 2007).

As cinchonaínas, por serem as substâncias de maior abundância nos extratos do caule de catuaba, foram eleitas como marcadores químicos dos extratos desta espécie. Contudo, há questionamentos quanto à estabilidade destes compostos em solução, podendo oxidar-se rapidamente com alteração substancial do seu grau de pureza, dificultando sua utilização na padronização rotineira de extratos em processos industriais.

Apesar de já existirem métodos para a quantificação de cinchonaína A em extratos de catuaba, não há estudos sobre a estabilidade da substância, o que pode ocasionar erros quantitativos no decorrer da análise.

Este trabalho visa, portanto, o desenvolvimento de metodologia para a quantificação desses marcadores em extratos de catuaba, focando a estabilização das substâncias (cinchonaínas A e B), usadas como padrões, para minimizar erros de análise tornando assim as análises mais confiáveis.

2 – Objetivos

Desenvolver um método para quantificação de cinchonaínas em extratos de catuaba (*T. catigua*) através de um padrão estável e confiável, incluindo:

- 1) Isolamento e caracterização estrutural das cinchonaínas A e B.
- 2) Determinação da estabilidade das substâncias isoladas.
- 3) Estudo do produto de degradação das cinchonaínas.
- 4) Determinar condições de preparação do padrão;
- 5) Otimização de condições cromatográficas para análises quantitativa de cinchonaínas em extrato de catuaba.
- 6) Validação do método proposto.

3 - Revisão Bibliográfica

3.1 - A Família Meliaceae

A família Meliaceae é formada por 51 gêneros com aproximadamente 1400 espécies em grande parte pantropicais, sendo poucas subtropicais e de regiões temperadas (BARROSO *et al.*, 1984). Divide-se em quatro subfamílias: Capuronianthoideae, Quivisianthoideae, Swietenioideae, Melioideae (Pennington *et al.*, 1975), sendo que na flora brasileira apenas as duas últimas possuem representantes. Swietenioideae compreende os gêneros *Carapa* Aubl., *Cedrela* P. Browne e *Swietenia* Jacq., enquanto que a subfamília Melioideae inclui os gêneros *Cabralea* A. Juss., *Guarea* Allemand ex Linnaeus e *Trichilia* P. Browne (BARROSO *et al.*, 1984). Várias espécies da família Meliaceae apresentam potencial econômico, tanto no fornecimento de madeiras (JOLY, 1983; LORENZI, 1992), como de óleos essenciais, com diversas finalidades (BALOGUN *et al.*, 1985; CORTEZ *et al.*, 1992).

As espécies dessa família também apresentam princípios ativos medicinais (AWE *et al.*, 1991) ou inibidores de crescimento e repelentes de insetos (ARIAS *et al.*, 1988; KOUL *et al.*, 1990).

3.2 - O gênero *Trichilia*

Para alguns autores o gênero *Trichilia* é constituído por aproximadamente 230 espécies, distribuídas principalmente na América Tropical (BANERGI *et al.*, 1984; MIKOLAJCZAK *et al.*, 1989). Outros incluem no gênero *Trichilia* P. Browne em torno de 70 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (KLEIN 1984; JUDD *et al.*, 1999).

As espécies desse gênero têm sido biologicamente estudadas quanto à atividade inseticida, mostrando-se promissoras para uso no controle de *Spodoptera frugiperda* (VENDRAMIM, 1997). Em termos fitoquímicos, estudos mostram que o gênero é rico em metabólitos oriundos da rota biogenética dos terpenos, tais como esteróides, triterpenos e os tetranortriterpenóides (limonóides) (RODRIGUES *et al.*, 2000).

3.3 - A espécie *Trichilia catigua*

A espécie *Trichilia catigua*, é uma árvore de 3 a 5 metros de altura, de distribuição ampla nos países da América do Sul, tais como Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina (TANG *et al.*, 2007).

Popularmente é conhecida como catuaba ou catiguá (KLEIN, 1984) ou angelim rosa (KLEIN, 1984; LORENZI *et al.*, 2002). Seus caules são utilizados em medicamentos populares como tônico mental e físico e especialmente como afrodisíaco. Também é indicada para fadiga mental e astenia neuromuscular, tem efeito analgésico (VAS *et al.*, 1997; PIZZOLATTI *et al.*, 2002; CAMPOS *et al.*, 2005) e ação vaso relaxante (CALIXTO *et al.*, 1997).



Figura 1 – Árvore, folhas e cascas de *T. catigua*.

3.4 - Anatomia da casca do caule

Em secção transversal da casca de caule, a periderme consiste de camadas de súber, cujas células são tabulares, de paredes espessadas e com pontuações nítidas, de felogênio e de diversos estratos de feloderme (Fig. 2E). O córtex compreende várias camadas de parênquima cortical (Figs. 2A, 2E), formado por células isodiamétricas, de paredes relativamente delgadas. No floema, em meio a numerosas células parenquimáticas, distinguem-se elementos crivados, células pétreas, fibras e células obliteradas (Figs. 2B, 2C). As fibras apresentam lúmen estreito (Figs. 2B, 2C), contêm prismas de oxalato de cálcio (Fig. 2D) e se dispõem em faixas ou em pequenos grupos, juntamente com algumas células pétreas. Em secção transversal, raios parenquimáticos estreitos, constituídos de células de paredes radiais relativamente curtas, percorrem o floema (Fig. 2C). Drusas de oxalato de cálcio são observadas nas regiões cortical (Fig. 2E) e floemática (LAGOS *et al.*, 2007).

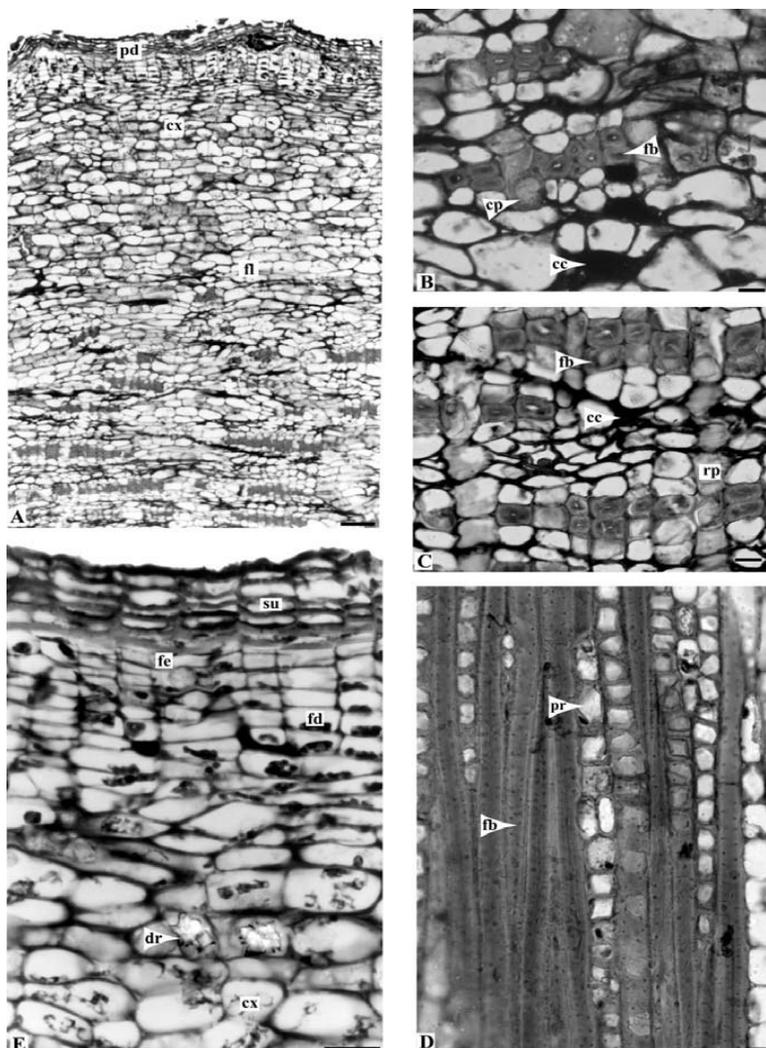


Figura 2 - *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae - casca de caule: **A.** aspecto da organização da casca; **B.** secção transversal do floema, indicando grupamentos de fibras e células pétreas; **C.** raios parenquimáticos percorrendo o floema; **D.** secção longitudinal de fibras floemáticas contendo prismas; **E.** detalhe do sistema de revestimento e de parte do córtex. **cc** - célula obliterada, **cp** - célula pétreia, **cx** - córtex, **dr** - aglomerados de cristais, **fb** - fibra, **fd** - feloderme, **fe** - felogênio, **fl** - floema, **pd** - periderme, **pr** - prisma, **rp** - raio parenquimático, **su** - súber. Barra = 50 μ m (A), 20 μ m (B-E). (LAGOS *et al.*, 2007).

3.5 - Aspectos Químicos

A família Meliaceae, incluindo a espécie *Trichilia catigua*, foi e ainda está sendo estudada química e farmacologicamente e, com isto, alguns dos seus compostos foram isolados e identificados. Assim, diferentes classes de metabólitos de interesse medicinal foram relatados.

Limonóides, diterpenos e ácidos fenólicos foram isolados das folhas de *T. heudelotti* (ALADESANMI *et al.*, 2000), também foram isolados alguns limonóides e esteróides de *T. Hirta* (GEORGE *et al.*, 1973) (CHAURET *et al.*, 1996). Das folhas de *T. prieuriana* foram isolados triterpenos tetracíclicos (OLUGBADE, 1991) e alguns protolimonóides (OLUGBADE *et al.*, 2000). Em *T. roka* e *T. rubra* foram encontrados limonóides (NAKATANI *et al.*, 1985) (MUSZA *et al.*, 1995).

Dos extratos orgânicos de sementes e frutos de *T. catigua* foram isolados os limonóides angolensato de metila (I), mistura epimérica de fotogedudina (II) e (III), cedrelona (IV) e 11 β -metoxicedrelona (V). (figura3) (MATOS *et al.*, 2009).

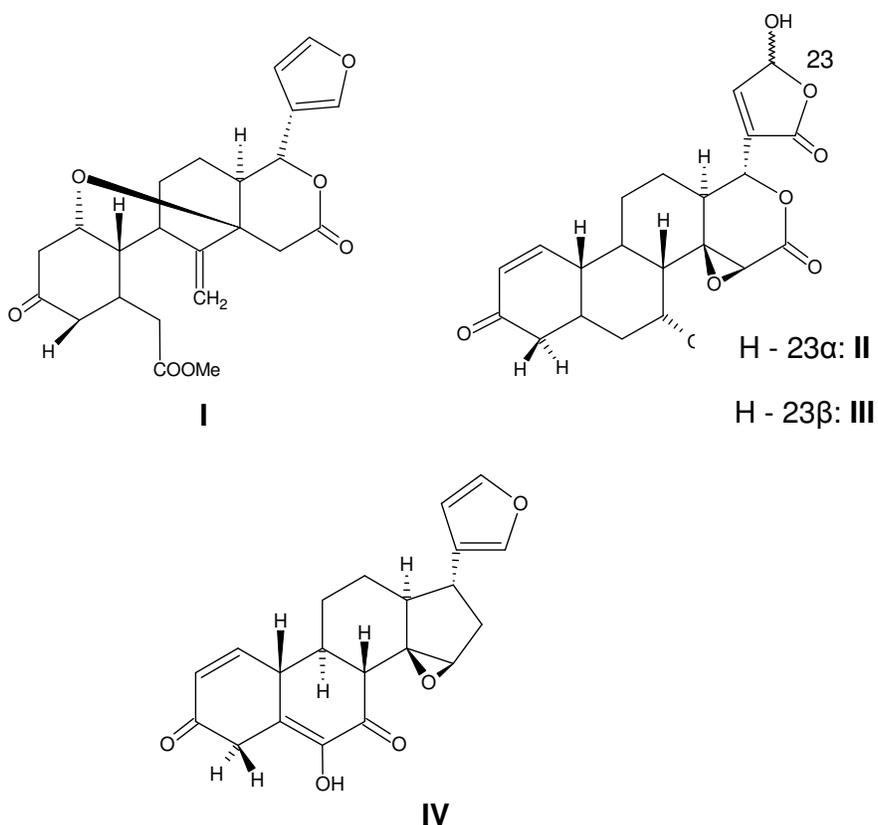


Figura 3: Limonóides isolados de *T. catigua*

Das cascas *T. catigua* já foram isoladas catiguanina A (1) e catiguanina B (2) (Figura 2) (TANG *et al.*, 2007). Desta espécie também foram isoladas mais quatro flavolignanas - cinchonaínas A (3) e B (4) e cinchonaínas C (5) e D (6) (PIZZOLATTI *et al.*, 2002) (figura 4) - do extrato do caule da planta.

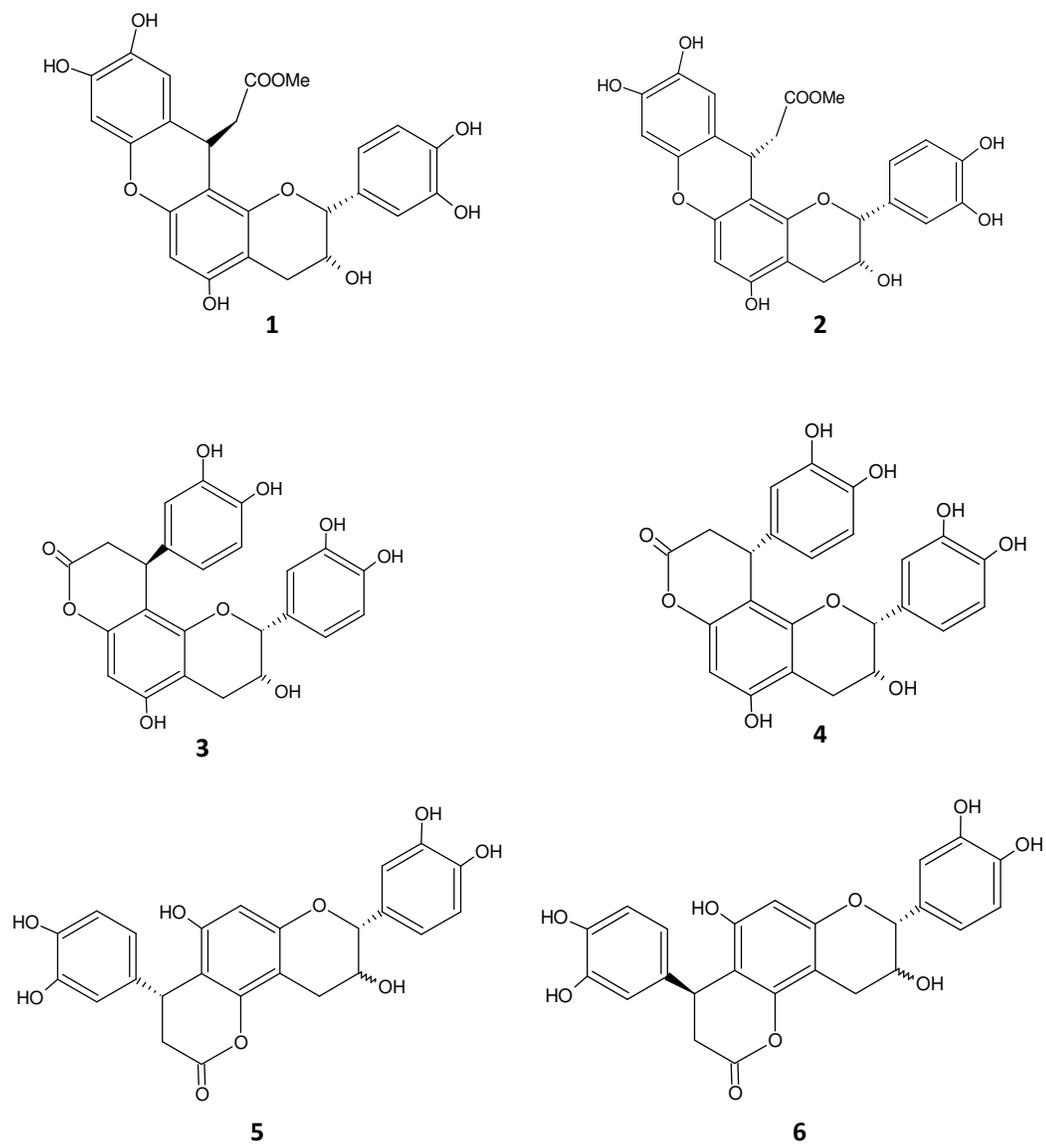


Figura 4 – Catiguanina A (1), catiguanina B (2), cinchonaína A (3), cinchonaína B (4), cinchonaína C e D (5,6) *isoladas de T. catigua*.

A provável biossíntese da catiguanina B é proposta a partir da cinchonaína A (TANG *et al.*, 2007) (Figura 5).

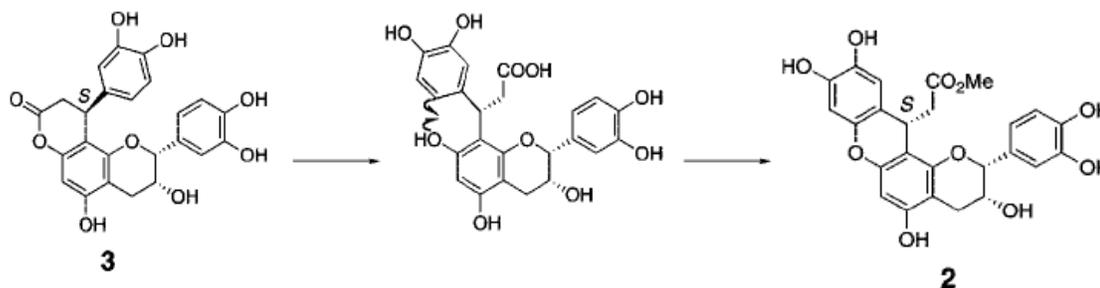


Figura 5 – Biossíntese da catiguanina B

3.6 - Aspectos Farmacológicos (Atividade biológica)

Os caules de *T. catigua* são utilizados em medicamentos populares como tônico mental e físico e afrodisíaco. Também é indicada para fadiga mental e astenia neuromuscular, tem efeito analgésico (VAS *et al.*, 1997), ação vaso relaxante (CALIXTO *et al.*, 1997) e efeito antidepressivo (CAMPOS *et al.*, 2005).

Catiguaninas A (1) e B (2) e cinchonaínas C (5) e D (6) apresentaram forte atividade antioxidante (TANG *et al.*, 2007). Cinchonaína A e cinchonaína B exibiram atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (PIZZOLATTI *et al.*, 2002), além da atividade antioxidante (TANG *et al.*, 2007).

3.7 – Estudo de estabilidade

Um importante pré-requisito para a qualidade de um medicamento é a garantia de sua qualidade durante a sua vida útil. Estabilidade é definida como sendo a manutenção da qualidade e integridade até o fim da vida útil estabelecida para determinado medicamento (FEIDEN, 1994).

Drogas de origem vegetal e preparações de origem vegetal obedecem aos mesmos regulamentos oficiais que regem os medicamentos definidos como substâncias que respeitam a qualidade, eficácia e segurança (LOWEN *et al.*, 1999).

No entanto, na maioria das monografias não são relatados estudos de estabilidade para os compostos farmacologicamente ativos ou marcadores químicos das mesmas. Por esta razão, torna-se cada vez mais imprescindível se obter informações sobre a estabilidade destes componentes (BILIA *et al.*, 2001 e 2002; HEIGL e FRANZ, 2003).

O teste de estabilidade tem como finalidade avaliar o comportamento dos fármacos ou medicamentos que se alteram com o tempo por influência de uma variedade de fatores ambientais, tais como: a temperatura, a umidade e a luz. Além disso, pretende estabelecer um período de contraprova ou vida útil para os medicamentos e condições de armazenamento recomendadas.

Os estudos de estabilidade acelerada são destinados a aumentar a velocidade de degradação química e modificação física de uma substância e/ou alterações de características de forma farmacêutica, usando condições forçadas de armazenamento, com o propósito de monitorar as reações de degradação e prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser utilizados para avaliar efeitos químicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a situações fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer, por exemplo, durante o transporte.

Os ensaios de estabilidade acelerada permitem estabelecer um período de vida útil provisório. Os mesmos devem ser complementados com estudos de longa duração, realizados nas condições de armazenamento determinadas para o medicamento. Estudos de estabilidade de longa duração, por sua vez, são validações dos experimentos em relação às características físicas, químicas e biológicas do medicamento, durante e depois do prazo de validade.

A necessidade de se realizar testes de estabilidade surge no momento em que o empirismo verificado até então foi, na sua maioria, substituído por princípios mais científicos na avaliação da estabilidade baseando-se em princípios químicos mais apropriados para caracterizar o envelhecimento de um medicamento.

O plano de estudo de estabilidade deve contemplar avaliações físicas, químicas, físico-químicas e microbiológicas, quando for o caso. Deve-se avaliar também presença ou formação qualitativa e quantitativa de subprodutos e/ou produtos de degradação utilizando metodologia adequada e validada. Estudos adicionais, tais como: fotoestabilidade e outros que se façam pertinentes de acordo com as propriedades do produto em questão, poderão ser necessários para a comprovação da estabilidade de produtos farmacêuticos (ANVISA, 2004b).

De fato, a aplicação de alguns princípios físico-químicos no desenvolvimento de estudos de estabilidade tem provado ser muito vantajosa no desenvolvimento de formas farmacêuticas estáveis. Só através do uso desta metodologia é possível extrapolar os resultados obtidos a partir das condições de armazenamento exageradas com o intuito de prever a estabilidade para períodos de tempo prolongado de armazenamento em prateleira.

As reações de degradação em medicamentos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química, podendo ser aceleradas pelo aumento, por exemplo, da temperatura (NUDELMAN, 1976). Estas reações, dependem de várias condições, tais como, a concentração dos reagentes, da temperatura, do pH, da radiação ou da presença de catalisadores, além de estarem relacionados, muitas vezes, ao próprio produto como as propriedades físico-químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (LACHMAN *et al.*, 2001; ANVISA, 2004b).

A maioria dos métodos de estudo de estabilidade acelerada fundamenta-se na medida da velocidade de degradação a temperaturas superiores que a normal, para logo fazer inferências do que aconteceria a temperatura ambiente. Estão embasados em princípios físico-químicos e para tanto se torna necessário conhecimentos básicos em cinética química a fim de poder interpretar os resultados (NUDELMAN, 1976).

Atualmente uma das exigências para o registro de medicamentos fitoterápicos é o prazo de validade dos mesmos, onde devem constar resultados do estudo de estabilidade acelerada acompanhados dos estudos de estabilidade de longa duração em andamento ou já concluídos (ANVISA, 2004a).

A zona climática é um dos fatores que deve ser observado no momento de se realizar o teste de estabilidade, pois o tempo de conservação de um fármaco deve ser estabelecido levando-se em consideração a região em que um produto encontra-se disponível para a comercialização (WHO, 1996). Quatro diferentes zonas climáticas são especificadas pela Organização Mundial de Saúde e estão descritas na tabela 1 (WHO,1996). Entende-se por zona climática o espaço ou zona geograficamente delimitada de acordo com os critérios de temperatura e umidade aplicável quando da realização de estudos de estabilidade. O Brasil se situa na zona climática IV (quente/úmida) (ANVISA, 2004b).

Tabela 1 – Zonas climáticas e critérios de temperatura e umidade.

Zona	Descrição	Temperatura	Umidade Relativa (U.R)
I	Clima Temperado	21 °C +/- 2°C	45% +/- 5%
II	Mediterrâneo	25 °C +/- 2°C	60% +/- 5%
III	Quente e Seco	30 °C +/- 2°C	35% +/- 5%
IV	Quente e Úmido	30 °C +/- 2°C	70% +/- 5%

Os testes para o estudo de estabilidade acelerada devem ser conduzidos para a zona IV nas condições de temperatura de 40°C +/- 2°C e 75% +/- 5% de umidade relativa (U. R.) em 6 meses e como alternativa 50°C +/- 2°C e 90% +/- 5% em 3 meses (ANVISA, 2004b).

4- Materiais

Balança analítica Quimis 500L 210C.

Balança analítica Tecnal B TEC – 210A

Câmara Climática Marconi MA 385/UR

Coluna Phenomenex Luna 5 µm C18 (250 x 4,60 mm)

Coluna Phenomenex Luna fenil-hexil 5 µm (250 x 4,6 mm)

Coluna Phenomenex Luna 10µm C18 (250 x 4,6 mm)

Evaporador Rotativo TE - 210

Filtro Millipor Millex – HV Hydrodhilic PVDF 0,45 µm

Moinho tipo Willye TE – 650

Refrigerador Consul CRA 34CBANA

Ultrassom Ultracleaner 1400 Unique

Solventes:

Metanol Merck grau HPLC

Acetonitrila Merck grau HPLC

Clorofórmio Synth PA

Ácido acético Merck PA

Cromatógrafos:

Waters Alliance, 2695 Separations Module, 2998 PDA Detector, equipamento pertencente à empresa Grupo Centroflora, onde foram realizados os experimentos para estabelecimento do método cromatográfico, análises de pureza, validação de método e estudos de estabilidade.

Varian Prep. Star Solvent Delivery Module – model SD-1, Pro Star UV-Vis Detector – model 320, equipamento pertencente ao Instituto de Química de Araraquara, o qual foi utilizado para o fracionamento do extrato.

Varian Pro Star Solvent Delivery Module – model 240, Pro Star PDA Detector – model 330, equipamento pertencente ao Instituto de Química de Araraquara, no qual foram realizadas as análises das subfrações obtidas do fracionamento em CLAE-preparativo.

Equipamento para análise térmica:

TA Instruments SDT 2960 Simultaneous DTA – TGA

CLAE-EM: CLAE Simadzu®, bomba LC-20AD, detector de DAD SPD-M20A, sistema de controle CBM-20A, desgaseificador DGU-20A-5, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados LC solution. **Espectrômetro de Massas** Bruker Daltonics Billerica, MA, EUA, ultrOTOFG - ESI-TOF Mass Spectrometer, detecção no modo negativo, calibração interna e externa com Na-TFA, Bomba de Infusão, Fluxo 300µl/h.

Espectrômetros de ressonância magnética nuclear:

- Espectrômetro Varian® INOVA 11,4 T operando a 500 MHz para ¹H e a 125 MHz para ¹³C.

Material Vegetal:

Trichilia catigua foi fornecida pela empresa Anidro do Brasil Extrações Ltda, adquirida na região norte da Bahia. O material vegetal foi identificado pelo Prof. Dr. Fernando de Oliveira.

5 - Métodos

5.1- Isolamento e caracterização estrutural das substâncias químicas majoritárias

5.1.1 – Objetivos específicos

- A) Estabelecer uma condição cromatográfica para análise e fracionamento do extrato de cascas de catuaba.
- B) Preparar extrato de catuaba para fracionamento em CLAE-preparativo.
- C) Fracionamento em CLAE-preparativo – isolamento das substâncias majoritárias.
- D) Identificar as substâncias isoladas empregando-se técnicas espectroscópicas.
- E) Definir a pureza das substâncias isoladas.

5.1.2– CLAE – analítico

Para o estabelecimento de uma condição cromatográfica em CLAE, trituraram-se 200 g de cascas de catuaba em moinho, pesaram-se 2 g em balança analítica, adicionaram-se 30 mL de solução hidroalcolica (H₂O:EtOH 1:1 v/v) e submeteram-se à extração por sonicação em banho de ultrassom por 2 horas.

As análises em CLAE iniciais foram realizadas em coluna Phenomenex Luna C18 5um (250 x 4,6 mm), utilizando-se um gradiente exploratório para investigação da amostra. Depois, algumas condições foram avaliadas para o estabelecimento de uma condição cromatográfica em CLAE-analítico visando à definição de um método para o isolamento das substâncias majoritárias e para quantificação das mesmas em extratos de catuaba. Os parâmetros e condições cromatográficas estão descritos nas tabelas 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2: Parâmetros cromatográficos utilizados na análise por CLAE-analítico

PARÂMETRO	DESCRIÇÃO
Cromatógrafo	Waters Alliance 2695 Separations Module
Detector	Waters 2998 Photodiode Array Detector
Coluna	Phenomenex Luna 5 µm C18 (250 x 4,60 mm)
Modo de Eluição	Isocrático e Gradiente
Fase móvel	A - Água C – CH ₃ COOH (0,1%) em H ₂ O B – Metanol D - Acetonitrila
Fluxo	1,0 mL/mim
Comprimento de onda	254 nm
Volume de injeção	20 µL

Tabela 3: Condições cromatográficas avaliadas

Isocrático 01		Gradiente 01 (exploratório)			Gradiente 02			Gradiente 03		
A(%)	B(%)	t(min)	A(%)	B(%)	t(min)	A(%)	B(%)	t(min)	A(%)	B(%)
70	30	0	95	05	0	85	15	0	80	20
		30	0	100	45	50	50	45	30	70
					48	0	100	48	0	100
					50	0	100	50	0	100
Isocrático 02		Gradiente 04								
A(%)	D(%)	t(min)	C(%)	B(%)						
80	20	0	85	15						
		45	40	60						
		48	0	100						
		60	0	100						
		65	85	15						

5.1.3 – Preparo do extrato clorofórmico

O preparo da amostra para fracionamento foi realizado conforme descrito na figura 6, este procedimento foi realizado para 100g (em 5 vezes de 20g cada) de cascas de catuaba, método baseado em PIZZOLATTI, 2002, modificado por De Luca (informação verbal)¹.

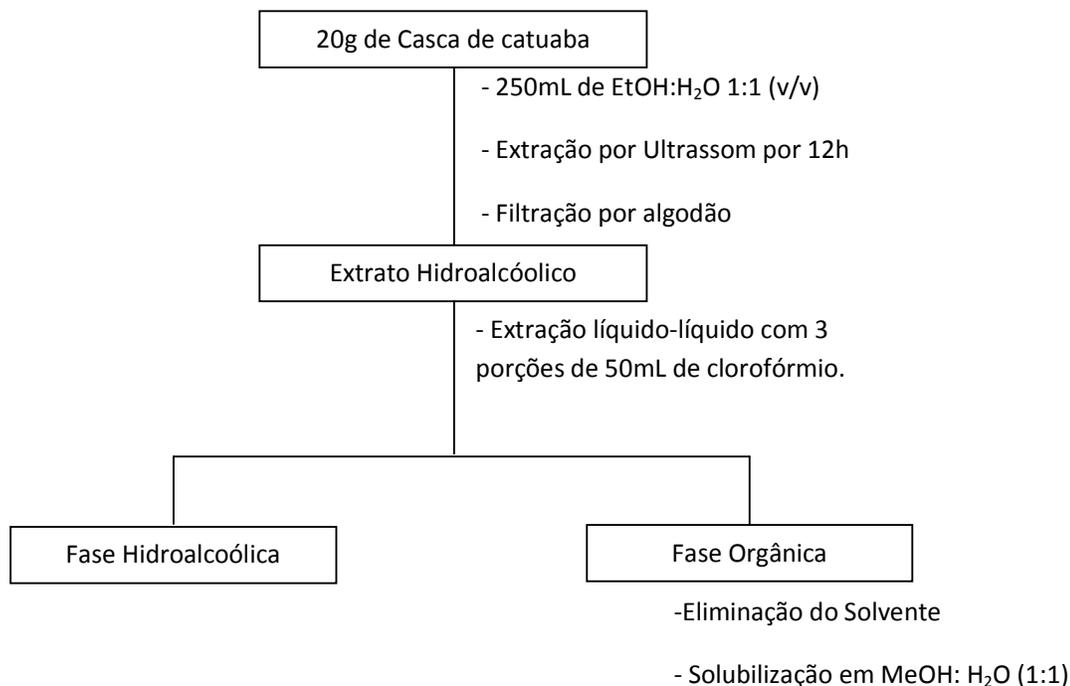


Figura 6: Sequência experimental para elaboração do extrato clorofórmico de catuaba.

5.1.4– CLAE – preparativo

Depois de definida uma condição em CLAE modo analítico, foi realizado um fracionamento do extrato clorofórmico de catuaba em CLAE modo preparativo. Os parâmetros utilizados estão apresentados na tabela 4 e a condição cromatográfica na tabela 5.

¹Informação fornecida por DE LUCA, A. N., no Instituto de Química/UNESP em janeiro de 2009.

Tabela 4: Parâmetros cromatográficos para análise em CLAE-preparativo da fase clorofórmica do extrato hidroalcoólico de catuaba.

PARÂMETRO	DESCRIÇÃO
Cromatógrafo	Varian Prep Star Solvent Delivery – model SD1
Detector	Varian Pro Star UV/Vis – model 320
Coluna	Phenomenex Luna 10 µm C18 (250 x 21,20 mm)
Modo de Eluição	Gradiente
Fase móvel	A – CH ₃ COOH (0,1%) em H ₂ O B - Metanol
Fluxo	20 mL/mim
Comprimento de onda	254 nm
Volume de injeção	1,5 mL

Tabela 5: Condição cromatográfica utilizada para fracionamento em CLAE-preparativo.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	85	15
45	40	60
48	0	100
65	0	100
68	85	15

5.1.5 – Análise das subfrações

As subfrações obtidas no fracionamento do extrato clorofórmico de catuaba foram analisadas em CLAE – analítico (Varian Pro Star Solvente Delivery Module – model 240, PDA Pro star detector – model 330), foram concentradas em rotaevaporador e posteriormente pesadas em balança analítica. A condição

cromatográfica utilizada para a análise das subfrações obtidas está descritas na tabela 3 – gradiente 04.

5.1.6 – Identificação das substâncias isoladas

Para a identificação das substâncias isoladas, foram realizados experimentos espectrométricos de massa, RMN ^1H , RMN ^{13}C , NOESY e TOCSY.

5.1.7 – Análise de Pureza

A análise de pureza das substâncias isoladas foi realizada por CLAE e análise térmica.

5.1.7.1 – CLAE

A determinação da pureza das substâncias foi realizada por CLAE-DAD, foi determinada a pureza cromatográfica relativa pelo método de normalização de área.

Para cada substância isolada foram obtidos cromatogramas em CLAE-DAD utilizando a condição descrita na tabela 3 para o gradiente 04, em duas colunas cromatográficas com fases estacionárias de seletividades diferentes. As colunas utilizadas foram Phenomenex Luna 5 μm , C18 (250 x 4,6mm) e Phenomenex fenil-hexil 5 μm (250 x 4,6mm).

5.1.7.2 – Análise Térmica

As curvas TG, DTA, DTG foram obtidas utilizando aproximadamente 3,0 mg da cinchonaína A e 1,5 mg da cinchonaína B, em cadinho de alumina, razão de aquecimento de 20 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ e atmosfera de ar estático.

5.2 – Otimização das condições de extração e validação de método por CLAE

5.2.1 – Objetivos Específicos

- A) Otimizar as condições de extração (proporção de solvente, tempo, temperatura e proporção droga/solvente) das cascas de catuaba para a produção de extrato seco de catuaba, bem como o preparo das amostras para análise quali e quantitativa.
- B) Validar a metodologia analítica para determinação qualitativa e quantitativa dos marcadores cinchonaína A e cinchonaína B em planta e em extrato de catuaba.

5.2.2 – Otimização da extração

Para a otimização das condições de extração das cascas de catuaba, visando obtenção de extrato enriquecido em cinchonaína A e B, foram definidas algumas variáveis (tempo, temperatura, porcentagem de etanol, e relação droga/solvente), os experimentos realizados foram pré estabelecidos por planejamento experimental fatorial 2^3 utilizando o software Statistic. Os experimentos realizados estão descritos na tabela 6.

Tabela 6: Experimentos realizados para otimização das condições de preparação do extrato de cascas de catuaba.

Experimento	T *(°C)	t** (min)	%EtOH***	D/S****
1	40	30	30	2/15
2	80	30	30	2/25
3	40	30	70	2/25
4	80	30	70	2/15
5	40	90	30	2/25
6	80	90	30	2/15
7	40	90	70	2/15
8	80	90	70	2/25
9	60	60	50	2/20
10	60	60	50	2/20
11	60	60	50	2/20
12	60	60	20	2/20
13	60	60	100	2/20

*Temperatura (°C)

**Tempo (min)

*** Porcentagem de etanol (%)

****Proporção droga/solvente (g.mL⁻¹)

A condição cromatográfica utilizada para as análises dos extratos obtidos nas várias condições do planejamento experimental está descrita na tabela 3 (gradiente 04).

5.2.3 - Validação de método por CLAE para determinação de cinchonaína A e cinchonaína B em extratos de catuaba

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos

resultados. Para tanto deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção e de quantificação e exatidão adequados à análise.

Deve-se utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopéia Brasileira ou, na ausência destas, por outros códigos autorizados pela legislação vigente. No caso da inexistência dessas substâncias, será admitido o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e obtenção sejam devidamente comprovados.

No caso de metodologias analíticas não descritas em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros relacionados a seguir (ANVISA, 2003).

5.2.3.1 – Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz

Em métodos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas), é interessante para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (ANVISA 2003).

Neste estudo foi efetuada a monitoração do grau de pureza dos analitos por detectores específicos, como o detector ultravioleta com arranjo de diodos (DAD). Para isto, foi preparada uma solução padrão de cinchonaína A e B; pesaram-se cerca de 2 mg de cada substância que foram transferidas para balão de 05 mL completando o volume com MeOH:H₂O 1:1 (v/v) e uma amostra de casca de catuaba, que foi preparada da seguinte maneira: pesaram-se 2 g da casca seca e moída, adicionaram-se 20 mL de uma solução EtOH:H₂O 1:1 (v/v) e submeteu-se a extração em refluxo a 60°C por 1 hora, após este período filtrou-se por algodão para

balão volumétrico de 25 mL completando o volume com a mesma solução (este preparo é utilizado para todos os ensaios de validação).

A solução padrão e a amostra foram monitoradas por CLAE-DAD.

5.2.3.2 – Intervalo

O intervalo especificado é a faixa de trabalho, normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. Para determinação quantitativa de analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas o alcance do intervalo é de 80% a 120% da concentração teórica do teste (ANVISA 2003).

Para a análise do teor de cinchonaína A e B nas cascas de catuaba, foi definida a faixa de 80% a 120% das concentrações encontradas para cinchonaínas A e B na planta.

5.2.3.3 – Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes (em triplicata). Estas concentrações devem seguir o intervalo adequado ao tipo de análise (ANVISA 2003).

A curva analítica para cinchonaína A e B foi obtida em cinco níveis de concentração, cada uma delas foi aplicada em triplicata. O parâmetro linear (r^2) mínimo aceitável deve ser de 0,99 e o intervalo da curva deve compreender de 80 a 120% da concentração esperada de princípio ativo nas amostras.

As concentrações dos padrões utilizadas para obtenção da curva analítica estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 7: Valores de concentração dos padrões de cinchonaína A e B utilizados para a preparação da curva analítica.

	1º nível (mg.L ⁻¹)	2º nível (mg.L ⁻¹)	3º nível (mg.L ⁻¹)	4º nível (mg.L ⁻¹)	5º nível (mg.L ⁻¹)
A	573,15	506,41	461,50	390,50	341,78
B	574,18	516,76	459,35	401,93	344,51

5.2.3.4 – Limite de detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob condições experimentais estabelecidas.

O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável.

No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na quantidade de substância necessária para produzir um sinal 3 vezes maior que o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela equação 1, em que DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

$$LD = \frac{DP_a \cdot 3}{IC} \quad \text{Eq. 1}$$

Este desvio pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco. IC é a inclinação da curva de calibração.

Neste estudo, a determinação do limite de detecção foi realizada pela razão sinal/ruído da linha de base. Foi medida a intensidade do ruído e multiplicado este valor por três para encontrar a intensidade mínima que deve apresentar os picos correspondentes às cinchonaínas A e B. Foi determinado como limite de detecção a concentração para cinchonaínas A e B que apresentaram este valor de intensidade.

5.2.3.5 – Limite de quantificação

Limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser determinado pela equação 2, em que DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação.

$$LD = \frac{DPa \cdot 10}{IC} \quad \text{Eq. 2}$$

Este desvio pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

Também pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1 (ANVISA 2003).

Determinou-se o limite de quantificação pela razão de dez vezes o ruído da linha de base. Foi medida a intensidade do ruído e multiplicado este valor por dez para encontrar a intensidade mínima que deve apresentar os picos correspondentes as cinchonaínas A e B. Foi determinado como limite de quantificação a concentração para cinchonaínas A e B que apresentaram este valor de intensidade.

5.2.3.6 – Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Algumas metodologias para a determinação da exatidão são disponíveis. Para formas farmacêuticas, o teste pode ser efetuado realizando-se análises de

amostras, nas quais a quantidade conhecida de fármaco é adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado). Nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, se aceita a análise pelo método de adição de padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.

Deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do método, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra. E é expressa pela equação 3; (ANVISA, 2003).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 3}$$

Foram preparadas três amostras de extrato de casca de catuaba e fortificadas com diferentes concentrações de cinchonaína A e B em concentrações pré determinadas como baixa média e alta. A exatidão foi expressa por meio do desvio padrão relativo (DPR) e o seu valor máximo aceitável é de 5%.

5.2.3.7 – Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis:

- Repetibilidade (precisão intra-corridas): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com mesmo analista e mesma instrumentação. É verificada por, no mínimo 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações, baixa média e alta, com 3 réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração teste (ANVISA, 2003).

Neste estudo foi verificada com três concentrações diferentes para a concentração baixa, pesaram-se 1,6036 g de casca de catuaba, aproximadamente 80% da concentração determinada no método (2 g), para a concentração média,

pesaram-se 2,0010 g e para a concentração alta pesaram-se 2,4032 g, isto é, aproximadamente 120% da concentração determinada. Cada uma delas foi analisada em triplicata. A repetibilidade foi expressa como sendo o desvio padrão relativo (DPR) (Equação 4), tendo como valor máximo aceitável 5%.

$$DPR = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Conc.média experimental}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 4}$$

- Precisão Intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (ANVISA, 2003).

As análises foram realizadas com a concentração média, aplicadas em triplicata. Realizou-se a mesma análise em dois dias distintos em mesmo equipamento (Waters Alliance, 2695 Separations Module, 2998 PDA Detector) e em mesmo laboratório (laboratório de desenvolvimento e controle de qualidade do Grupo Centroflora).

Avaliou-se também a influência do analista, para isto, dois analistas diferentes realizaram análises na concentração média da planta em um mesmo dia.

Os resultados são expressos como sendo o desvio padrão relativo (DPR), sendo seu valor máximo aceitável de 5%.

- Reprodutibilidade: expressa a precisão entre laboratórios diferentes e é testada através de estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão do registro e não foram realizados neste trabalho (ANVISA, 2003).

5.2.3.8 – Robustez

A robustez de um método analítico é a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica a sua confiança durante o uso normal.

Durante o desenvolvimento da metodologia deve-se avaliar a robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

Em análises por cromatografia, alguns fatores que devem ser considerados na determinação da robustez são listados a seguir:

- Variação do pH da fase móvel;
- Variação na composição da fase móvel;
- Diferentes lotes ou fabricantes de colunas;
- Temperatura;
- Vazão da fase móvel (ANVISA 2003).

São descritas a seguir cada uma das alterações realizadas.

1) Vazão da Fase Móvel

Foram avaliadas três vazões diferentes na análise de robustez do método, sendo uma delas a vazão utilizada na metodologia em estudo ($0,9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $1,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Os resultados quantitativos e qualitativos são avaliados levando-se em conta o DPR que não deve exceder 5%

2) Variação no gradiente

Foram realizadas pequenas alterações no gradiente cromatográfico utilizado no método, foram avaliadas as alterações descritas na tabela 8. Para a comparação dos resultados, foi realizada também uma análise de acordo com o gradiente determinado no método.

Tabela 8: Gradiente cromatográfico utilizado no método e alterações para realização dos testes de robustez do método.

Método			Alteração 01			Alteração 02		
t (min)	A (%)	B (%)	t (min)	A(%)	B(%)	t (min)	A (%)	B (%)
0	85	15	0	85	15	0	85	15
45	40	60	45	39	61	45	41	59
48	0	100	48	0	100	48	0	100
60	0	100	60	0	100	60	0	100
65	85	15	65	85	15	65	85	15

3) Coluna

Foi preparada uma amostra na condição média (2 g de casca de catuaba), que foi analisada em duas colunas Luna Phenomenex C18, 5 µm de lotes diferentes.

5.3 - Estudo de estabilidade

5.3.1 – Objetivos Específicos

- A) Avaliar a estabilidade química acelerada das cinchonaínas A e B.
- B) Avaliar a estabilidade das cinchonaínas A e B em solução e do extrato hidroalcolólico de cascas de catuaba.
- C) Caracterizar o produto de degradação.

5.3.2 – Estudo da estabilidade acelerada

Para avaliação da estabilidade acelerada dos compostos isolados em CLAE – preparativo, quantidades suficientes de cinchonaína A e cinchonaína B foram mantidas em câmara climática por seis meses. As condições preconizadas para este tipo de estudo, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – resolução de nº 398 de 2004, são temperatura de 40°C +/- 2°C e 75% +/- 5% de

umidade relativa (U. R.). As análises de ambos os padrões foram realizadas no tempo zero e mensalmente por 6 meses .

Para as análises em CLAE, nos tempos determinados, pesaram-se cerca de 2,0 mg de cada um dos padrões (mantidos em câmara climática) em balões volumétricos de 5 mL (separadamente), adicionaram-se solução de MeOH:H₂O 1:1 (v/v) até o menisco e foram colocados em banho-ultrassônico por 1 minuto. Filtrou-se por membrana filtrante 0,45 µm e submeteu-se à análise por CLAE.

A condição cromatográfica validada, utilizada para as análises do estudo de estabilidade, está descrita na tabela 3, gradiente 04.

5.3.3 - Avaliação da estabilidade das cinchonaínas A e B em solução e do extrato hidroalcólico de catuaba

Durante os experimentos anteriores, foi observada a mudança de coloração das amostras de cinchonaína A e B quando estas eram solubilizadas e deixadas em repouso de um dia para o outro. Por isso, tornou-se interessante o estudo de estabilidade desses compostos também em solução.

Para este estudo, prepararam-se duas amostras de cinchonaína A e duas amostras de cinchonaína B. Uma das amostras de cada composto foi preparada de acordo com o descrito anteriormente no teste de estabilidade acelerada, alíquotas de cada amostra foram divididas em 3 vials transparentes e 1 âmbar. A outra amostra foi também preparada da mesma forma, porém a solução diluente foi acidificada com ácido acético para pH-3,0, sendo que cada amostra foi transferida para um vial transparente.

Para análise do extrato hidroalcólico, pesaram-se 2 g de cascas de catuaba, adicionaram-se 20 mL de solução EtOH:H₂O 1:1 (v/v), e procedeu-se à extração por refluxo a 60°C por 1 hora, filtrou-se o extrato por algodão para balão de 25 mL e completou-se o volume com a solução EtOH:H₂O 1:1 (v/v). Filtrou-se por membrana 45µm para 3 vials transparentes e um âmbar. Foi ajustado o pH da solução restante para 3 com ácido acético e transferiu-se para mais um vial transparente.

Depois de preparadas, as amostras foram submetidas a diferentes condições experimentais, conforme tabela 9.

Tabela 9 - Condições experimentais a que as soluções padrões e o extrato hidroalcoólico foram submetidas para realização do estudo de estabilidade em solução.

Condição	T* (°C)	U.R** (%)	Luz	pH
A	8	45	S***	6,20
B	25	55	S	6,20
C	25	55	N****	6,20
D	25	55	S	3,00
E	40	75	S	6,20

*Temperatura

**Umidade relativa

***Exposto a luz

****Protegido da luz

A condição cromatográfica validada para as análises de estabilidade está apresentada na tabela 3 – gradiente 04.

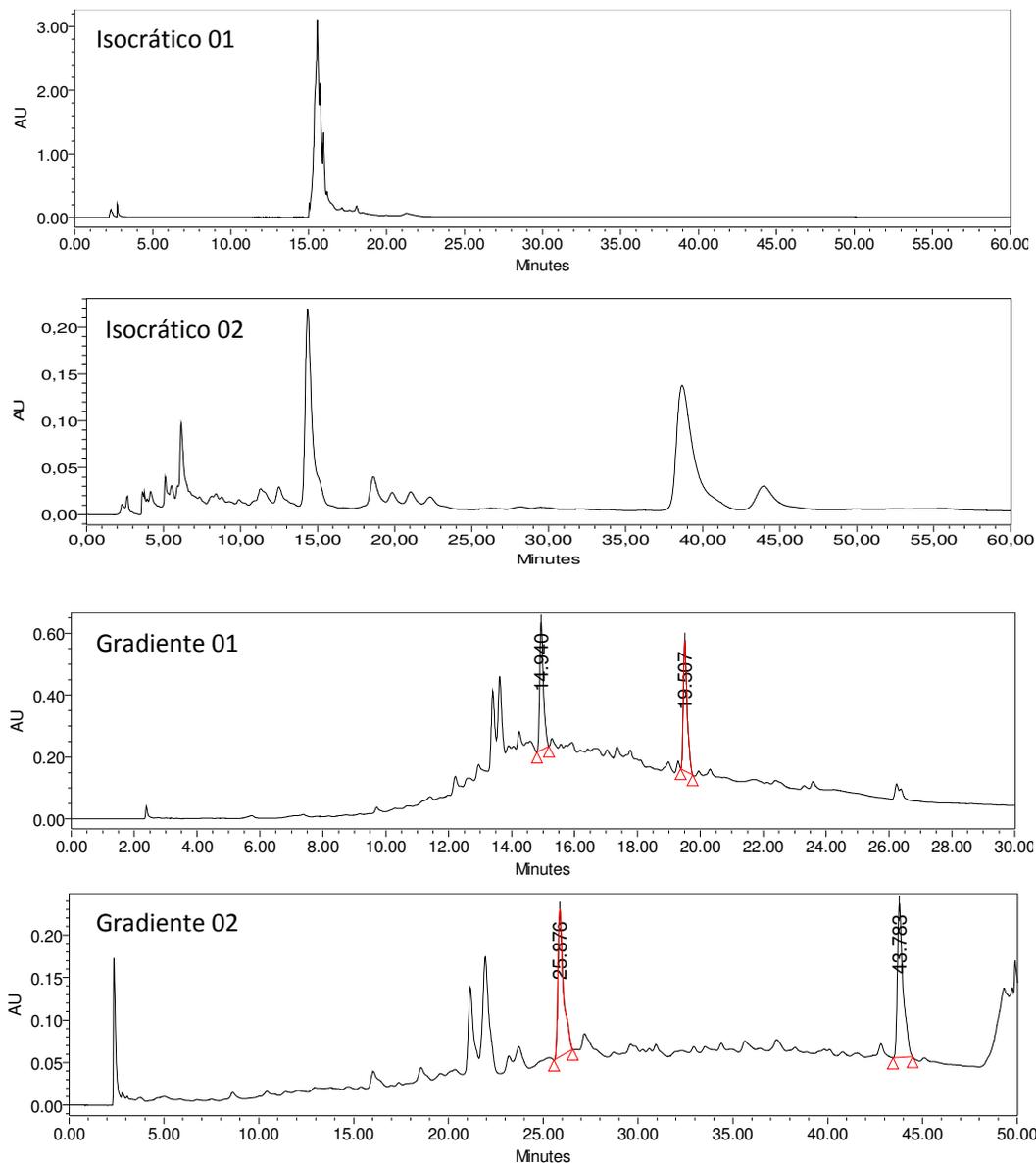
5.3.4 – Caracterização do composto de degradação das cinchonaínas

As soluções de cinchonaína A e B mantidas em câmara climática, após o período de 30 dias, foram evaporadas até a secura. As amostras secas foram analisadas por CLAE- DAD – EM

6 – Resultados

6.1 – CLAE – analítico

Algumas condições cromatográficas foram avaliadas para o estabelecimento de uma condição em CLAE-analítico visando o isolamento e quantificação das substâncias majoritárias. Os cromatogramas obtidos para cada condição avaliada estão apresentados na figura 7.



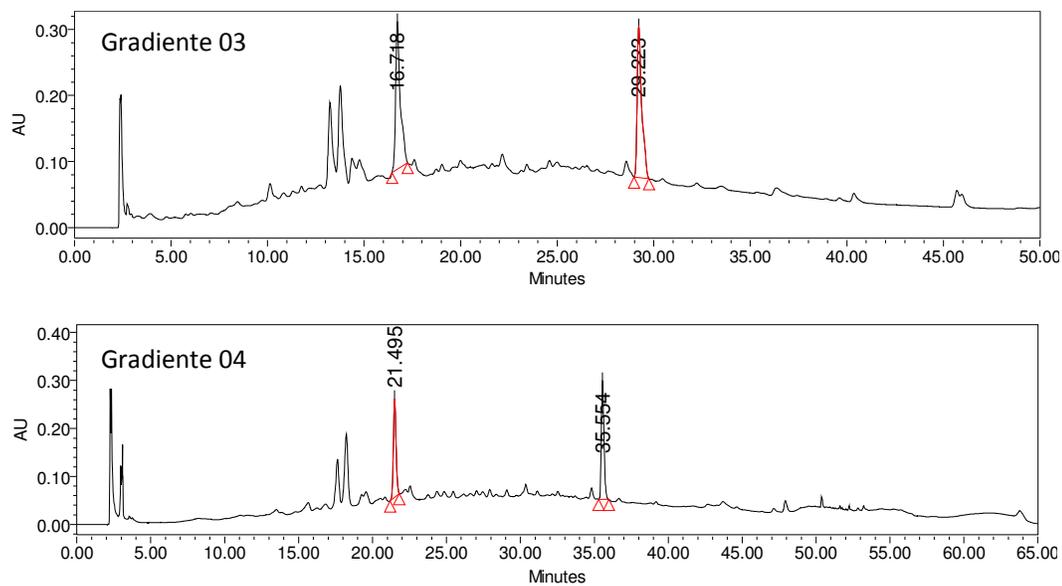


Figura 7: Cromatogramas obtidos nos estudos preliminares das condições cromatográficas em $\lambda = 254 \text{ nm}$, os picos assinalados correspondem às cinchonaínas A e B.

O gradiente 04 foi selecionado para o fracionamento do extrato por CLAE-preparativo e para a quantificação das substâncias majoritárias, uma vez que apresentou melhor resolução para os dois componentes majoritários do extrato.

6.2 – Fracionamento em CLAE - Preparativo

Após definida a condição cromatográfica em CLAE-analítico, realizou-se o fracionamento da fase clorofórmica do extrato hidroalcolólico. O cromatograma preparativo é apresentado na figura 8.

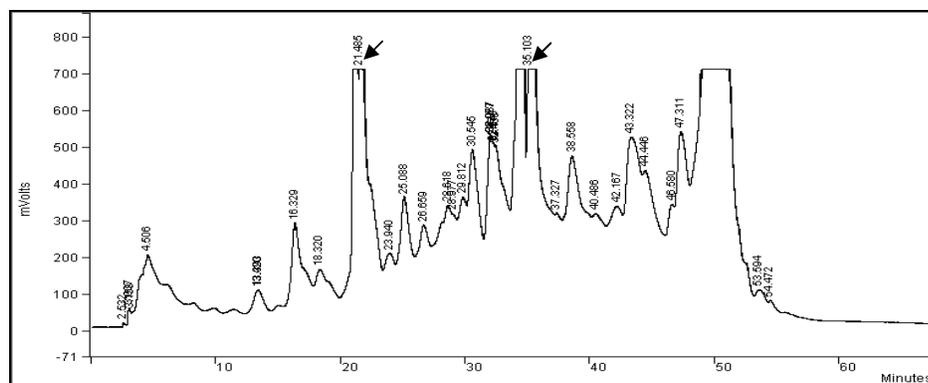


Figura 8 – Cromatograma preparativo do extrato clorofórmico de catuaba em $\lambda = 254 \text{ nm}$; as setas representam os picos de cinchonaína A e B isolados.

6.3 – Análise das subfrações

As subfrações obtidas foram analisadas por CLAE-analítico. Os cromatogramas das subfrações e da fase clorofórmica estão apresentados na figura 9. As massas obtidas de cada subfração estão apresentadas na tabela 10.

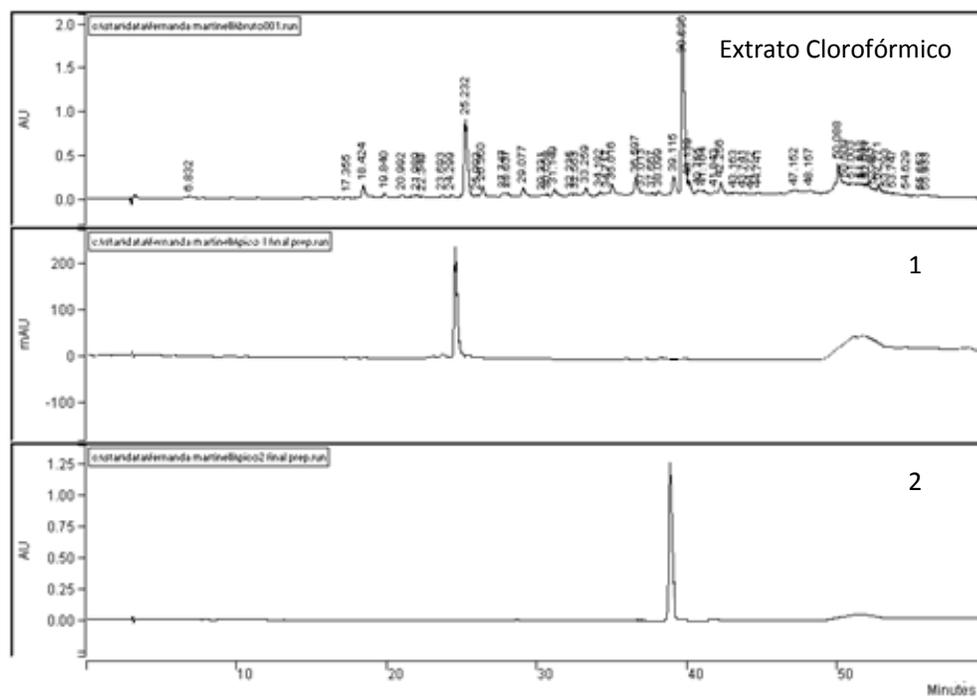


Figura 9: Cromatogramas da fase clorofórmica e das subfrações 1 e 2, respectivamente, $\lambda = 254$ nm.

Tabela 10 – Massas das subfrações obtidas do fracionamento em CLAE-preparativo

SUBFRAÇÃO	MASSA (mg)
1	107,3
2	176,9

6.4 – Identificação dos compostos isolados

A identificação das substâncias isoladas nas subfrações 1 e 2 da fase clorofórmica do extrato hidroalcolico das cascas de catuaba foi efetuada baseando-se na análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , NOESY, TOCSY e EM de alta resolução e pela comparação com dados de RMN de cinchonaínas encontrados na literatura (TANG *et al.*, 2007; PIZZOLATTI *et al.*, 2002; CHEN, *et al.*, 1992).

A análise das subfrações 1 e 2 por CLAE-ESI-EM indicou $m/z = 451,1085$, que é compatível com o valor calculado 474,0983 para o aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ para essas substâncias, confirmando a fórmula molecular das cinchonaínas como $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{O}_9$. As atribuições completas dos deslocamentos químicos para cinchonaína B (subfração 1) e cinchonaína A (subfração 2) estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11: Dados de RMN das cinchonaínas B (subfração 1) e A (subfração 2), isoladas da fase clorofórmica do extrato hidroalcolico de cascas de catuaba. (MeOD, δ ppm).

	Subfração 1		Subfração 2	
N ^o C	¹³ C	¹ H - J (Hz)	¹³ C	¹ H - J (Hz)
2	79,7	4,84 (s)	80,24	4,9 (s)
3	66,6	4,26 (m)	67,2	4,21 (m)
4	28,5	2,91 (dd, J = 4,0; 17,0) 2,85 (dd, J = 3,0; 17,0)	29,3	2,87 (dd, J = 16,6; 1,9) 2,94 (dd, J = 16,6; 4,7)
4 ^a	105,2	-	106,2	-
5	157,3	-	157,3	-
6	96,3	6,21 (s)	96,4	6,22 (s)
7	152,1	-	152,1	-
8	106,1	-	105,3	-
8 ^a	153,4	-	153,5	-
1'	131,9	-	131,7	-
2'	115,0	6,98 (d, J = 1,5)	115,0	6,84 (d, J = 1,9)
3'	146,0	-	145,9	-
4'	146,3	-	146,4	-
5'	116,0	6,76 (d, J = 8,0)	116,0	6,69(d, J = 8,0)
6'	119,2	6,78 (dd, J = 8,0; 1,5)	119,3	6,62(dd, J = 8,2; 1,9)
1''	135,4	-	135,3	-
2''	115,1	6,54 (d, J = 2,5)	115,0	6,63 (d, J = 2,1)
3''	146,0	-	146,0	-
4''	146,3	-	146,3	-
5''	116,51	6,61 (d, J = 8,2)	116,6	6,70(d, J = 8,2)
6''	119,2	6,45(dd, J = 8,2; 2,5)	119,3	6,53 (dd, J = 8,0; 2,1)
7''	35,4	4,56 (dd, J = 7,0; 2,0)	35,2	4,46 (dd, J = 7,0; 1,3)
8''	38,5	3,05 (dd, J = 7,0; 15,5) 2,86 (dd, J = 15,5; 2,0)	38,3	3,0 (dd, J = 7,0; 16,0) 2,87 (d, J = 16,0)
-COO	170,7	-	170,7	-

Tabela 12 – Dados espectroscópicos de RMN (^1H , ^{13}C) para as cinchonainas A e B descritos na literatura (CD_3OD) (PIZZOLATTI *et al.*, 2002).

N ^o C	Cinchonaína A		Cinchonaína B	
	^{13}C	$^1\text{H} - J(\text{Hz})$	^{13}C	$^1\text{H} - J(\text{Hz})$
2	79,6	4,81 (br s)	80,1	4,85 (br s)
3	66,5	4,25 (m)	66,9	4,18 (m)
4	28,5	2,95 (m)	28,3	2,88 (m)
4 ^a	105,2	-	105,2	-
5	157,2	-	157,2	-
6	96,4	6,22 (s)	96,4	6,23 (s)
7	151,9	-	151,9	-
8	106,0	-	106,1	-
8 ^a	153,3	-	153,4	-
1'	129,9	-	129,9	-
2'	115,0	6,99 (d, $J = 1,9$)	114,9	6,83 (d, $J = 1,9$)
3'	146,2	-	146,3	-
4'	147,5	-	147,6	-
5'	116,0	6,77 (d, $J = 8,1$)	115,9	6,69 (d, $J = 8,1$)
6'	119,4	6,79 (dd, $J = 8,1; 1,9$)	119,2	6,61 (dd, $J = 8,1; 1,9$)
A	37,5	2,98	37,3	2,86
B	34,5	4,54 (dd, $J = 6,8; 1,4$)	34,2	4,43 (dd, $J = 6,8; 1,4$)
1''	134,3	-	133,8	-
2''	114,9	6,55 (d, $J = 2,0$)	115,4	6,63 (d, $J = 2,0$)
3''	148,8	-	148,8	-
4''	148,8	-	148,5	-
5''	116,5	6,63 (d, $J = 8,6$)	116,6	6,63 (d, $J = 8,6$)
6''	119,2	6,45 (dd, $J = 8,6; 2,0$)	119,3	6,54 (dd, $J = 8,6; 2,0$)
-COO	167,4	-	167,7	-

Tabela 13 – Dados espectroscópicos de RMN (^1H , ^{13}C) para as Cinchonáínas C e D (CD_3OD) descritos na literatura (CHEN *et al.*, 1992).

N ^o C	Cinchonaína C		Cinchonaína D	
	^{13}C	$^1\text{H} - J$ (Hz)	^{13}C	$^1\text{H} - J$ (Hz)
2	82,9	4,70 (d, $J = 8,0$)	83,1	4,68 (d, $J = 8,0$)
3	67,7	4,13 (ddd, $J = 8,0; 8,0; 5,0$)	68,0	4,09 (ddd, $J = 8,0; 8,0; 5,0$)
4	28,3	2,66 (dd, $J = 17,0; 8,0$) 3,04 (dd, $J = 17,0; 5,0$)	28,7	2,69 (dd, $J = 17,0; 8,0$) 2,95 (dd, $J = 17,0; 5,0$)
4 ^a	101,7	-	101,9	-
5	151,7	-	152,0	-
6	107	-	107,1	-
7	154,5	-	154,6	-
8	99,8	6,30 (s)	99,8	6,28 (s)
8 ^a	155,7	-	155,9	-
1'	131,7	-	132,0	-
2'	115,6	6,94 (d, $J = 2,0$)	115,4	6,92 (d, $J = 2,0$)
3'	144,9	-	145,1	-
4'	145,9	-	146,2	-
5'	116,3	6,85 (d, $J = 8,0$)	116,2	6,82 (d, $J = 8,0$)
6'	120,1	6,78 (dd, $J = 8,0; 2,0$)	120,2	6,75 (dd, $J = 8,0; 2,0$)
A	38,2	2,94 (dd, $J = 16,0; 2,0$) 3,10 (dd, $J = 16,0; 7,0$)	38,3	2,91 (dd, $J = 16,0; 2,0$) 3,06 (dd, $J = 16,0; 7,0$)
B	34,6	4,49 (dd, $J = 7,0; 2,0$)	35,1	4,49 (dd, $J = 7,0; 2,0$)
1''	134,9	-	135,2	-
2''	115,4	6,72 (d, $J = 2,0$)	115,4	6,69 (d, $J = 2,0$)
3''	146,1	-	146,3	-
4''	146,2	-	146,4	-
5''	116,5	6,74 (d, $J = 8,0$)	116,5	6,72(d, $J = 8,0$)
6''	119,0	6,46 (dd, $J = 8,0; 2,0$)	119,2	6,49 (dd, $J = 8,0; 2,0$)
-COO	169,5	-	169,0	-

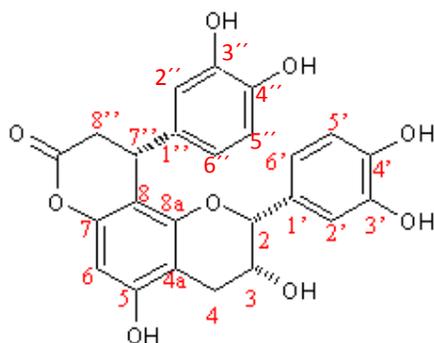


Figura 10 – Subfração 1 – Cinchonaína B.

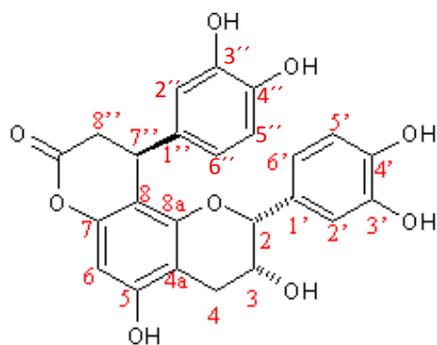


Figura 11 – Subfração 2 – cinchonaína A.



Figura 12: Aspecto das substâncias isoladas, cinchonaína A e B respectivamente.

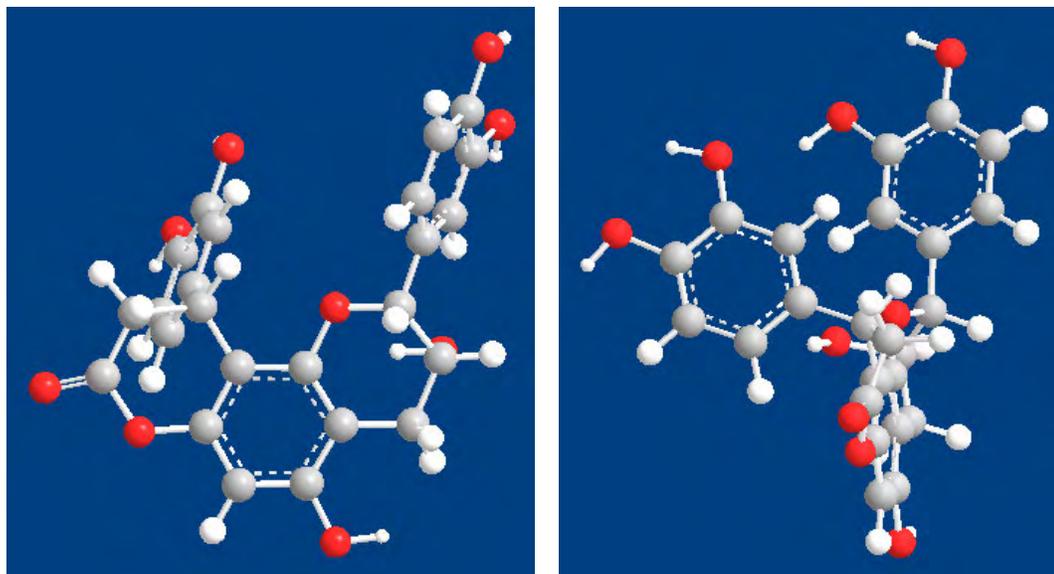


Figura 13 - Conformação de menor energia para a Cinchonina B – visão frontal e lateral.

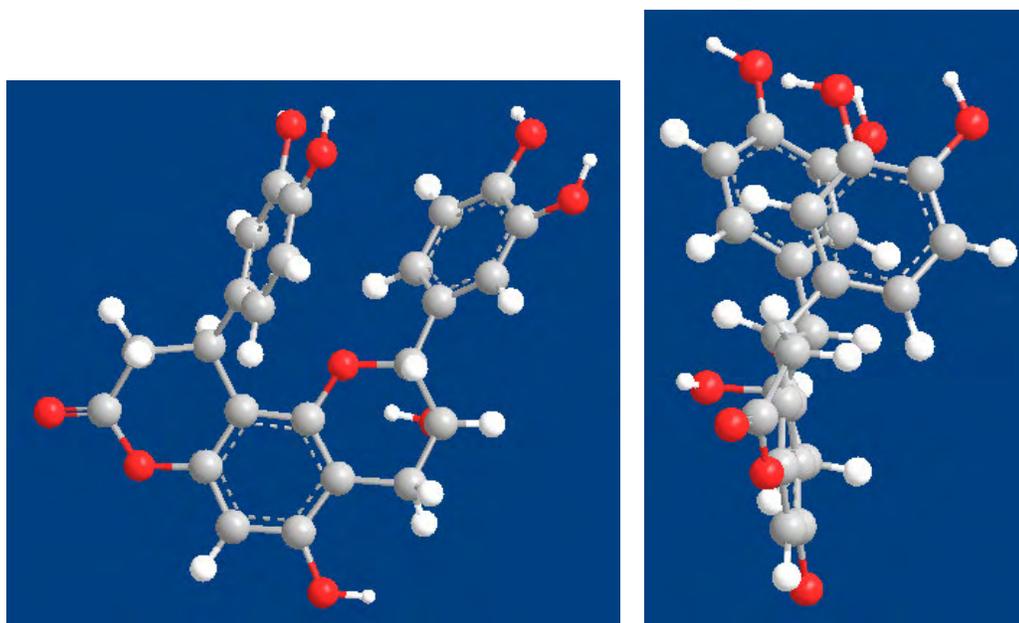


Figura 14 - Conformação de menor energia para a Cinchonina A – visão frontal e lateral.

6.5 – Análise de pureza

6.5.1 – Análise de pureza por CLAE

Os cromatogramas obtidos para as análises de pureza cromatográfica para as cinchonaínas A e B estão apresentados nas figuras 15 e 16 respectivamente.

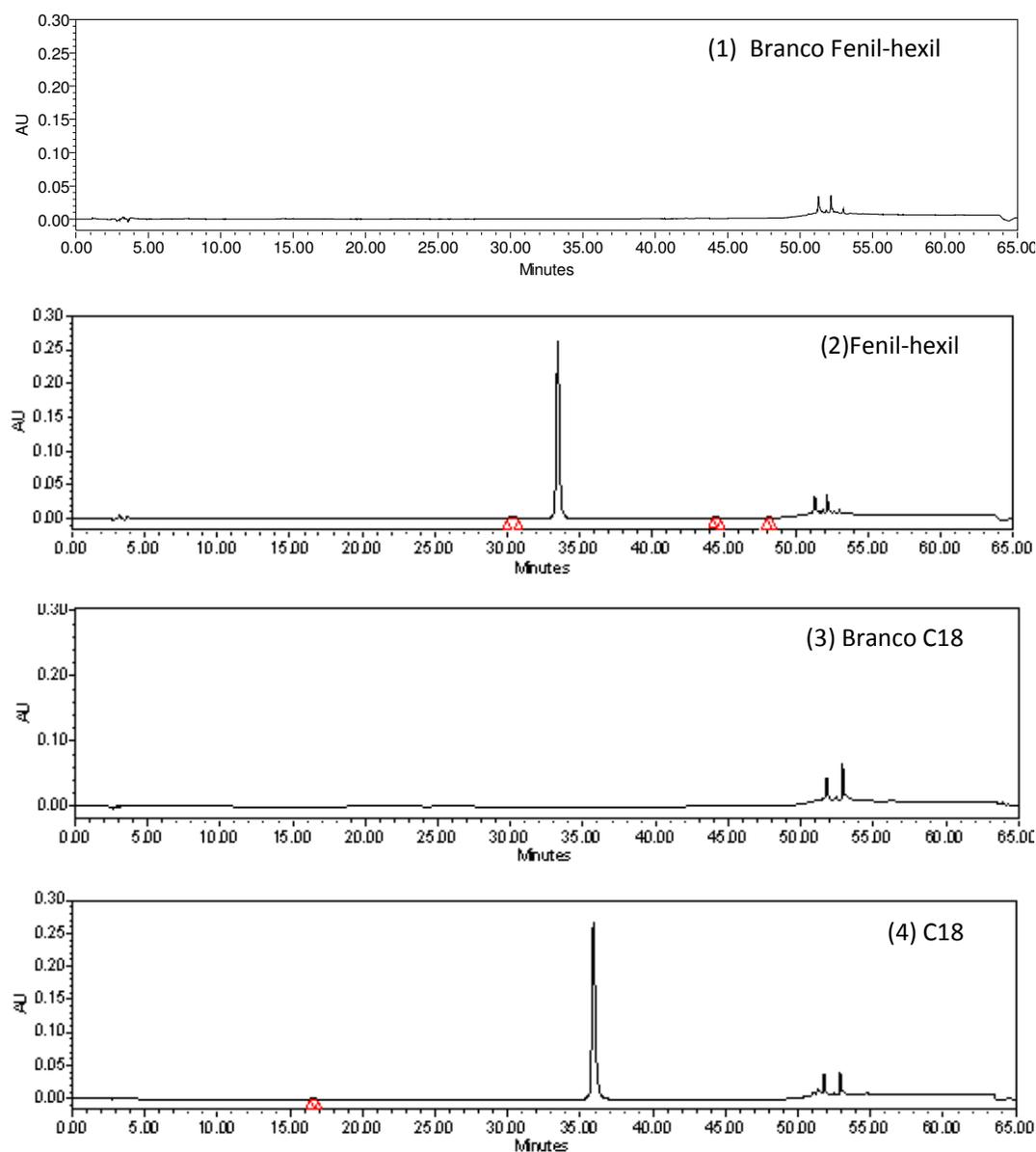


Figura 15: Cromatogramas obtidos na análise de pureza cromatográfica da cinchonaína A em coluna fenil-hexil (1 – branco e 2 – cinchonaína A) e C18 (3 – branco e 4 – cinchonaína A), $\lambda = 254$ nm.

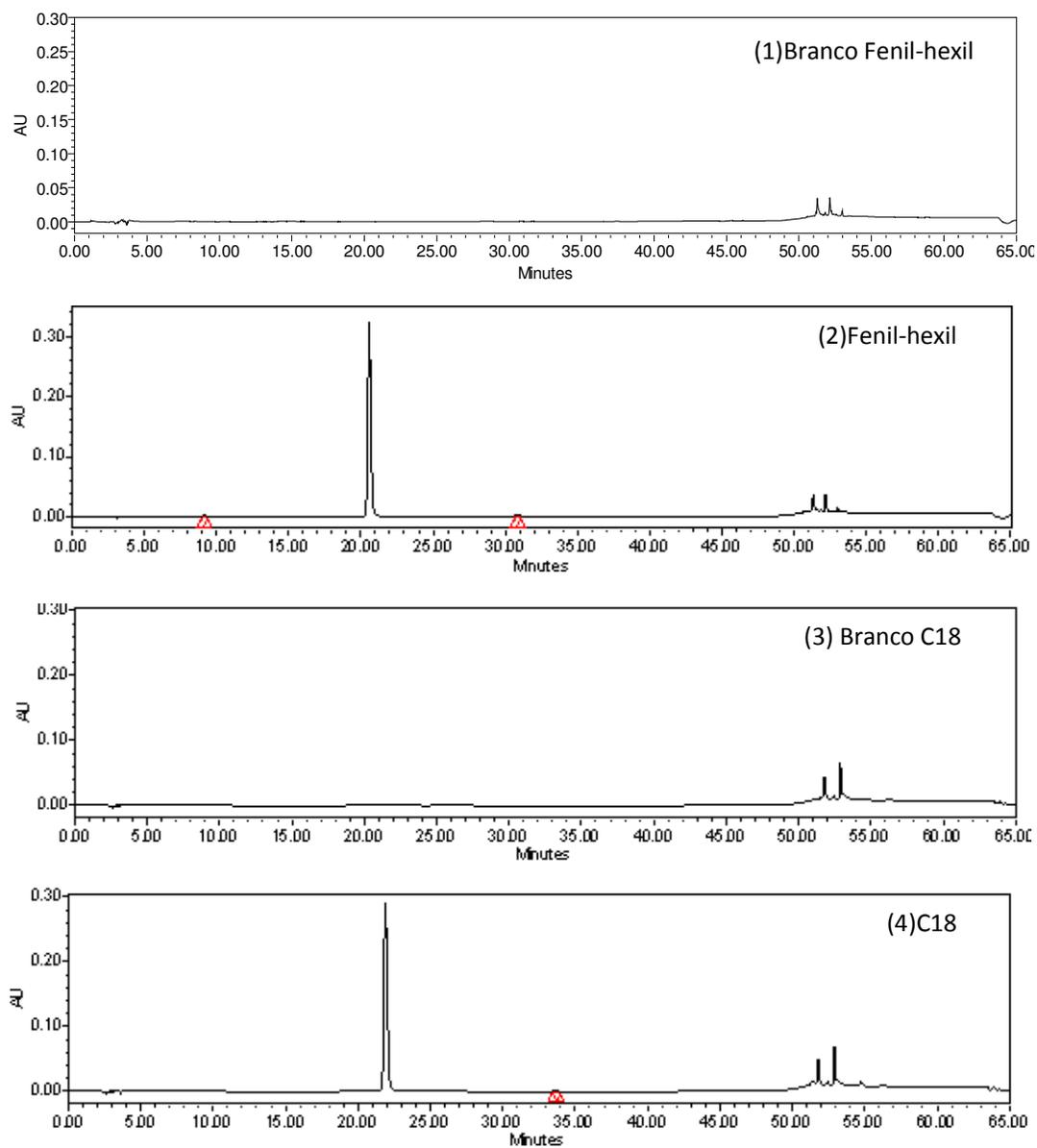


Figura 16: Cromatogramas obtidos na análise de pureza cromatográfica da cinchonaína B em coluna fenil-hexil (1 – branco e 2 – cinchonaína B) e C18 (3 – branco e 4 – cinchonaína B), $\lambda = 254$ nm.

Tabela 14: Valores de área obtidas da análise de pureza relativa por CLAE.

	Área	Área (impurezas)	Pureza (%)
Cinchonaína A	3692501	4126	99,89
Cinchonaína B	3585590	6269	99,82

6.5.2 – Análise Térmica

As curvas TG, DTG e DTA obtidas para cinchonaína A estão apresentadas nas figuras 17 e 18.

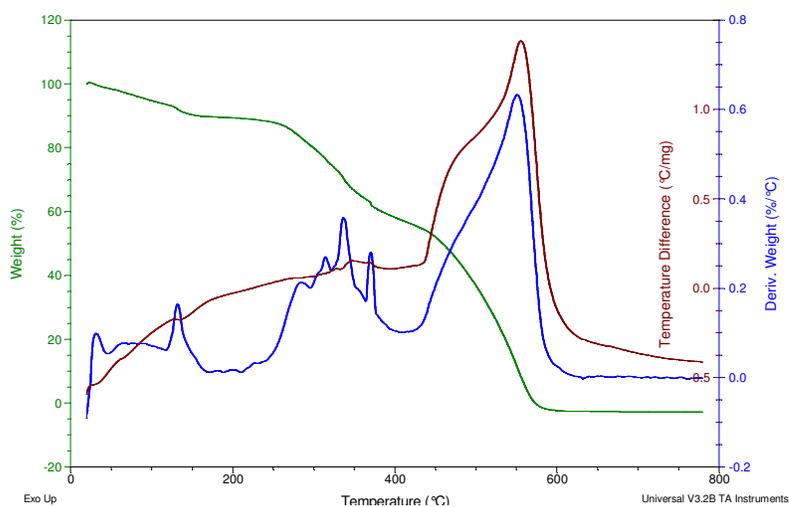


Figura 17 – Curvas da perda de massa (verde), derivada da perda de massa (azul) e diferença de temperatura (vermelha) para cinchonaína A.

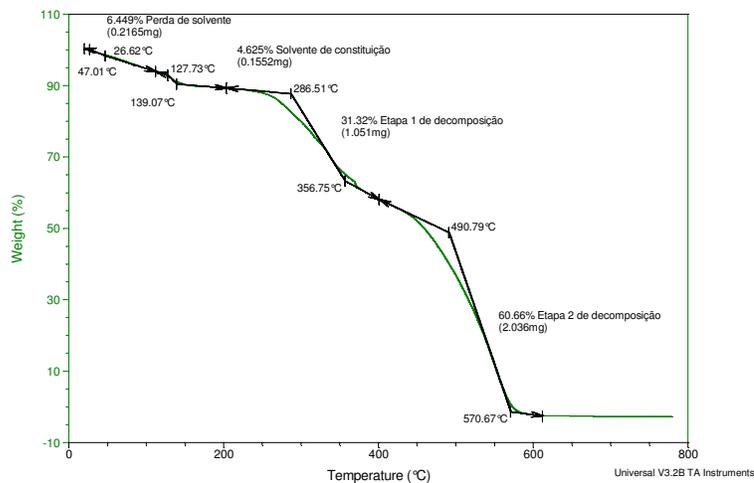


Figura 18: Curva da perda de massa por aquecimento da cinchonaína A.

Através das curvas obtidas é possível perceber que há perda de solvente volátil e perda de solvente de constituição, totalizando uma perda de 11,07% de massa para cinchonaína A.

As curvas TG, DTG e DTA obtidas para cinchonaína B são apresentadas nas figuras 19 e 20.

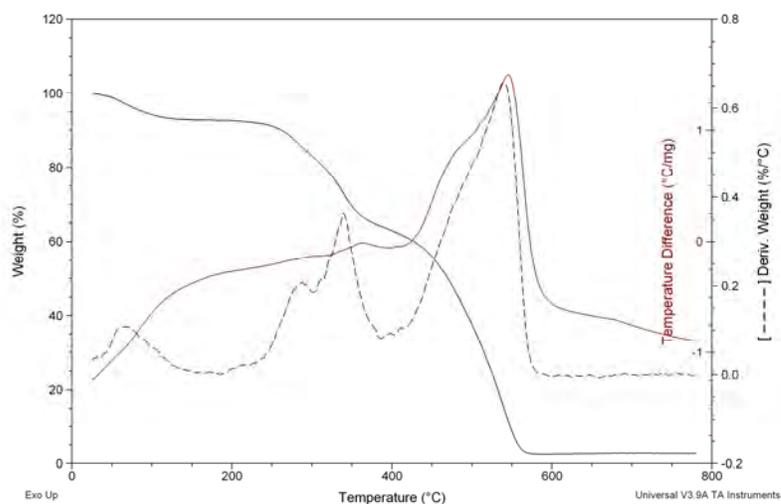


Figura 19 – Curvas da perda de massa (preta), derivada da perda de massa (pontilhada) e diferença de tempertura (vermelha) para cinchonaína B.

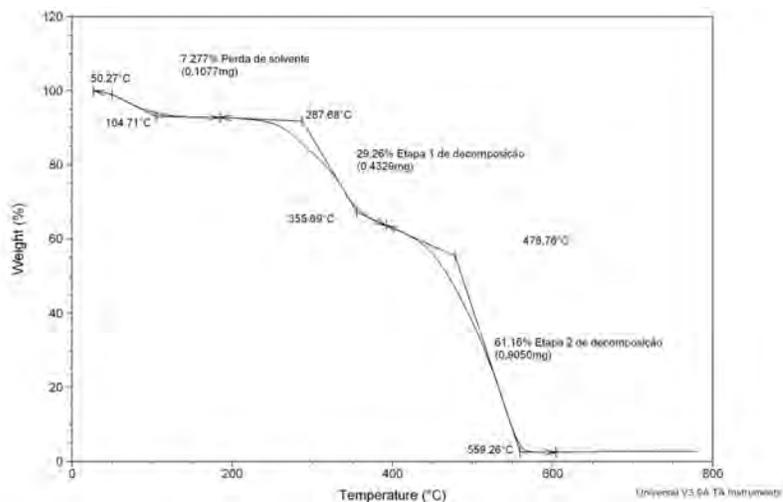


Figura 20: Curva da perda de massa por aquecimento da cinchonaína B.

A figura 20 mostra uma perda de massa de solvente de 7,28% durante o aquecimento da cinchonaína B.

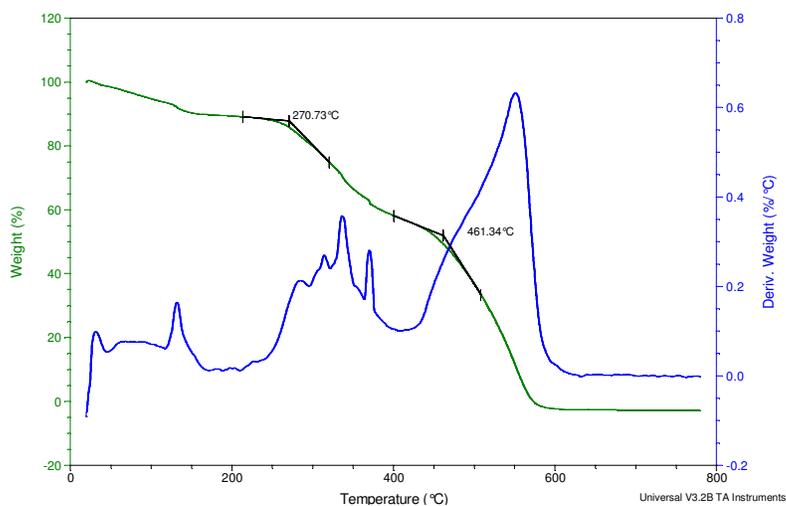


Figura 21 – Avaliação onset – cinchonaína A

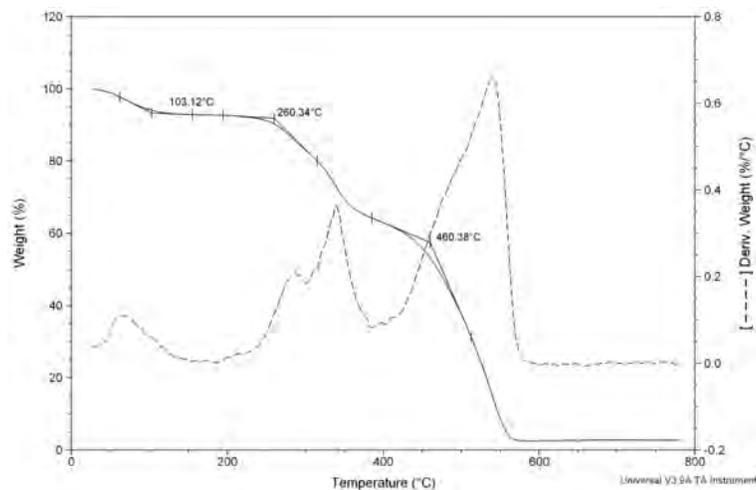


Figura 22 – Avaliação onset – cinchonaína B

A Comparação das figuras 21 e 22 mostram duas etapas de decomposição, a proporção das perdas de massa nas duas etapas é de 2 e 3 (etapa 1 e 2 de ambos os gráficos), isto sugere, pela observação das estruturas químicas, a perda dos dois substituintes aromáticos na etapa 1 e a perda da estrutura planar na etapa 2.

É notável, também, a proximidade das temperaturas nas quais ocorrem o início da etapa 2 de decomposição para as duas substâncias, de 461,34 °C para cinchonaína A e 460,38 °C para cinchonaína B, indicando que para esta etapa de decomposição praticamente a mesma energia é necessária.

Já para a primeira etapa, há uma diferença maior para a temperatura em que se inicia a decomposição, de 270,73 °C para a cinchonaína A e 260,34 °C para cinchonaína B, indicando que para esta etapa de decomposição uma energia ligeiramente maior é exigida para a cinchonaína A enquanto uma energia menor é exigida para cinchonaína B.

Ao final da decomposição não é observada massa residual significativa, indicando ausência de cinzas.

Pureza = Teor Relativo – Voláteis - Cinzas

Pureza Cinchonaína A = 99,89 – 11,07- 0 = **88,82%**

Pureza Cinchonaína B = 99,82 – 7,28 – 0 = **92,54%**

6.6 – Otimização da preparação do extrato hidroalcolico

Na tabela 15 estão apresentadas as respostas obtidas para cada um dos experimentos de otimização das condições de extração, visando a obtenção de extrato enriquecido em cinchonaínas.

Tabela 15: Variáveis e respostas obtidas para otimização da extração de cinchonaínas em casca de catuaba.

Experimento	T* (°C)	t** (min)	%EtOH***	D/S****(g/mL)	T.A*****(%)
1	40	30	30	7,5	0,733
2	80	30	30	12,5	0,718
3	40	30	70	12,5	1,041
4	80	30	70	7,5	1,038
5	40	90	30	12,5	0,741
6	80	90	30	7,5	0,729
7	40	90	70	7,5	1,092
8	80	90	70	12,5	1,043
9	60	60	50	10	1,181
10	60	60	50	10	1,220
11	60	60	50	10	1,209
12	60	60	20	10	0,572
13	60	60	100	10	0,518

*Temperatura (°C)

**Tempo (min)

*** Porcentagem de etanol (%)

****Quantidade de solvente para 1g de planta (mL)

*****Teor ativo (cinchonaína A + B) (%)

Nas figuras a seguir, estão mostradas as diferentes superfícies de respostas geradas com os dados apresentados na tabela 15.

$$T.A. (\%) = -1,5321 + 0,0429 * x + 0,0502 * y - 0,0004 * x * x + 1,1875E-5 * x * y - 0,0004 * y * y$$

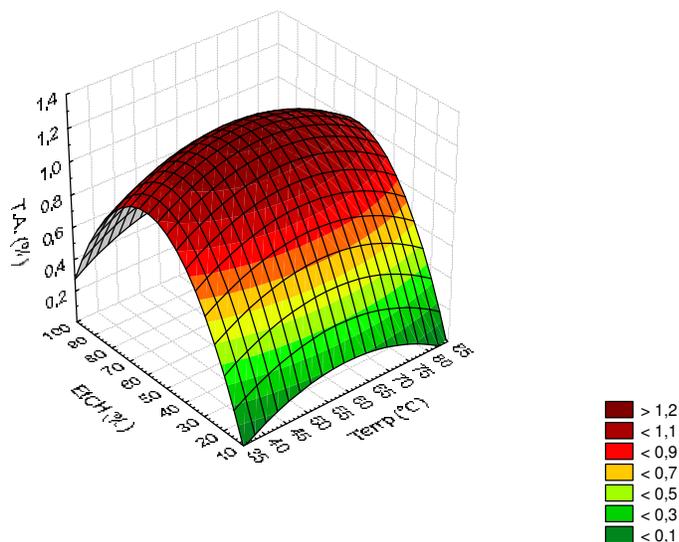


Figura 23: Superfície de resposta para T.A em função da porcentagem de etanol e temperatura.

Na figura 23, pode - se observar a superfície de resposta da interação das variáveis porcentagem de EtOH e temperatura (°C). A variável temperatura obtém valores máximos de T. A. por volta de 60°C e os valores diminuem de forma pouco pronunciada para maiores e menores temperaturas.

Para a variável porcentagem de EtOH, os valores de porcentagem de T.A aumentam até um rendimento máximo em aproximadamente 50 a 55% de EtOH e diminuem quando a porcentagem de etanol é maior que este valor.

$$\text{T.A. (\%)} = -0,8661 + 0,0197 * x + 0,0512 * y - 0,0002 * x^2 - 5,4167E-6 * x * y - 0,0004 * y^2$$

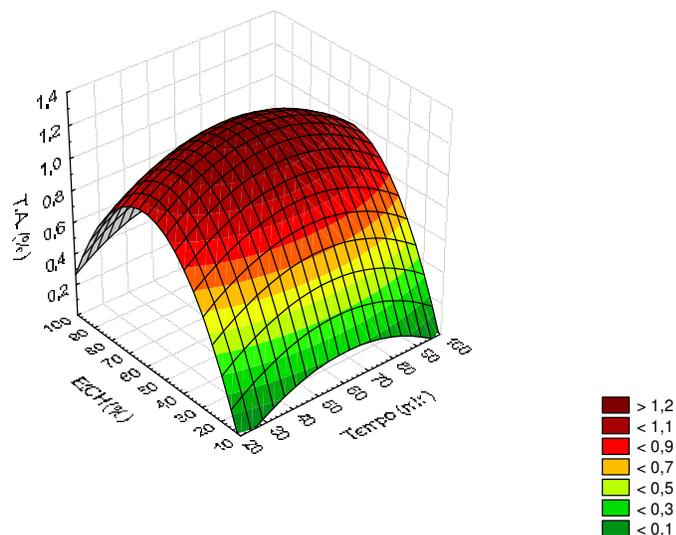


Figura 24: Superfície de resposta para T.A em função do tempo de extração e porcentagem de etanol.

Na figura 24, é apresentada a superfície de resposta da interação das variáveis porcentagem de EtOH e tempo (min). Para a variável tempo, os valores de porcentagem de T.A atingem um valor máximo para aproximadamente 60 min, diminuindo para maiores e menores valores.

$$\text{T.A. (\%)} = -2,7857 + 0,5766 * x + 0,0373 * y - 0,0295 * x^2 + 0,0003 * x * y - 0,0003 * y^2$$

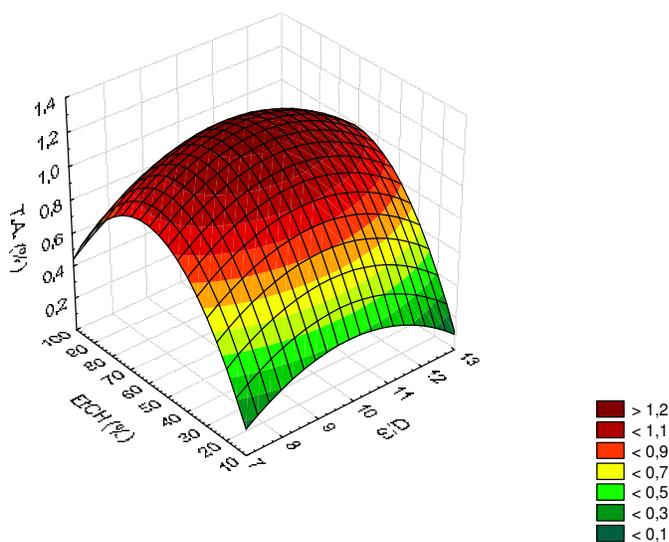


Figura 25: Superfície de resposta para T.A em função da porcentagem de etanol e proporção droga solvente.

$$T.A. (\%) = -6,3067 + 2,1057 * x - 0,1006 * y - 0,1051 * x * x - 6,5E-5 * x * y + 0,0008 * y * y$$

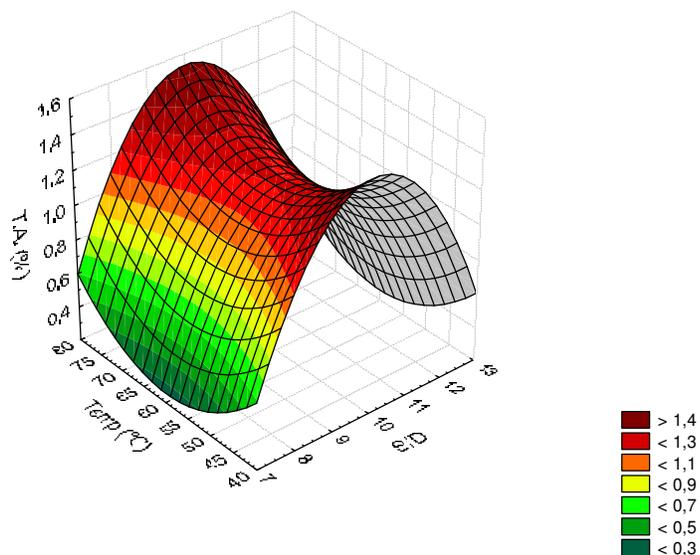


Figura 26: Superfície de resposta para T.A em função da temperatura e proporção droga solvente.

Os gráficos apresentados nas figuras 25 e 26 mostram que a variável proporção droga/solvente é mais significativa quando em relação à temperatura e influi de forma pouco pronunciada quando em relação a porcentagem de etanol.

Através dos experimentos e interpretação dos resultados, as condições de extração que melhor extraíram as cinchonaínas A e B das cascas de catuaba foram; 2 g da planta extraídas com 20mL de solução EtOH:H₂O (1:1 v/v) em refluxo por 1 hora a 60°C.

6.7 – Validação

6.7.1 – Especificidade e Seletividade

Na planta de catuaba, os marcadores (cinchonaína A e B) foram monitorados a partir de um detector UV/Vis com arranjo de diodos, com o qual se pode confirmar tanto a validade do método analítico quanto o grau de pureza das substâncias de interesse.

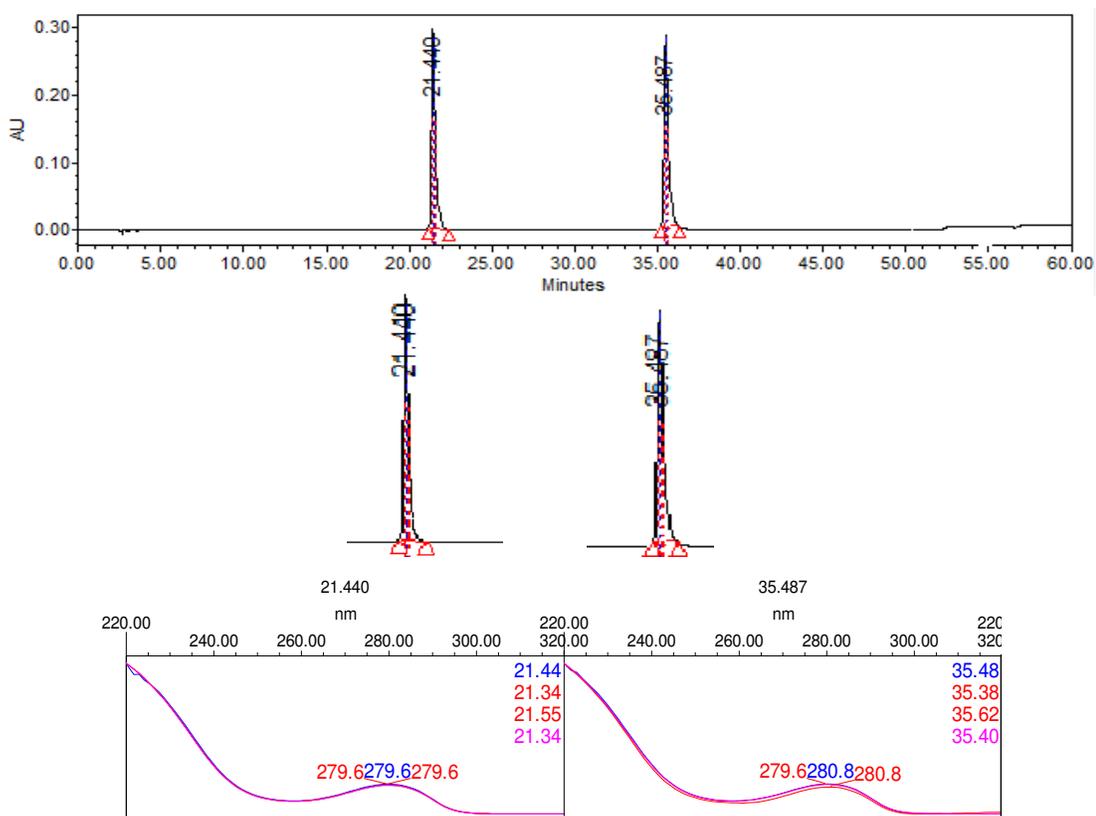


Figura 27: Cromatograma e espectros de UV referente aos padrões de cinchonaína A e B, $\lambda = 254$ nm.

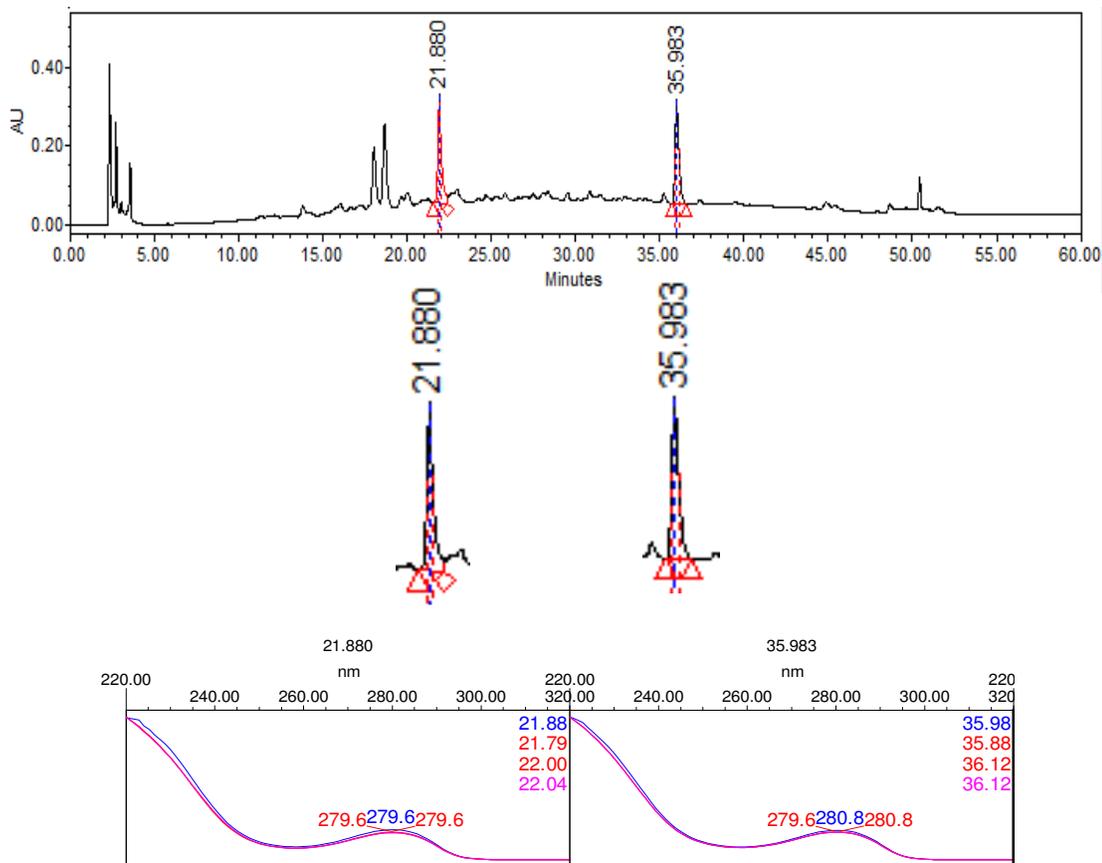


Figura 28: Cromatograma e espectros de UV referente ao extrato hidroalcolico de catuaba, $\lambda = 254$ nm.

O software utilizado (Empower pro) para o processamento dos dados não fornece um valor exato para a pureza do pico cromatográfico, porém fornece os valores de purity angle e purity treshold. Para comprovação da pureza do pico o valor de purity angle deve ser menor do que o valor do purity treshold. Todos o valores de purity angle e purity treshold encontrados para cada um dos picos (padrões e amostra) mostraram valores de purity angle menor do que o valor do purity treshold comprovando a pureza dos picos cromatográficos analisados.

As figuras 27 e 28 mostram os cromatogramas para análise dos espectros de UV/Vis em cada região do pico cromatográfico, nos quais os traços azuis e vermelhos nos picos (em detalhe) correspondem aos espectros de UV/Vis nas mesmas cores.

Através desta análise observa-se a sobreposição dos espectros de UV/Vis, mais um indicativo da pureza cromatográfica.

6.7.2 – Intervalo

O intervalo de trabalho foi determinado a partir dos valores encontrados para cinchonaína A e B na casca de catuaba, tomando-se aproximadamente de 80 a 120% desses valores.

A concentração de cinchonaína A no extrato da planta é de 456,63 ppm, portanto, um intervalo de 74,8 a 125,5% foi utilizado no teste de linearidade para esta substância. A concentração de cinchonaína B é de 419,48 ppm e um intervalo de 82,1 a 136,9% foi utilizado no teste de linearidade.

6.7.3 - Linearidade

As curvas analíticas das cinchonaínas A e B foram geradas com as soluções apresentadas na tabela 7, aplicadas em triplicata.

A seguir estão apresentadas as curvas analíticas referentes ao teste de linearidade para as cinchonaínas A e B, respectivamente, juntamente com as equações da reta e os parâmetros de correlação entre os dados. A tabela 16 apresenta os resultados experimentais obtidos para este teste.

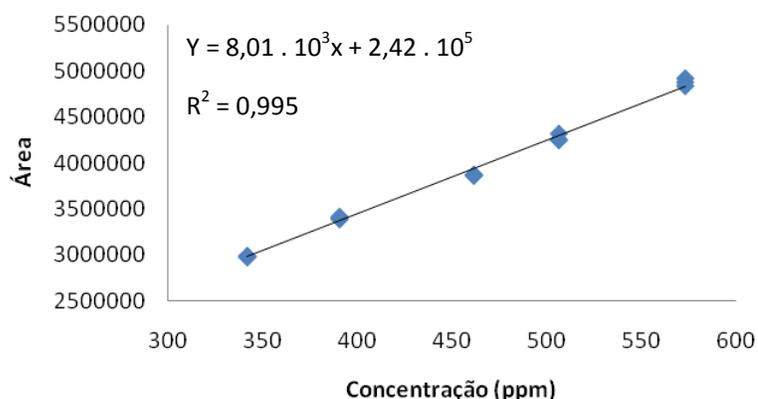


Figura 29: Curva analítica referente ao padrão de cinchonaína A.

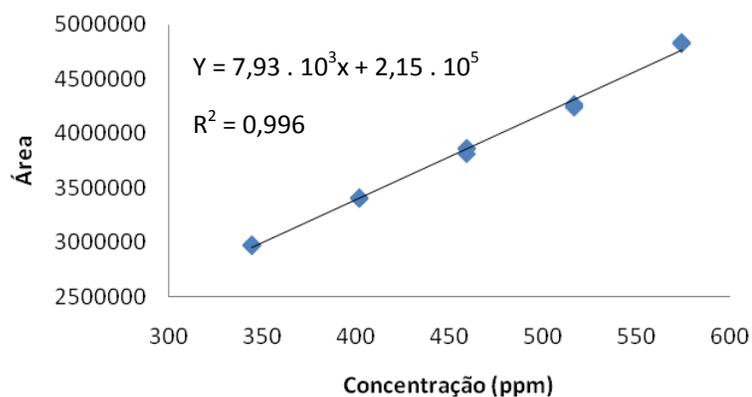


Figura 30: Curva analítica referente ao padrão de cinchonina B.

Tabela 16: Respostas de área em função das concentrações dos padrões de cinchoninas A e B no teste de linearidade.

Nível	Resposta (area) Cinchonina A	Desvio Padrão Relativo (%)	Resposta (área) Cinchonina B	Desvio Padrão Relativo (%)
1	4.875.171	0,852	4.836.233	0,175
	4.916.561		4.822.420	
	4.833.528		4.820.881	
2	4.318.380	0,916	4.267.135	0,368
	4.248.539		4.235.824	
	4.252.841		4.251.039	
3	3.863.145	0,156	3.809.344	0,762
	3.870.341		3.864.245	
	3.875.160		3.854.435	
4	3.390.832	0,420	3.397.775	0,196
	3.403.531		3.404.101	
	3.419.373		3.411.107	
5	2.980.611	0,261	2.963.774	0,253
	2.993.167		2.974.278	
	2.994.958		2.978.334	

Na seqüência estão apresentados os cromatogramas referentes aos padrões de cinchonaínas A e B (aplicados em triplicata), nas cinco diluições utilizadas para preparar as curvas analíticas.

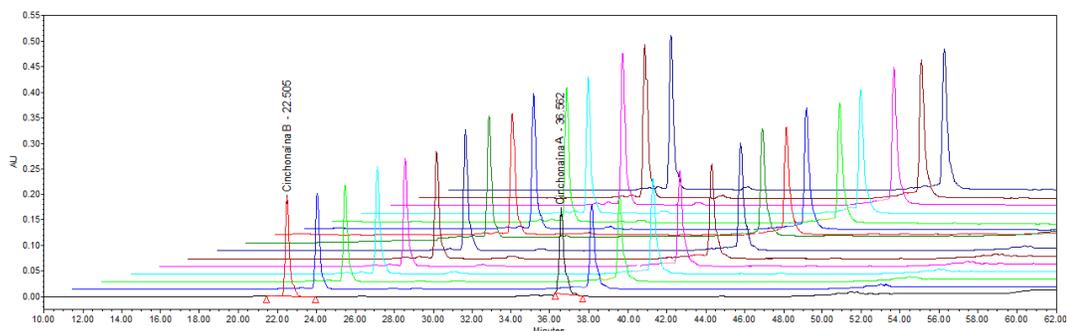


Figura 31: Cromatogramas referentes aos padrões das cinchonaínas A e B, nos cinco níveis de concentração utilizados para preparar as curvas analíticas, $\lambda = 254$ nm.

6.7.4 – Limite de detecção e Quantificação

O cromatograma do ruído da linha de base é apresentado na figura 32, o valor do ruído foi multiplicado por três para obtenção do valor mínimo de altura que devem apresentar os picos das cinchonaínas A e B, a partir dos quais seriam detectáveis.

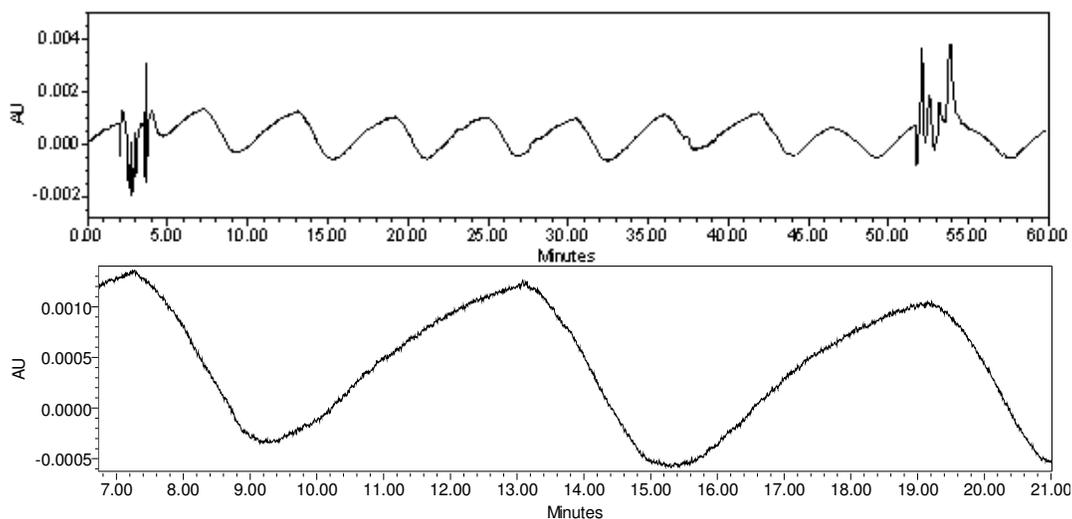


Figura 32: Cromatogramas do ruído da linha de base, $\lambda = 254$ nm.

Altura do ruído = 0,0019 AU

Altura mínima para os picos serem detectáveis = 0,0057 AU

Concentrações dos padrões de cinchonaína A e B próximas da altura determinada (0,0057 AU) foram injetadas em triplicata como demonstrado em um dos cromatogramas apresentado na figura 33.

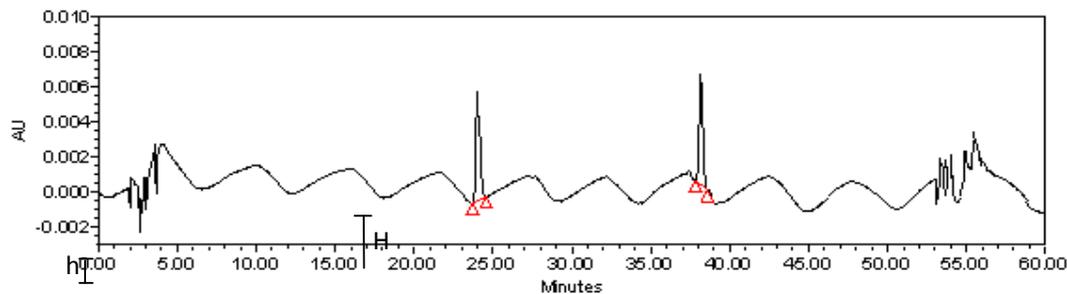


Figura 33: Cromatograma representando o limite de detecção do método, $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Limite de detecção: Cinchonaína A – 10,2 ppm

Cinchonaína B – 10,5 ppm

A altura do sinal ruído também foi multiplicada por dez para obtenção da altura mínima dos picos de cinchonaína A e B para serem quantificados.

Altura mínima para os picos serem quantificáveis = 0,019

Concentrações dos padrões de cinchonaína A e B próximas da altura determinada (0,019 AU) foram injetadas em triplicata como demonstrado em um dos cromatogramas apresentado na figura 34.

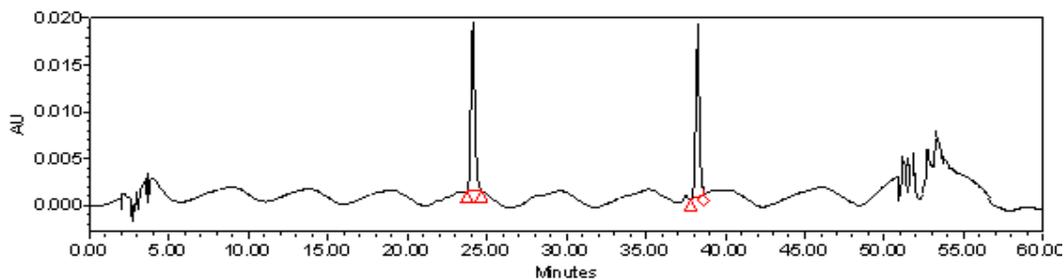


Figura 34: Cromatograma representando o limite de quantificação do método, $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Limite de quantificação: Cinchonaína A – 29,3 ppm

Cinchonaína B – 29,9 ppm

6.7.5 – Exatidão

Foram preparadas três soluções do extrato hidroalcolico de catuaba e fortificadas com diferentes concentrações de cinchonaína A e B. As porcentagens de recuperação de cada uma dessas substâncias, nas várias diluições testadas, estão apresentadas nas tabelas 17 e 18.

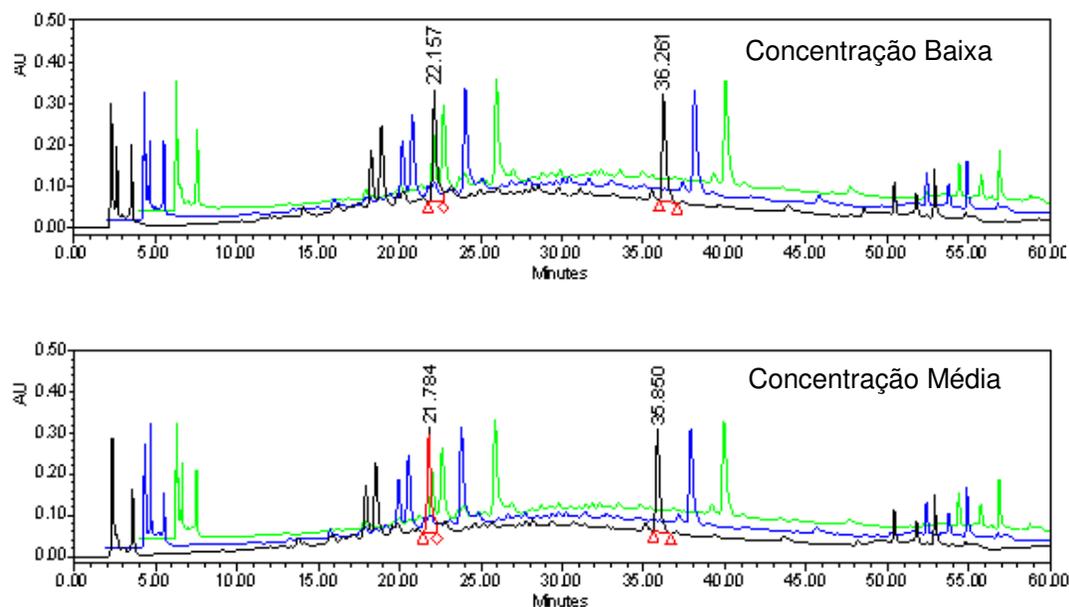
Tabela 17: Resultados obtidos no ensaio de exatidão para cinchonaína A

	Concentração Baixa	Concentração Média	Concentração alta
Concentração da amostra (mg.L ⁻¹)	456,63	456,63	456,63
Concentração adicionada (mg.L ⁻¹)	15	70	110
Concentração recuperada (mg.L ⁻¹)	14,565	72,039	114,031
	14,532	71,047	113,122
	14,996	72,015	114,979
Média conc.	14,698	71,700	114,044
Porcentagem de recuperação	97,1	102,9	103,7
	96,9	101,5	102,8
	99,9	102,9	104,5
Média (%)	98,0	102,4	103,7
DPR (%)	1,440	1,697	2,552

Tabela 18: Resultados obtidos no ensaio de exatidão para cinchonaína B.

	Concentração Baixa	Concentração Média	Concentração alta
Concentração da amostra (mg.L ⁻¹)	419,48	419,48	419,48
Concentração adicionada (mg.L ⁻¹)	10	50	90
Concentração recuperada (mg.L ⁻¹)	9,591	49,346	88,886
	9,503	52,454	87,004
	9,715	51,916	88,488
Média conc.	9,603	53,572	88,126
Porcentagem de recuperação	95,9	98,7	98,8
	95,0	104,9	96,7
	97,2	103,8	98,3
Média (%)	96,0	102,5	97,9
DPR (%)	2,864	1,730	1,488

Os resultados apresentados nas tabelas 17 e 18 mostram um desvio padrão relativo inferior ao máximo aceitável (5 %), indicando a exatidão do método. Os cromatogramas são apresentados na figura 35.



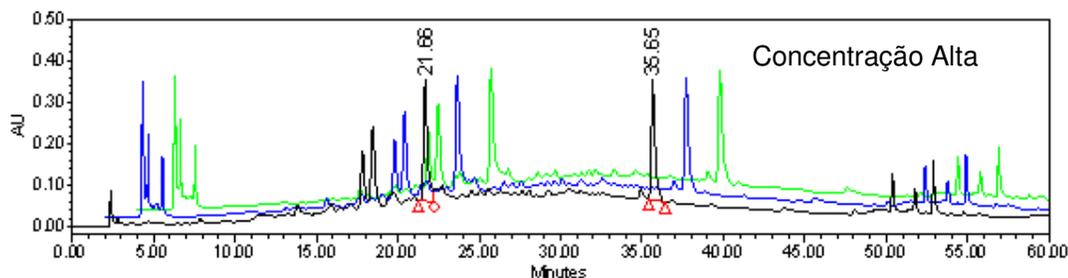


Figura 35: Cromatogramas obtidos das análises de exatidão nas concentrações baixa, média e alta respectivamente, $\lambda = 254$ nm.

6.7.6 – Precisão

6.7.6.1 – Repetibilidade

As análises foram realizadas em três concentrações diferentes, aplicadas em triplicata. Os resultados estão apresentados na tabela 19.

Tabela 19: Resumo dos resultados obtidos no teste de repetibilidade.

	Concentração Baixa	Concentração Média	Concentração Alta
Teor de Cinchonina A + B (ppm)	710,80 701,34 700,03	869,98 875,91 866,23	1051,20 1033,13 1042,54
Média conc.	700,72	876,37	1052,29
DP	5,87	4,88	9,03
DPR (%)	0,83	0,56	0,87

Os cromatogramas obtidos para este teste estão apresentados na figura 36.

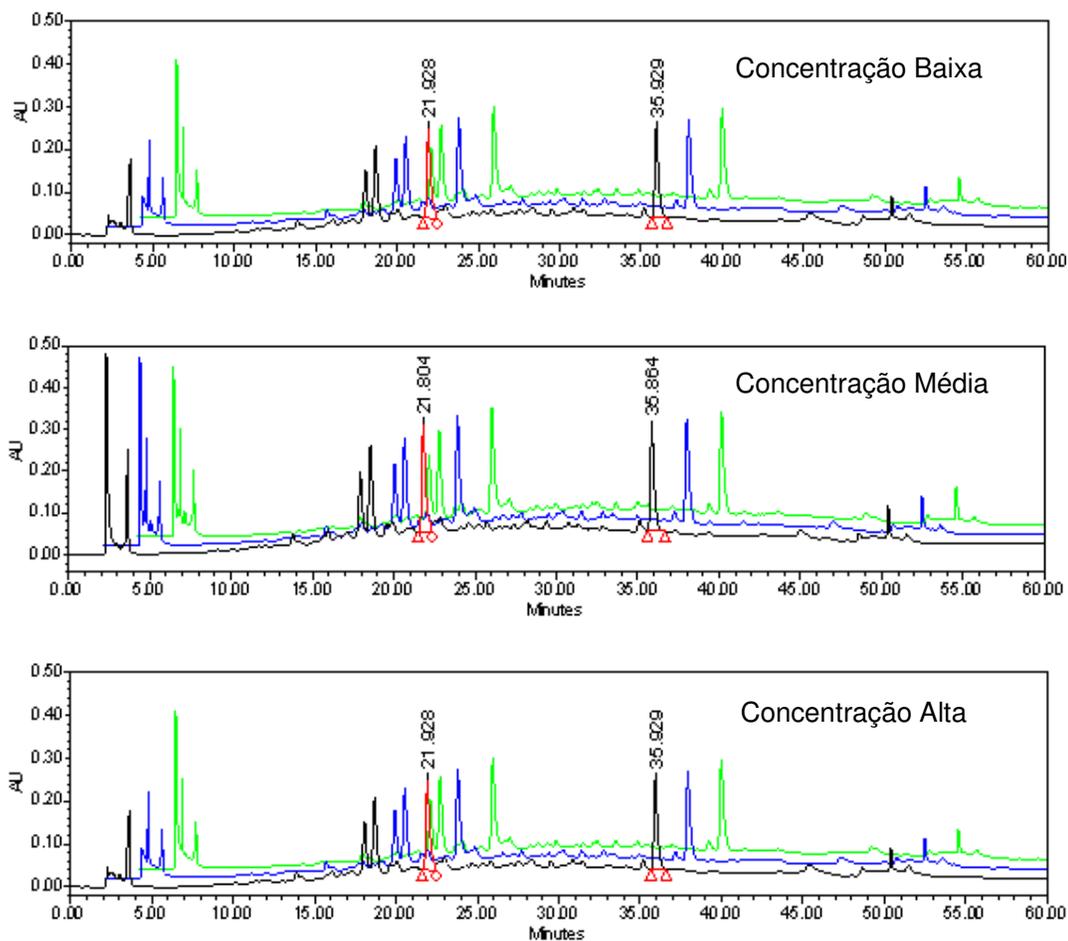


Figura 36: Cromatogramas das análises de repetibilidade nas concentrações baixa, média e alta respectivamente, $\lambda = 254 \text{ nm}$.

6.7.6.2 – Precisão intermediária

Este ensaio foi realizado com a diluição intermediária da planta, considerando a preparação do extrato (2g / 25 mL), no mesmo laboratório e pela mesma analista, porém em dias diferentes. Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 20.

Tabela 20: Resumo dos resultados obtidos no teste de precisão intermediária – Mesmo analista em dias diferentes.

	1º Dia	2º Dia
Concentração de Cinchonaína A +B (mg.L ⁻¹)	876,21 865,52 871,91	876,46 876,06 877,54
Média conc.	871,21	876,69
DP	3,87	
DPR (%)	0,44	

O valor obtido para o desvio padrão relativo foi de 0,44%, inferior ao limite aceitável (5%). Os cromatogramas são apresentados nas figuras 37 e 38.

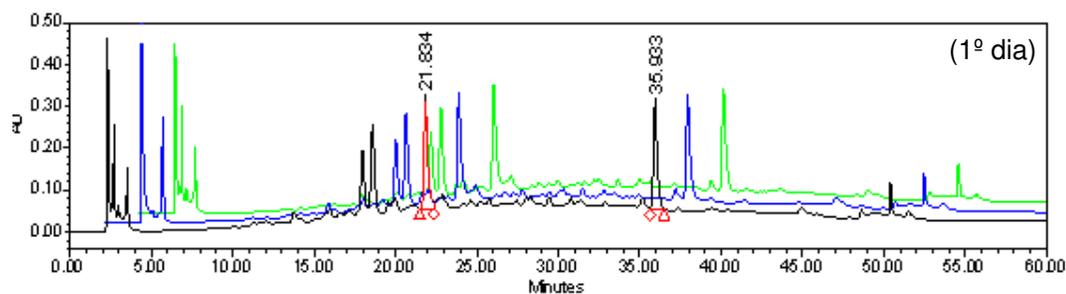


Figura 37: Cromatogramas da análise de precisão intermediária realizada no 1º dia de análise, $\lambda = 254$ nm.

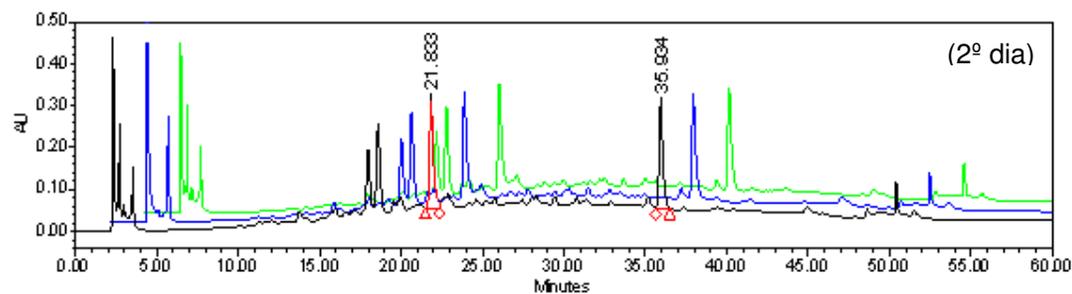


Figura 38: Cromatogramas da análise de precisão intermediária realizada no 2º dia de análise, $\lambda = 254$ nm.

Foi realizado também o teste de precisão intermediária entre analistas, ou seja, o mesmo ensaio foi realizado em um mesmo dia, mas por analistas diferentes. Os resultados são resumidos na tabela 21.

Tabela 21: Resumo dos resultados obtidos no teste de precisão intermediária – Analistas diferentes.

	Analista 1	Analista 2
Concentração de Cinchonaína A + B (mg.L ⁻¹)	876,42 866,26 874,51	856,38 861,41 872,62
Média conc.	872,40	863,47
DP	6,31	
DPR (%)	0,73	

Os resultados mostram um desvio padrão relativo inferior ao limite máximo aceitável (5 %), indicando a precisão intermediária do método. Os cromatogramas são apresentados na figura 39 e 40.

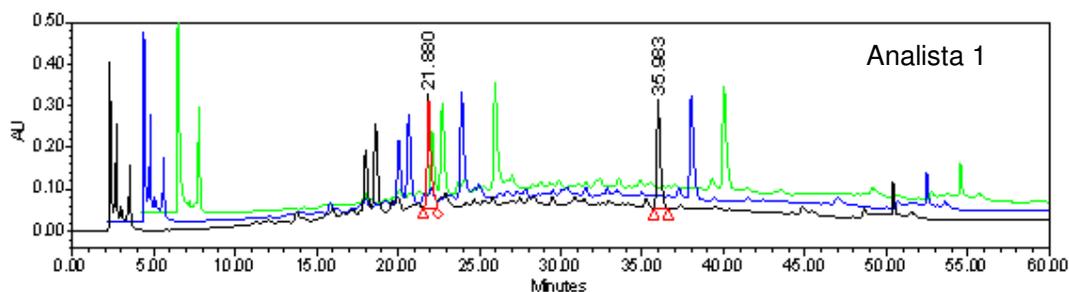


Figura 39: Cromatogramas das análises de precisão intermediária realizadas pelo Analista 1, $\lambda = 254$ nm.

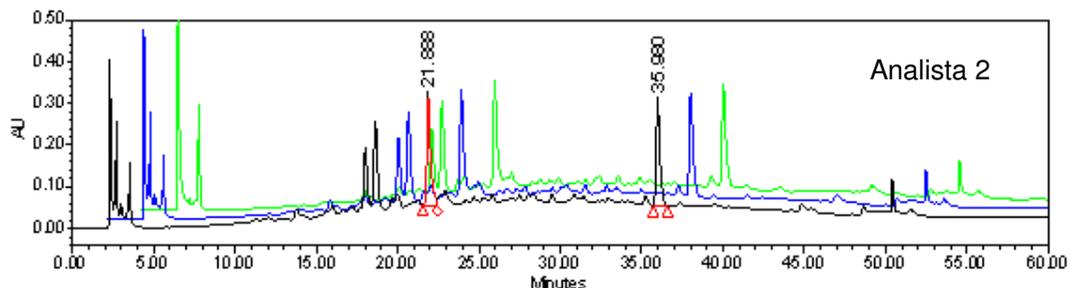


Figura 40: Cromatogramas das análises de precisão intermediária realizadas pelo Analista 2, $\lambda = 254$ nm.

6.7.7 – Robustez

6.7.7.1 - Vazão da Fase Móvel

Foram testadas três vazões diferentes na análise de robustez do método, sendo uma delas a vazão utilizada na metodologia em estudo. Os resultados quantitativos e qualitativos são apresentados na tabela 22.

Tabela 22: Resultados experimentais da análise de robustez variando-se a vazão da fase móvel.

Vazão da FM (mL.min ⁻¹)	Tempo de Retenção (min)		Teor de Cinchonaína A+B (mg.L ⁻¹)
	B	A	
0,9	22,860	36,900	868,20
1,0	21,620	35,678	876,06
1,1	21,153	35,110	877,54
DP	0,88	0,91	5,02
DPR (%)	4,03	2,55	0,57

A partir dos testes de robustez com variação da vazão da fase móvel, nota-se que há diferenças nos tempos de retenção para ambos as vazões (0,9 mL.min⁻¹ e 1,1 mL.min⁻¹) quando comparados à vazão normal do método (1,0 mL.min⁻¹), com desvio padrão relativo de 4,03 % e 2,55 % para a cinchonaína A e B,

respectivamente. Quanto aos parâmetros quantitativos, não há diferença significativa quanto aos teores de cinchonínas, com desvio padrão relativo de 0,57%. Os cromatogramas são apresentados na figura 41.

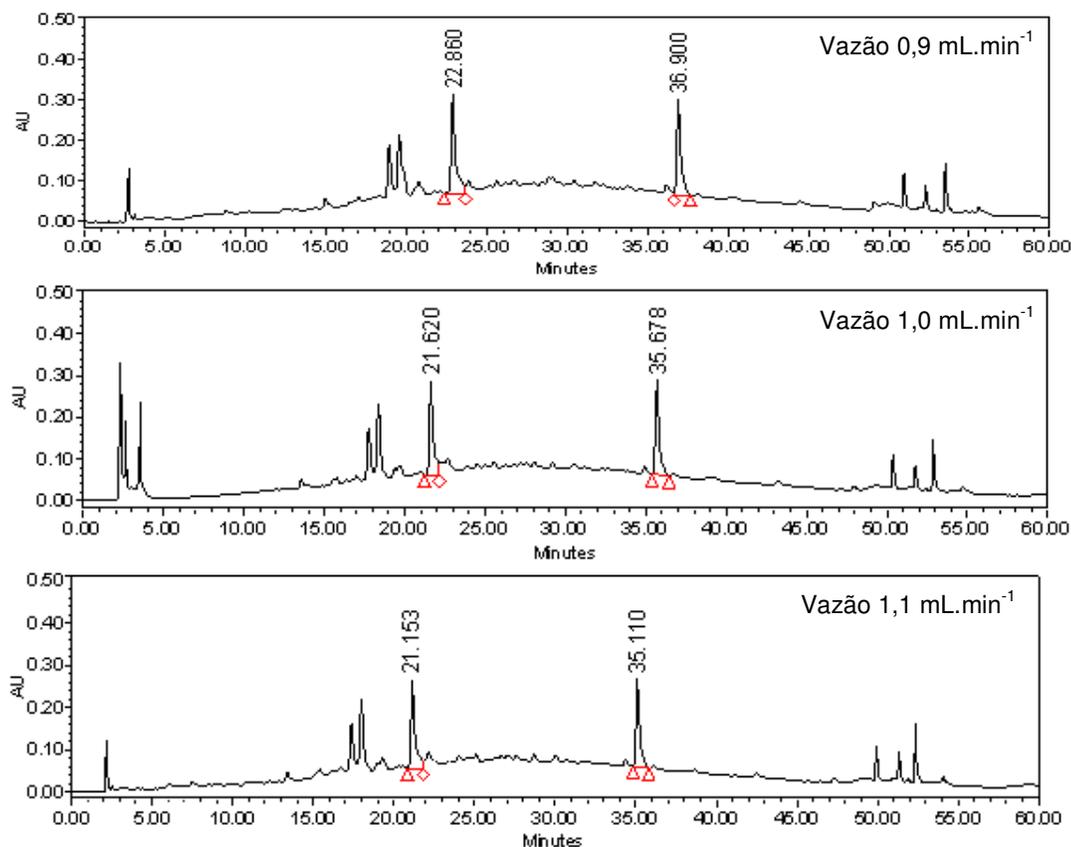


Figura 41: Cromatogramas referentes às análises de robustez modificando-se a vazão da fase móvel, $\lambda = 254$ nm.

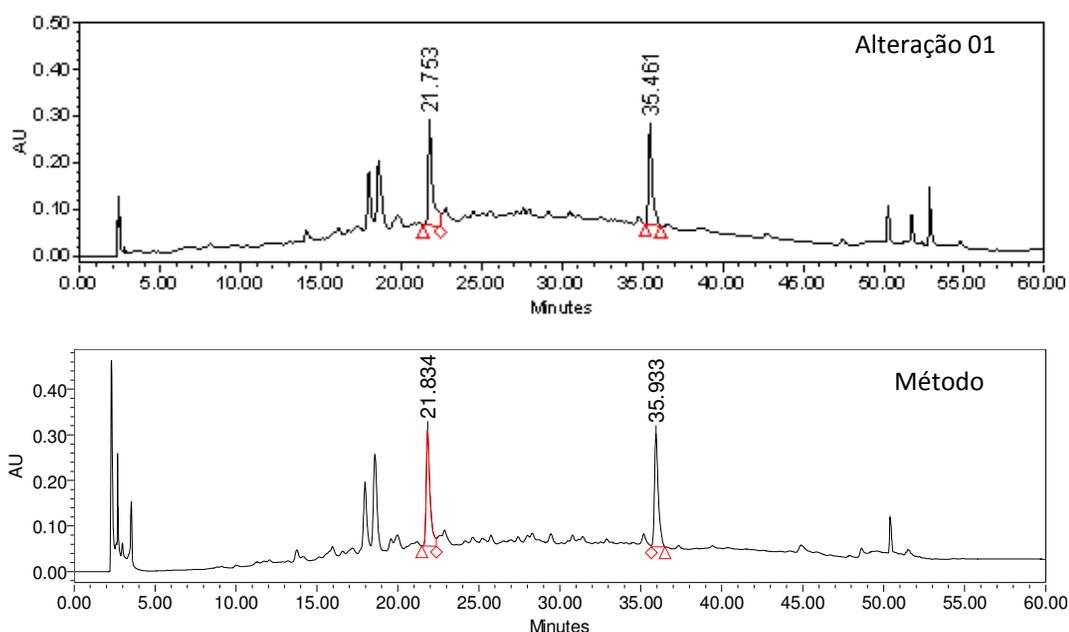
6.7.7.2. Composição da fase móvel

As análises foram realizadas através de duas variações do gradiente cromatográfico comparando-o com a composição utilizada na metodologia em estudo (tabela 8). Os resultados quantitativos e qualitativos são apresentados na tabela 23.

Tabela 23: Resultados experimentais da análise de robustez variando-se a composição da fase móvel.

Composição do gradiente	Tempo de Retenção (min)		Teor de Cinchonaína A +B (mg.L ⁻¹)
	Cinchonaína B	Cinchonaína A	
Alteração 01	21,753	35,461	871,32
Método	21,834	35,933	865,13
Alteração 02	21,880	35,983	879,50
DP	0,06	0,29	7,21
DPR (%)	0,29	0,80	0,83

A partir dos testes de robustez variando-se a composição da fase móvel nota-se um desvio padrão relativo de 0,29 % e 0,80 % para os tempos de retenção das cinchonaínas A e B respectivamente. Pode-se perceber também que não há uma diferença quantitativa significativa quanto aos teores determinados de cinchonaínas, com desvio padrão relativo de 0,83 %. Os cromatogramas são apresentados na figura 42.



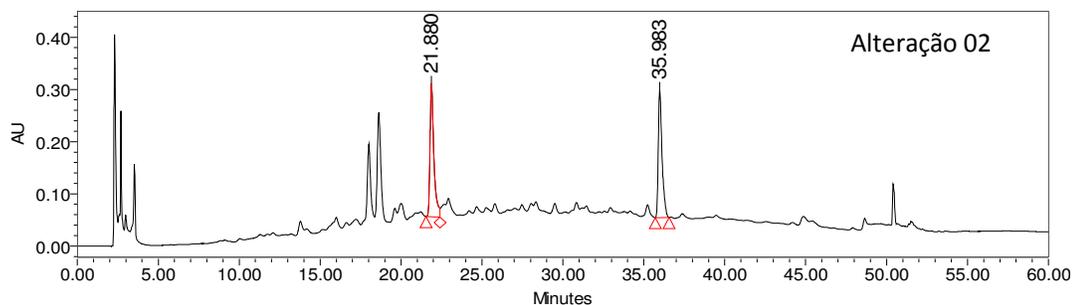


Figura 42: Cromatogramas referentes às análises de robustez modificando-se a composição da fase móvel, $\lambda = 254$ nm.

6.7.7.3 – Coluna

As análises foram realizadas com colunas Phenomenex Luna C18, 5 μ m (2,5 x 4,6 mm) de lotes diferentes. Os resultados quantitativos e qualitativos encontrados para cada uma dessas análises são apresentados na tabela 24.

Tabela 24: Resultados das análises de robustez variando-se o lote da coluna.

Lote	Tempo de Retenção (min)		Teor de Cinchonaína A + B (mg, L^{-1})
	Cinchonaína B	Cinchonaína A	
498664-7	21,795	35,783	873,62
505335-2	21,833	35,934	855,21
DP	0,03	0,11	13,01
DPR (%)	0,12	0,30	1,51

Pode-se perceber que os tempos de retenção dos padrões variaram de maneira não significativa de forma que os resultados das análises não foram comprometidos. Em relação aos parâmetros quantitativos, verificou-se um desvio padrão relativo de 1,51 %. Os cromatogramas estão apresentados na figura 43.

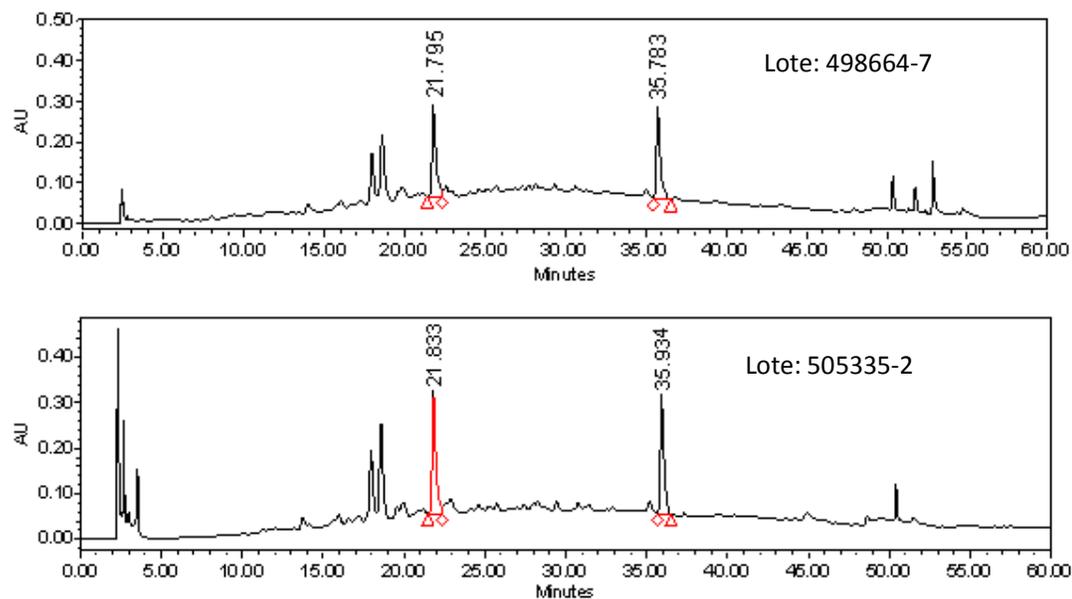
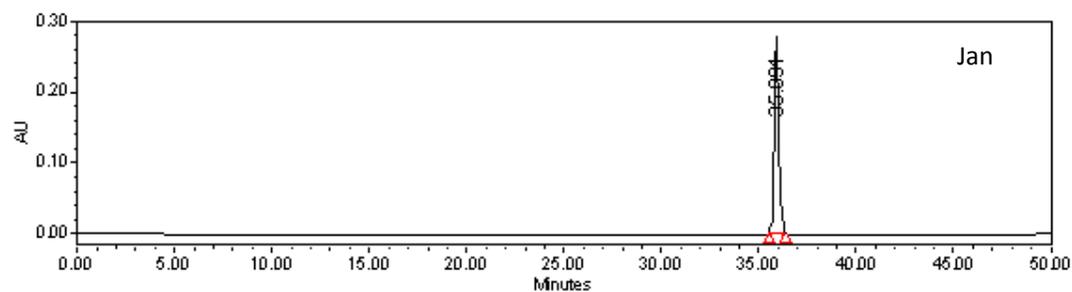


Figura 43: Cromatogramas referente às análises de robustez utilizando-se dois lotes diferentes de coluna do mesmo fabricante, $\lambda = 254$ nm.

6.8 – Estabilidade acelerada

6.8.1 – Cinchonaína A

Os cromatogramas e os dados obtidos para o padrão cinchonaína A durante os seis meses de estudo de estabilidade acelerada são apresentados na figura 44 e tabela 25.



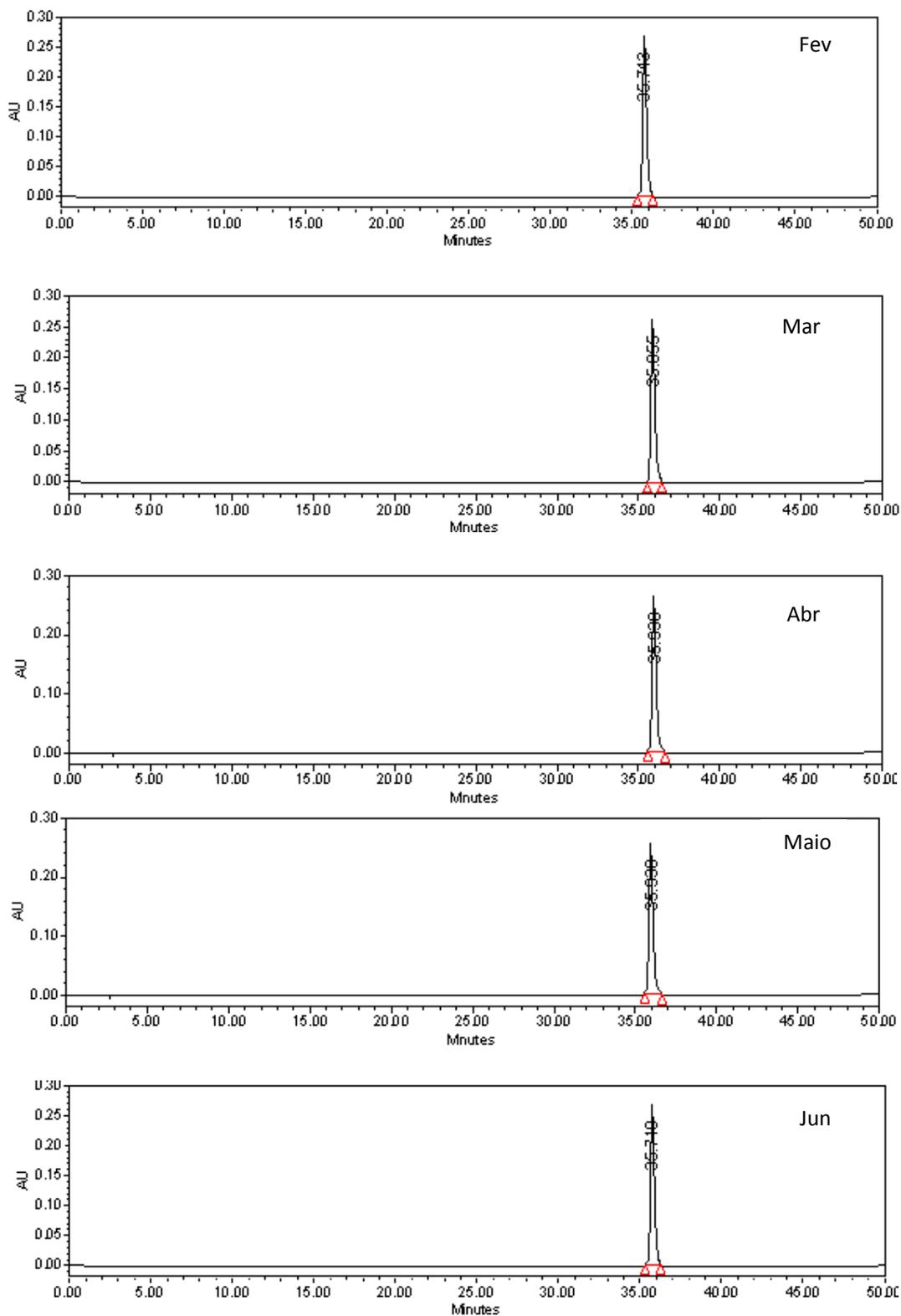


Figura 44 – Cromatogramas da cinchonina A durante os seis meses do estudo de estabilidade acelerada, $\lambda = 254$ nm.

Tabela 25: Valores da concentração injetada, área e área corrigida obtidas das análises do estudo de estabilidade para cinchonaína A.

Mês	Concentração Injetada	Área	Área Corrigida*
Janeiro	461,5	4.064.863	4.064.863
Fevereiro	474,2	4.224.280	4.111.146
Março	465,7	4.117.237	4.080.105
Abril	470,1	4.270.152	4.192.034
Maio	458,8	3.976.851	4.058.371
Junho	463,3	4.074.199	4.000.255
DPR (%)			1,60

*Área corrigida é a área obtida caso todas as amostras fossem injetadas exatamente com a mesma concentração da amostra injetada no primeiro mês de estudo de estabilidade.

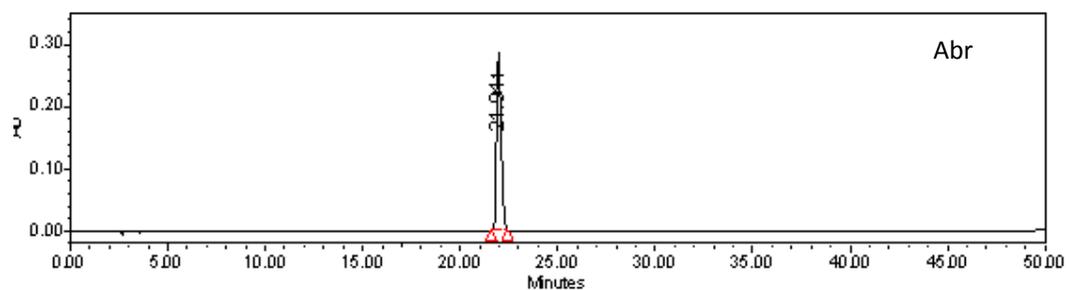
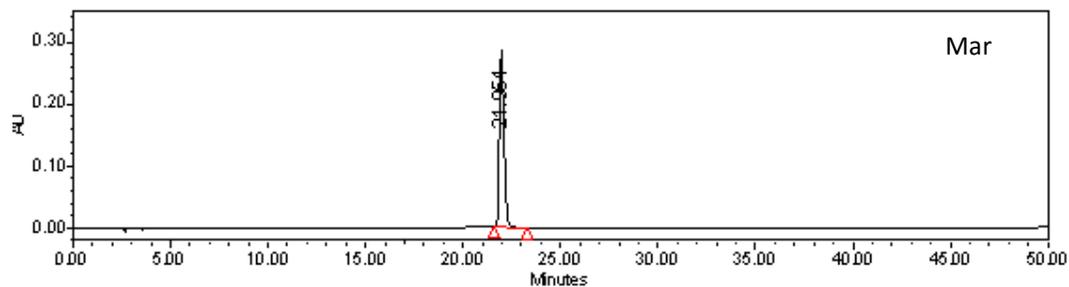
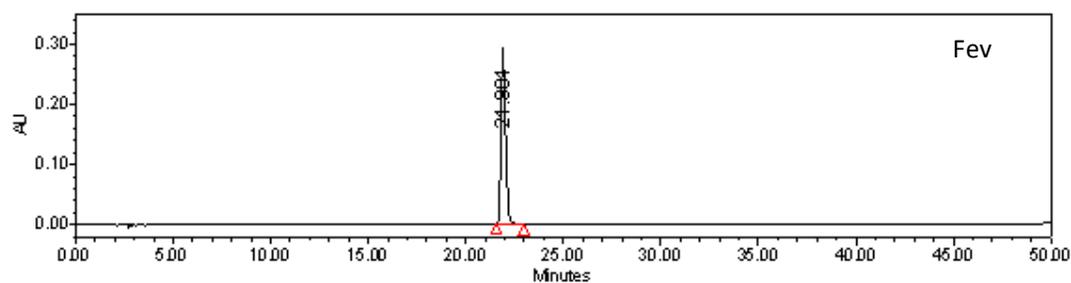
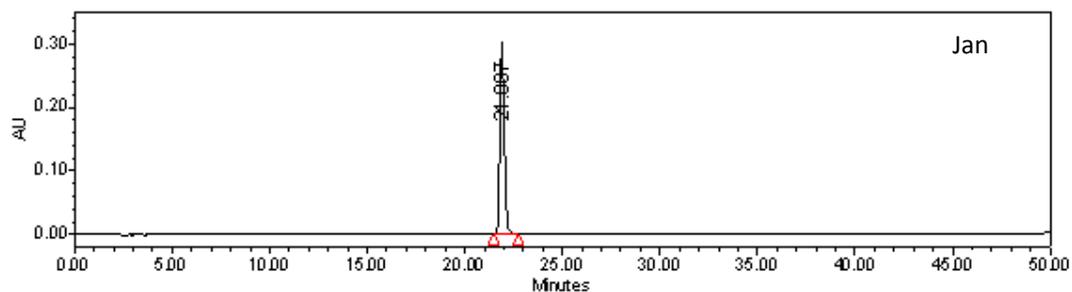
Ex: Conc. Fev. = 474,2 ppm 4.224.280

461,5 ppm área corrigida

Através dos dados apresentados na tabela 25, observa-se que para uma mesma concentração de cinchonaína A, valores muito próximos de área foram encontrados durante os seis meses de estudo de estabilidade acelerada, com um desvio padrão relativo de 1,6%, indicando que a substância é estável quando armazenada a seco.

6.8.2 – Cinchonaína B

Os cromatogramas obtidos da cinchonaína B durante os seis meses de estudo de estabilidade são apresentados a seguir.



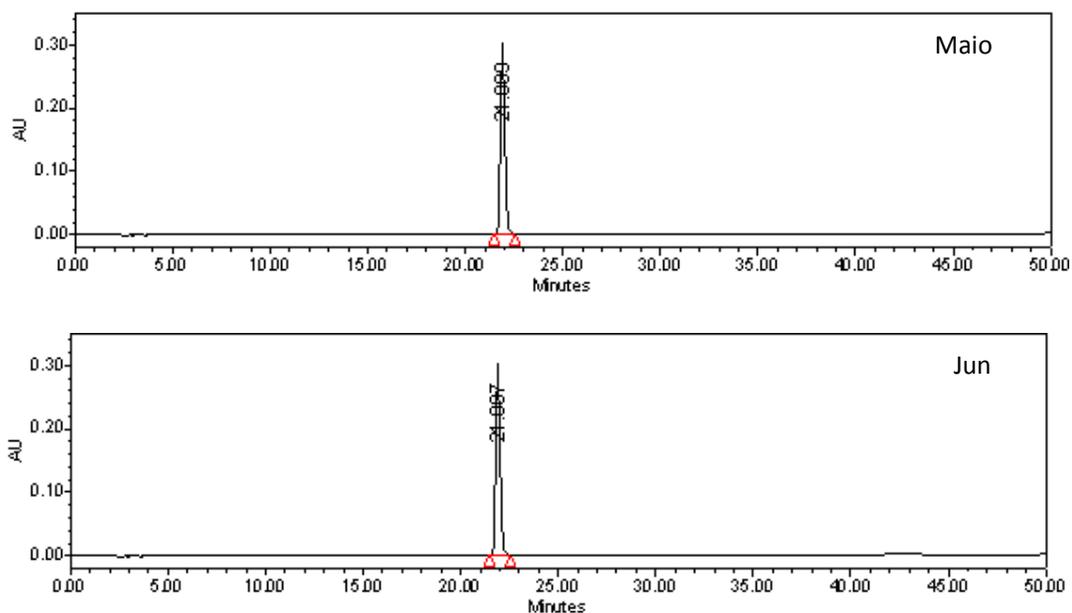


Figura 45 – Cromatogramas da cinchonina B durante os seis meses de estudo de estabilidade acelerada, $\lambda = 254$ nm.

Tabela 26: Valores da concentração injetada, área e área corrigida obtidas das análises do estudo de estabilidade para cinchonina B.

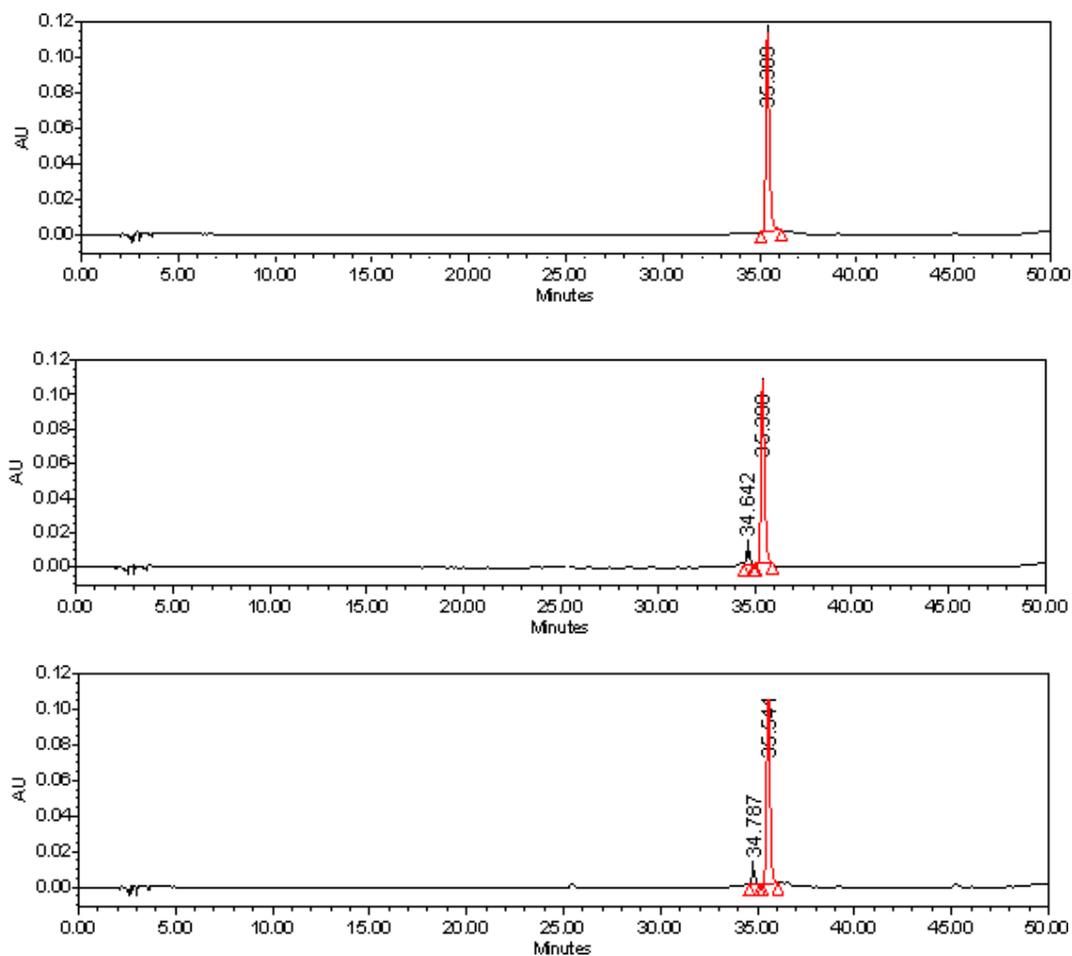
Mês	Concentração	Área	Área Corrigida
Janeiro	550,4	4.636.486	4.636.486
Fevereiro	567,8	4.755.686	4.609.950
Março	559,7	4.800.908	4.721.135
Abril	540,9	4.512.390	4.591.643
Maio	537,1	4.509.494	4.621.161
Junho	555,1	4.754.416	4.714.161
DPR (%)			1,20

Através dos dados apresentados na tabela 26, observa-se também que para uma mesma concentração de cinchonina B, valores muito próximos de área foram encontrados, com um desvio padrão relativo de 1,2%, indicando que a substância é estável quando armazenada a seco.

6.9 – Estabilidade em solução

6.9.1 – Cinchonina A

Os cromatogramas obtidos para o estudo de estabilidade em solução metanólica (MeOH:H₂O 1:1) da cinchonina A, na condição A, descrita na tabela 9 (página 31), nos tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias estão apresentados na figura 46.



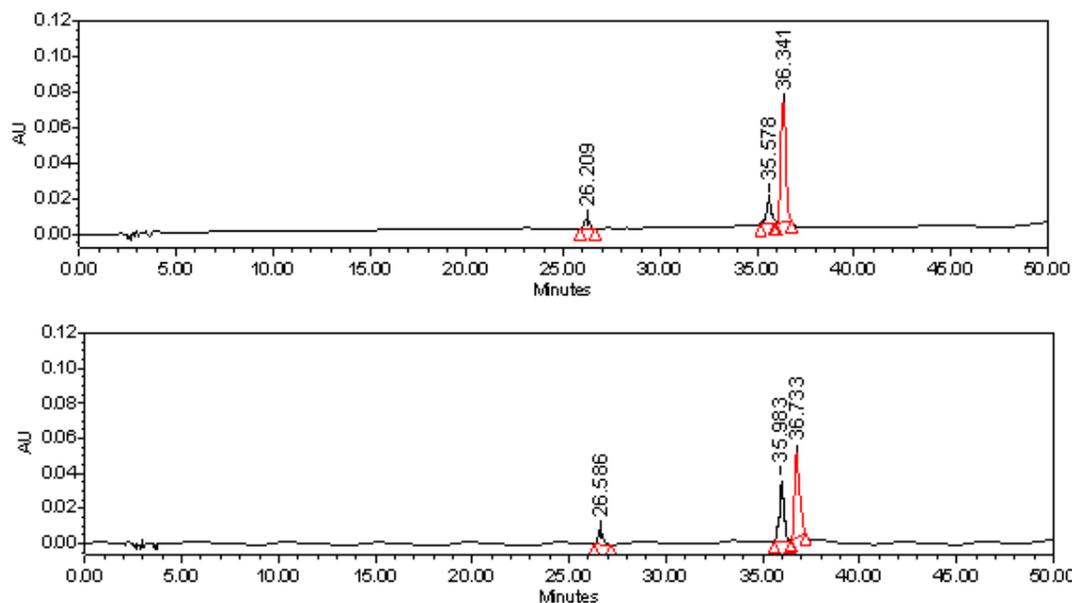
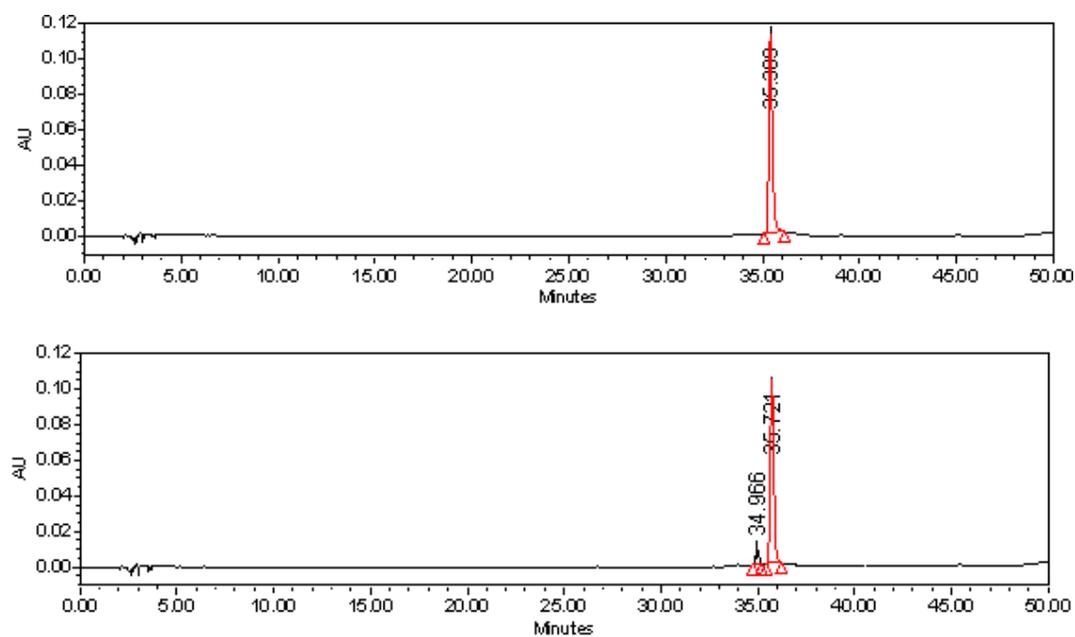


Figura 46 – Cromatogramas da cinchonina A na condição A no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.

Os cromatogramas obtidos para o estudo de estabilidade em solução (MeO:H₂O 1:1) da cinchonina A, na condição B, descrita na tabela 9, nos tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias estão apresentados na figura 47.



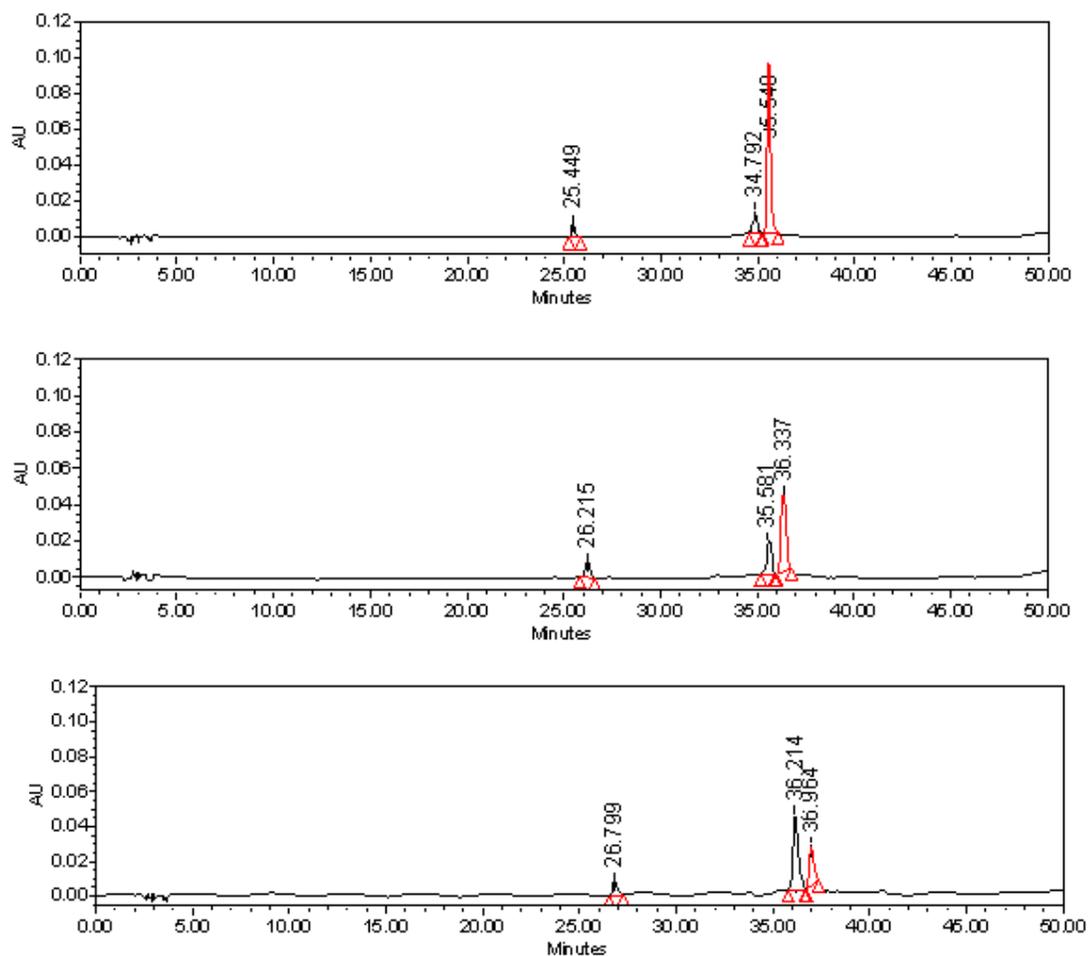
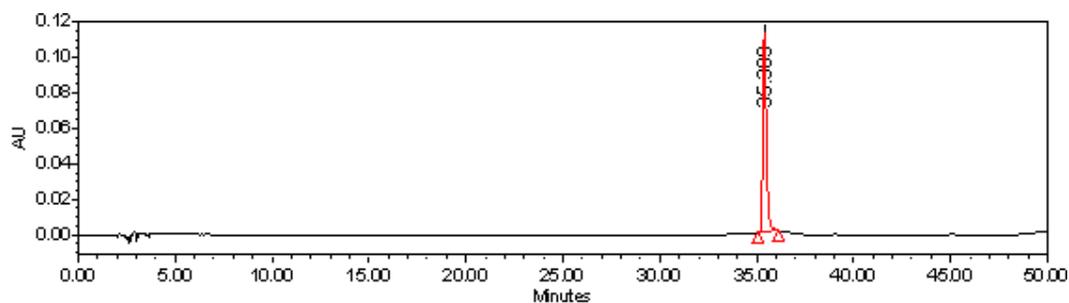


Figura 47 – Cromatogramas da cinchonina A, na condição B no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.

Os cromatogramas obtidos para o estudo de estabilidade em solução (MeOH:H₂O 1:1) da cinchonina A, na condição C, descrita na tabela 9, nos tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias estão apresentados na figura 48.



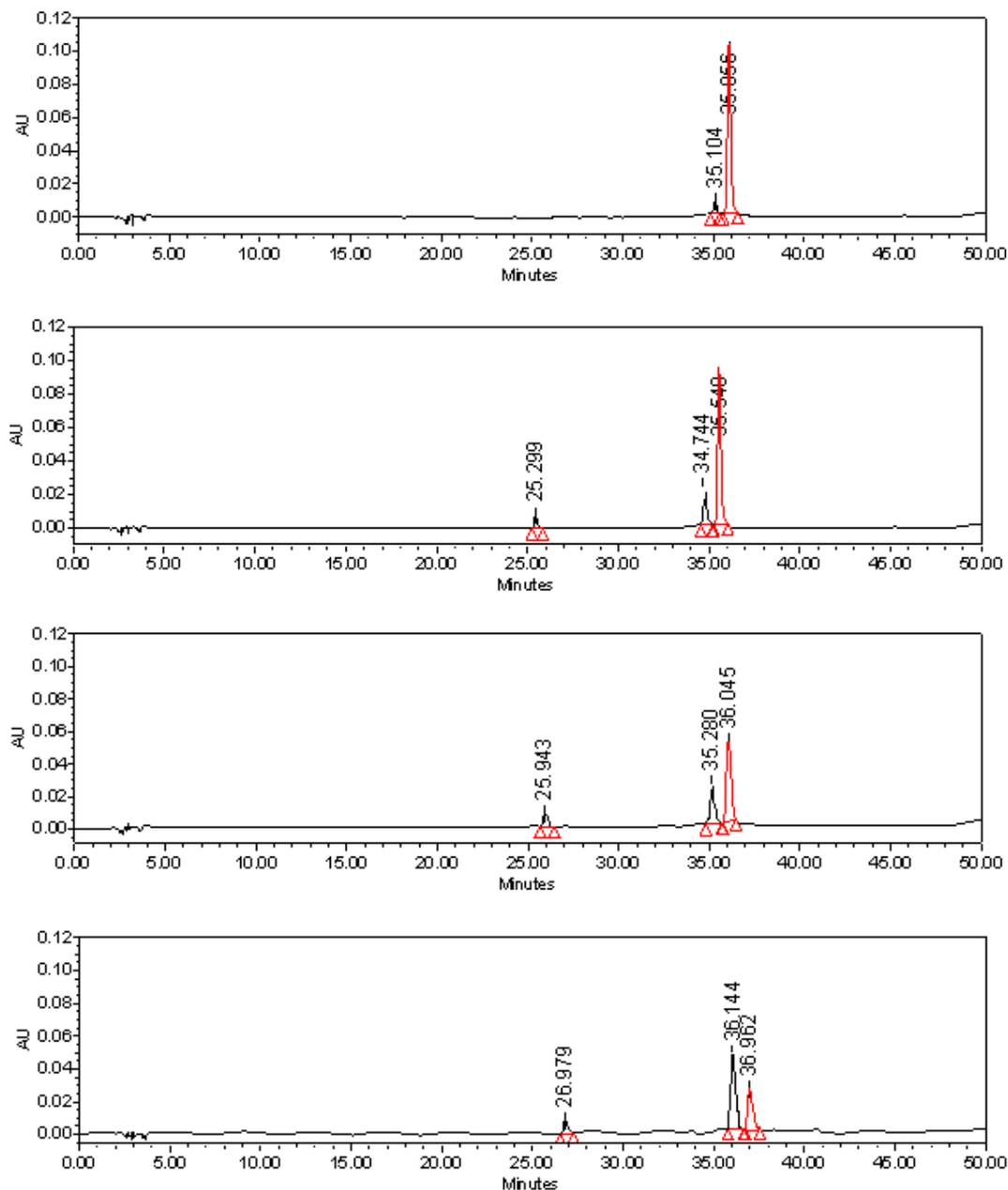


Figura 48 – Cromatogramas da cinchonina A na condição C no tempo zero , 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.

Os cromatogramas obtidos para o estudo de estabilidade em solução (MeOH:H₂O 1:1) da cinchonina A, na condição D, descrita na tabela 9, nos tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias são apresentados na figura 49.

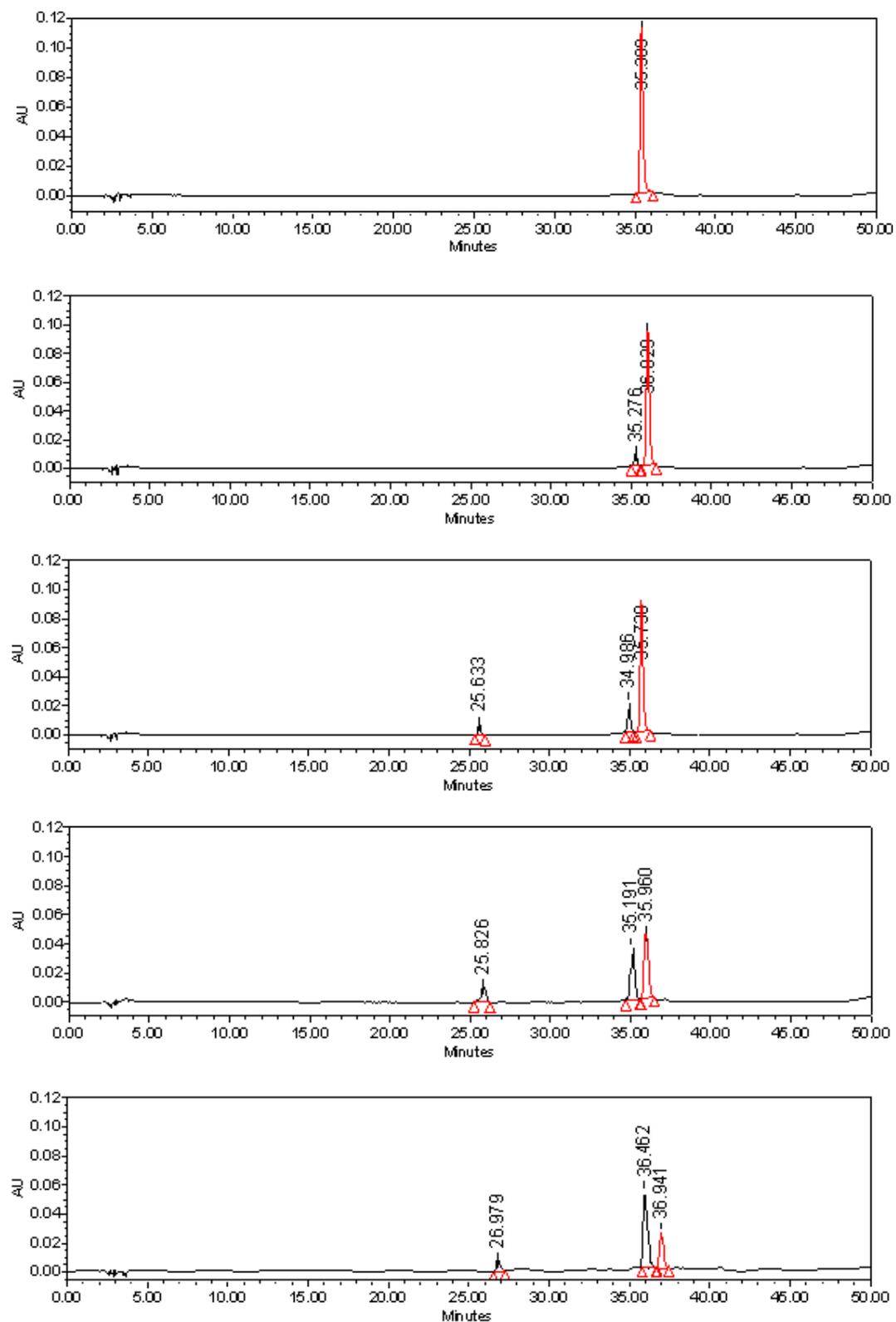
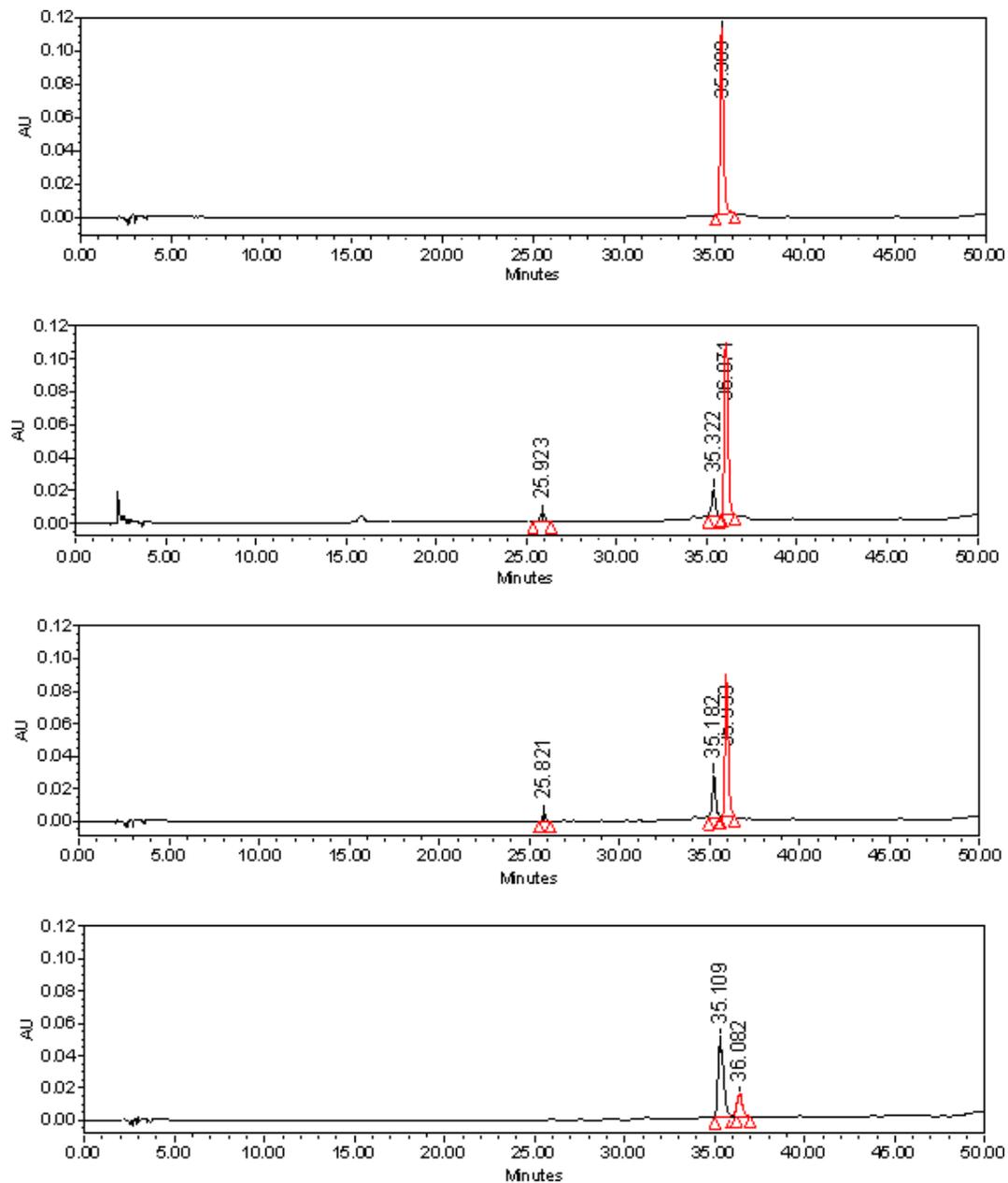


Figura 49 – Cromatogramas da cinchonina A, na condição D no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.

Os cromatogramas obtidos para o estudo de estabilidade em solução (MeOH:H₂O 1:1) da cinchonina A, na condição E, descrita na tabela 9, nos tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias são apresentados na figura 50.



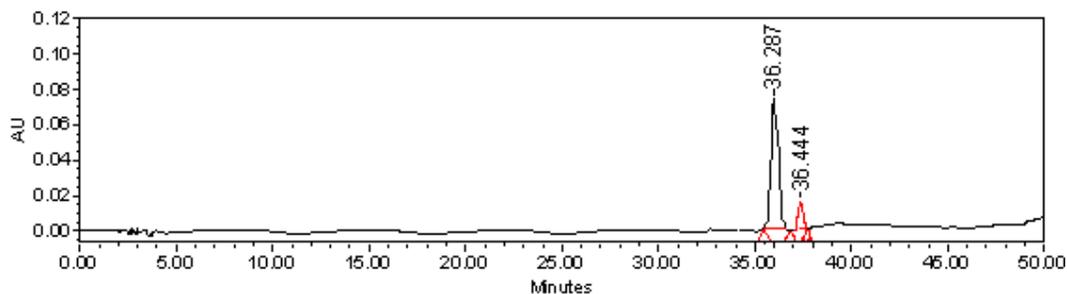


Figura 50 – Cromatogramas da cinchonina A na condição E no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.

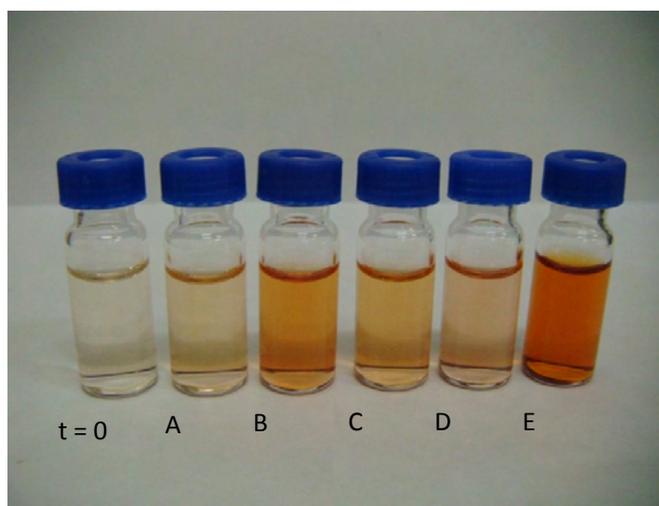


Figura 51: Aspecto das soluções (MeOH:H₂O 1:1) de cinchonina A no tempo zero e após o período de 14 dias nas condições A, B, C, D e E respectivamente.

Na tabela 27 estão apresentados os valores de porcentagem normalizada de área obtida das análises nos tempos 0, 1, 2, 7 e 14 dias e nas condições A, B, C, D e E de armazenamento, considerando a área do pico de cinchonina A no tempo zero como 100%.

Tabela 27: Valores das porcentagens normalizadas da área do pico de cinchonaína A durante o estudo de estabilidade em solução nas diferentes condições de armazenamento.

Tempo	Condição de armazenamento				
	A	B	C	D	E
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1	94,67	95,52	96,32	85,33	81,90
2	89,50	89,16	89,64	75,73	74,98
7	66,62	45,83	49,99	45,14	12,50
14	50,00	33,34	29,17	28,15	8,33

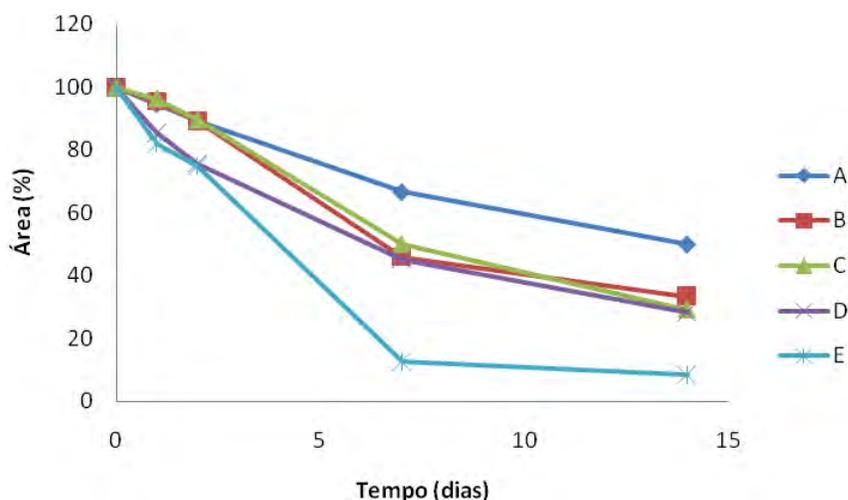


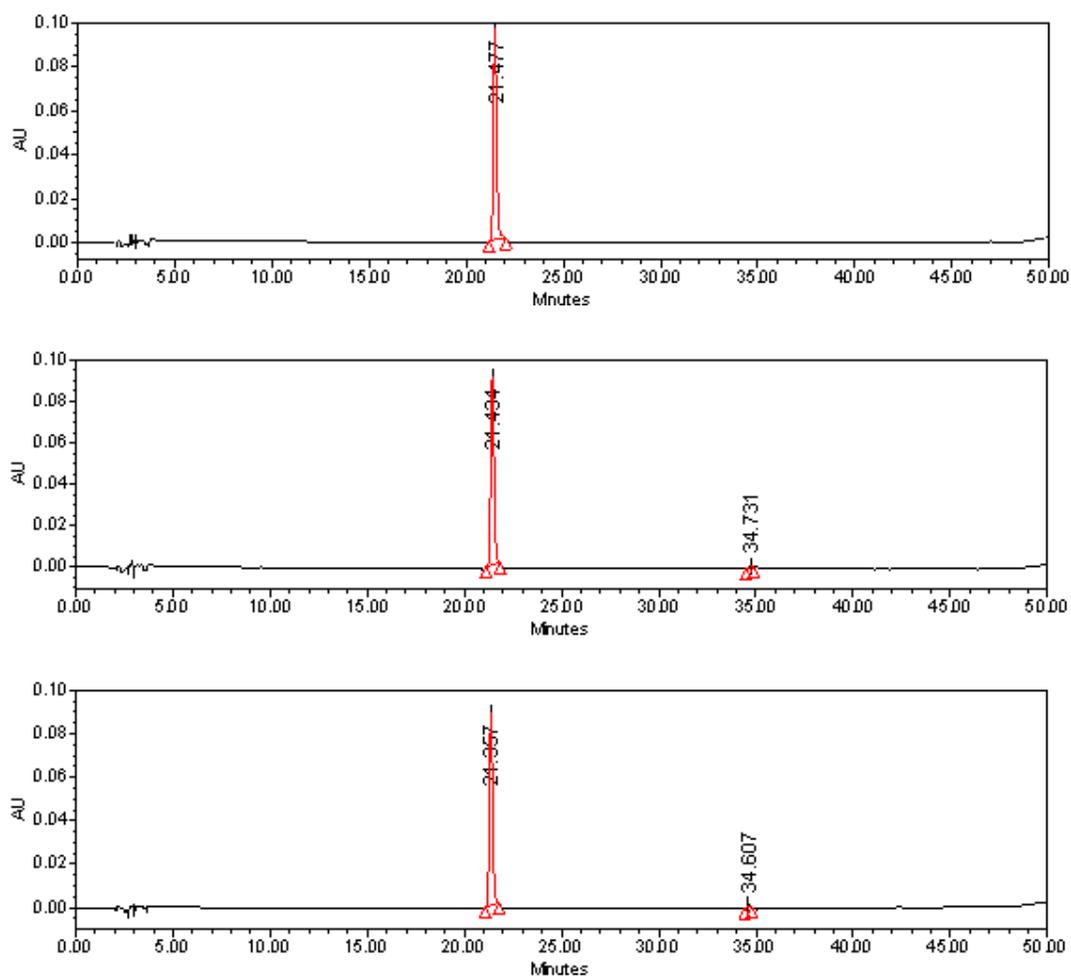
Figura 52: Gráfico do decaimento da área do pico da cinchonaína A durante o período do estudo de estabilidade em solução nas condições A, B, C, D e E.

O gráfico apresentado na figura 52 mostra que para a solução de cinchonaína A armazenada a 8°C (cond. A) houve um retardamento na decomposição da substância enquanto a solução armazenada em câmara climática (cond. E) acelerou a degradação da mesma. Para as outras condições, B, C e D, o comportamento foi

semelhante, com velocidade de degradação intermediária entre os tratamentos A e E.

6.9.2 – Cinchonaína B

Os cromatogramas obtidos para o estudo de estabilidade em solução (MeOH:H₂O 1:1) da cinchonaína B, na condição A, descrita na tabela 9, nos tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias estão apresentados na figura 53.



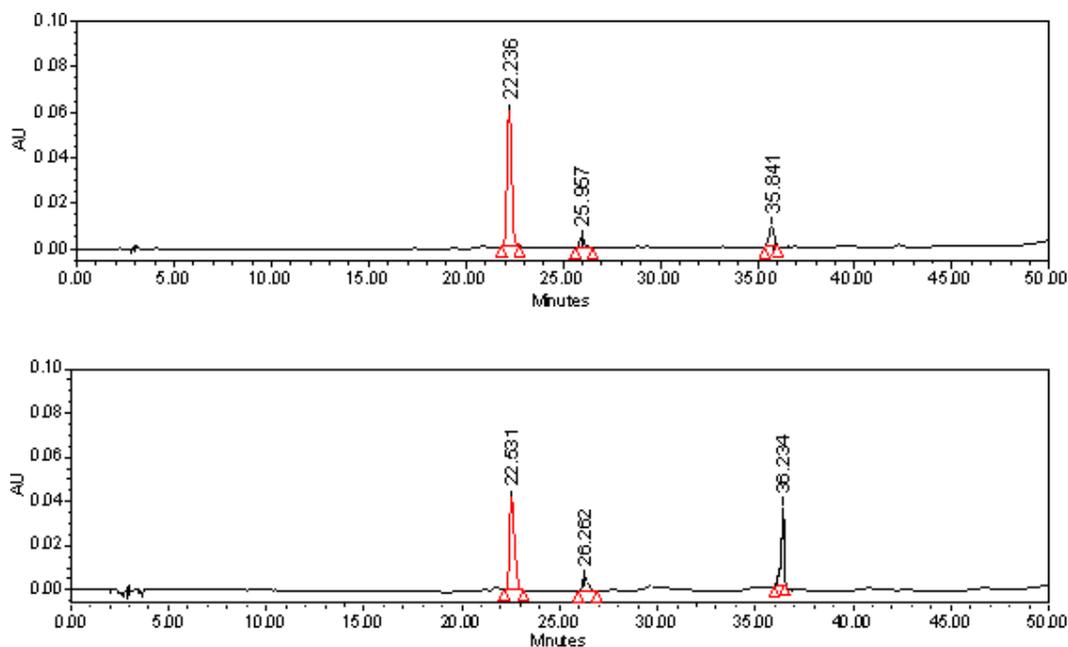
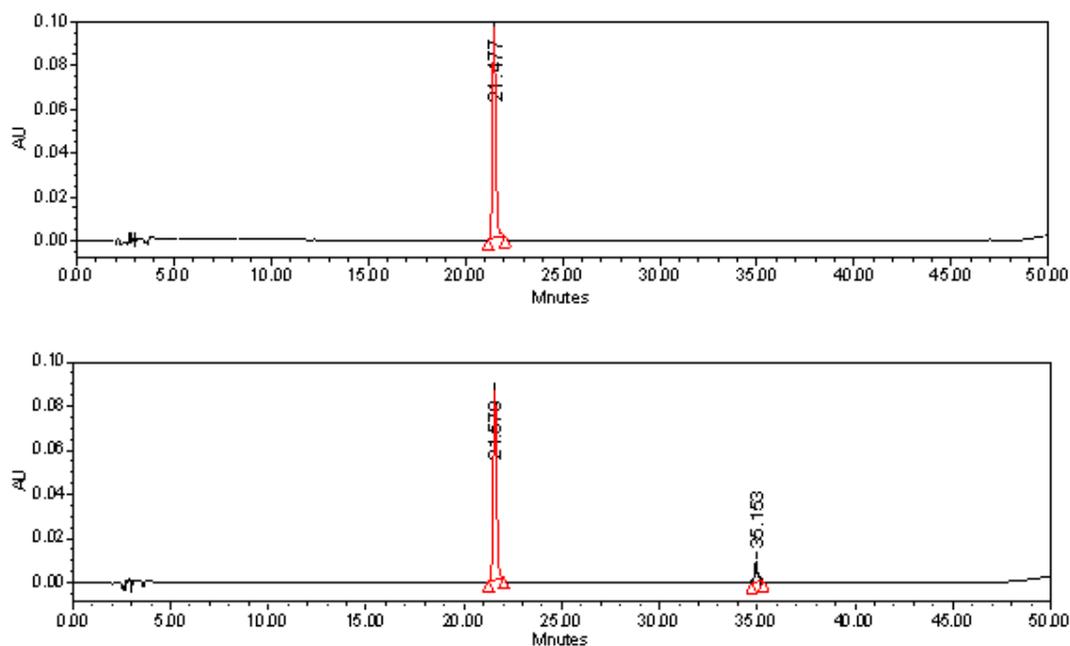


Figura 53 – Cromatogramas da cinchonina B, na condição A no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.

Os cromatogramas obtidos para o estudo de estabilidade em solução (MeOH:H₂O 1:1) da cinchonina B, na condição B, descrita na tabela 9, nos tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias são apresentados na figura 54.



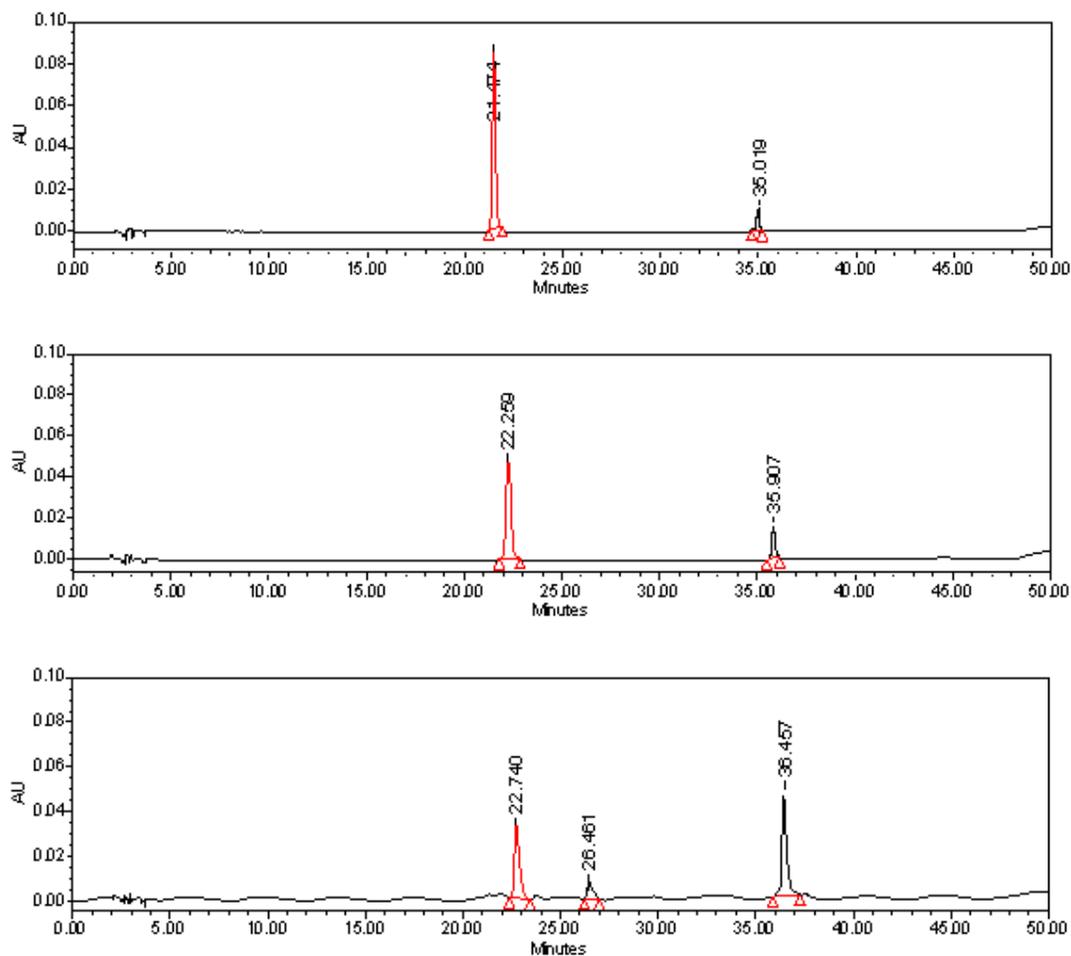
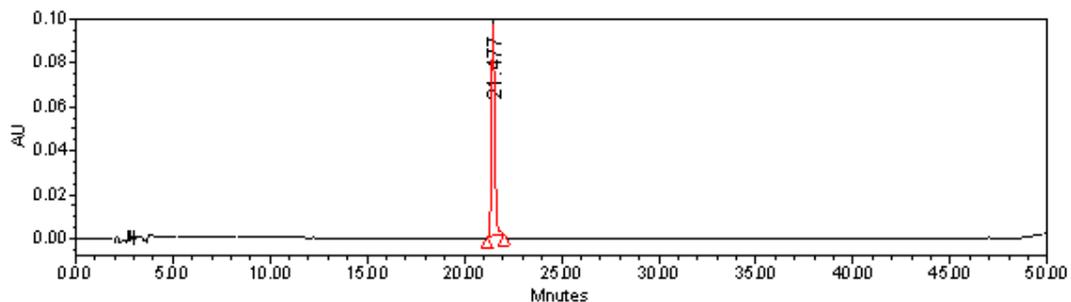


Figura 54 – Cromatogramas da cinchonina B, na condição B, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.

Os cromatogramas obtidos para o estudo de estabilidade em solução (MeOH:H₂O 1:1) da cinchonina B, na condição C, descrita na tabela 9, nos tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias são apresentados na figura 55.



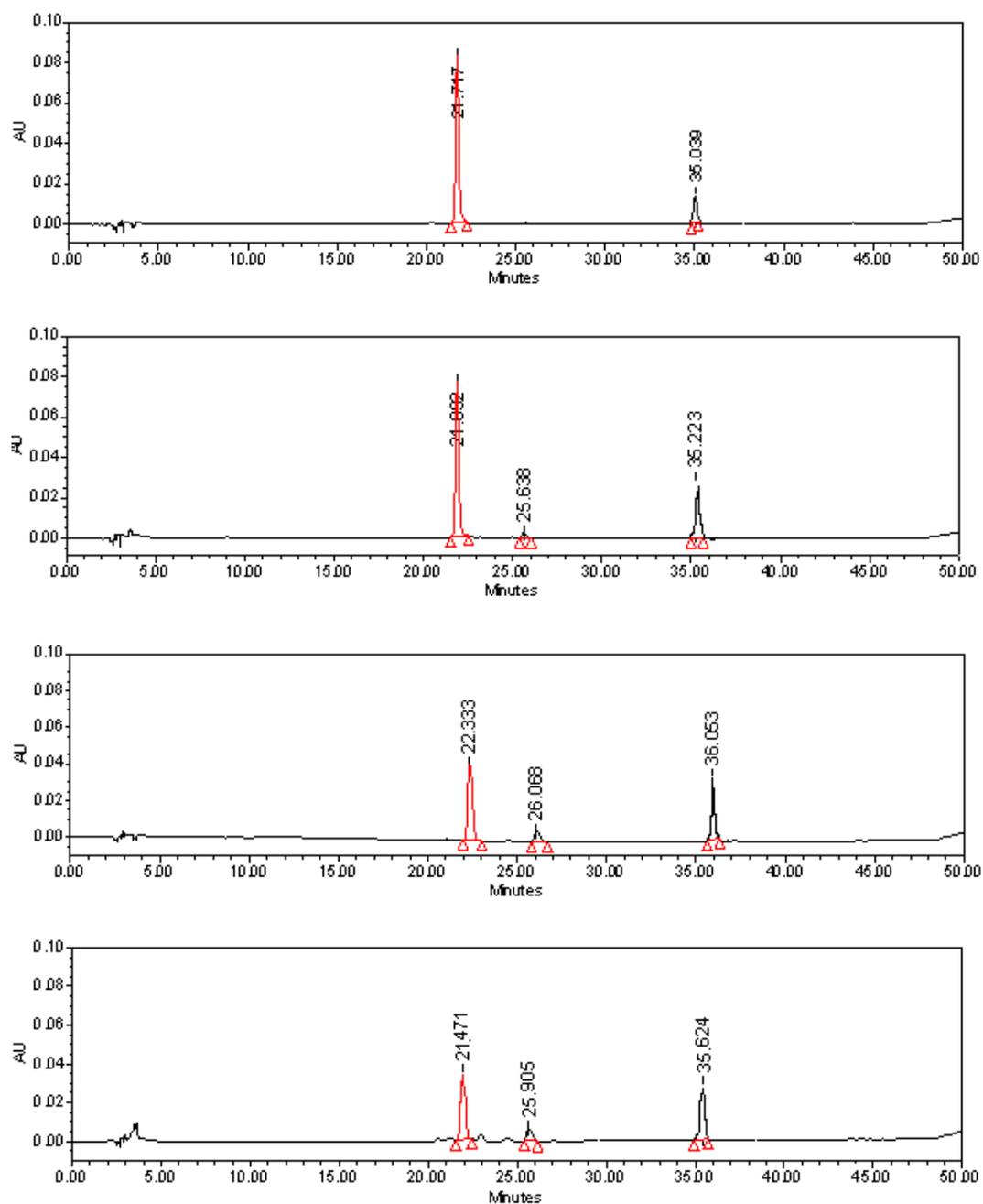


Figura 55 – Cromatogramas da cinchonina B, na condição C, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.

Os cromatogramas obtidos para o estudo de estabilidade em solução (MeOH:H₂O 1:1) da cinchonina B, na condição D, descrita na tabela 9, nos tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias estão apresentados na figura 56.

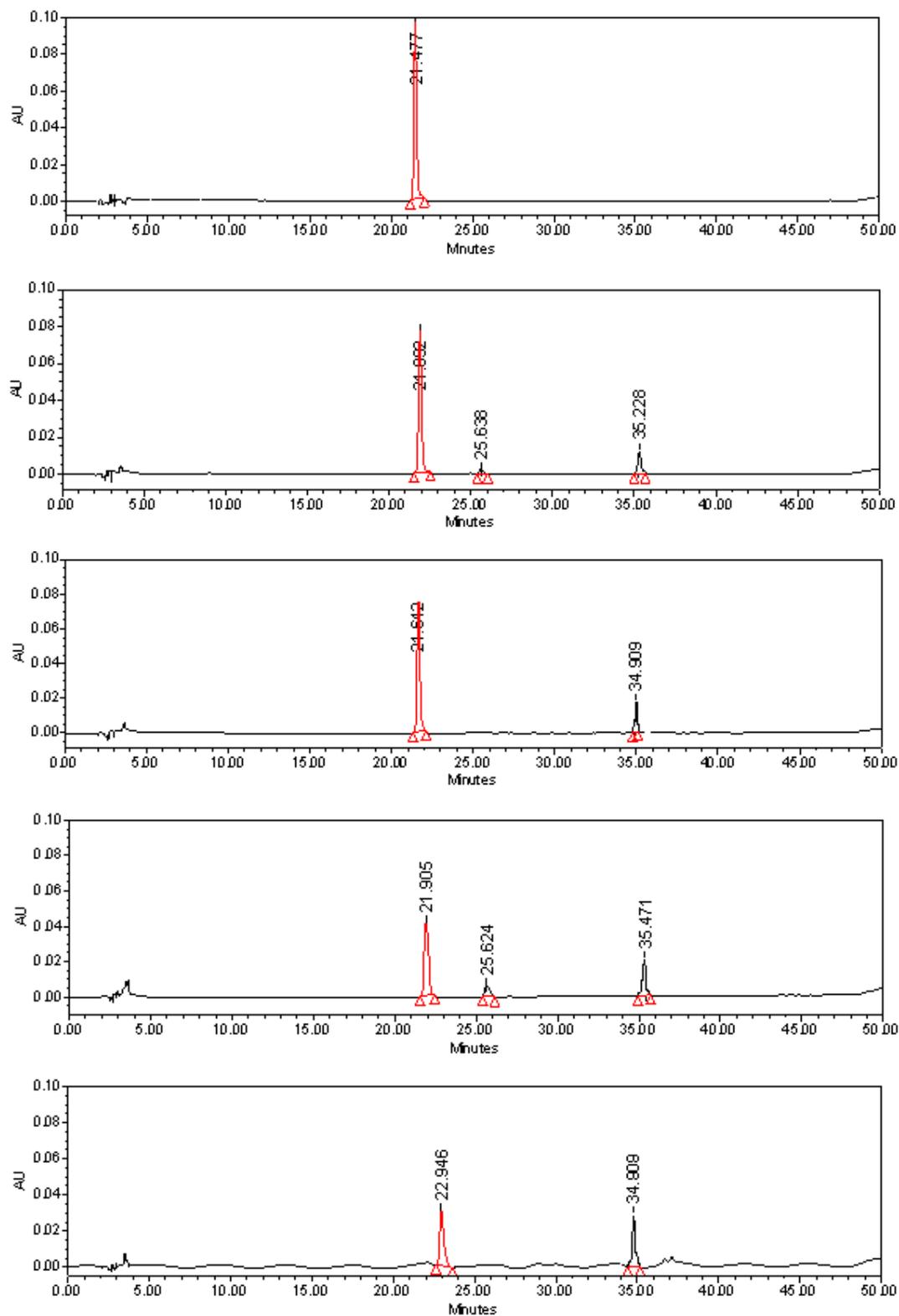
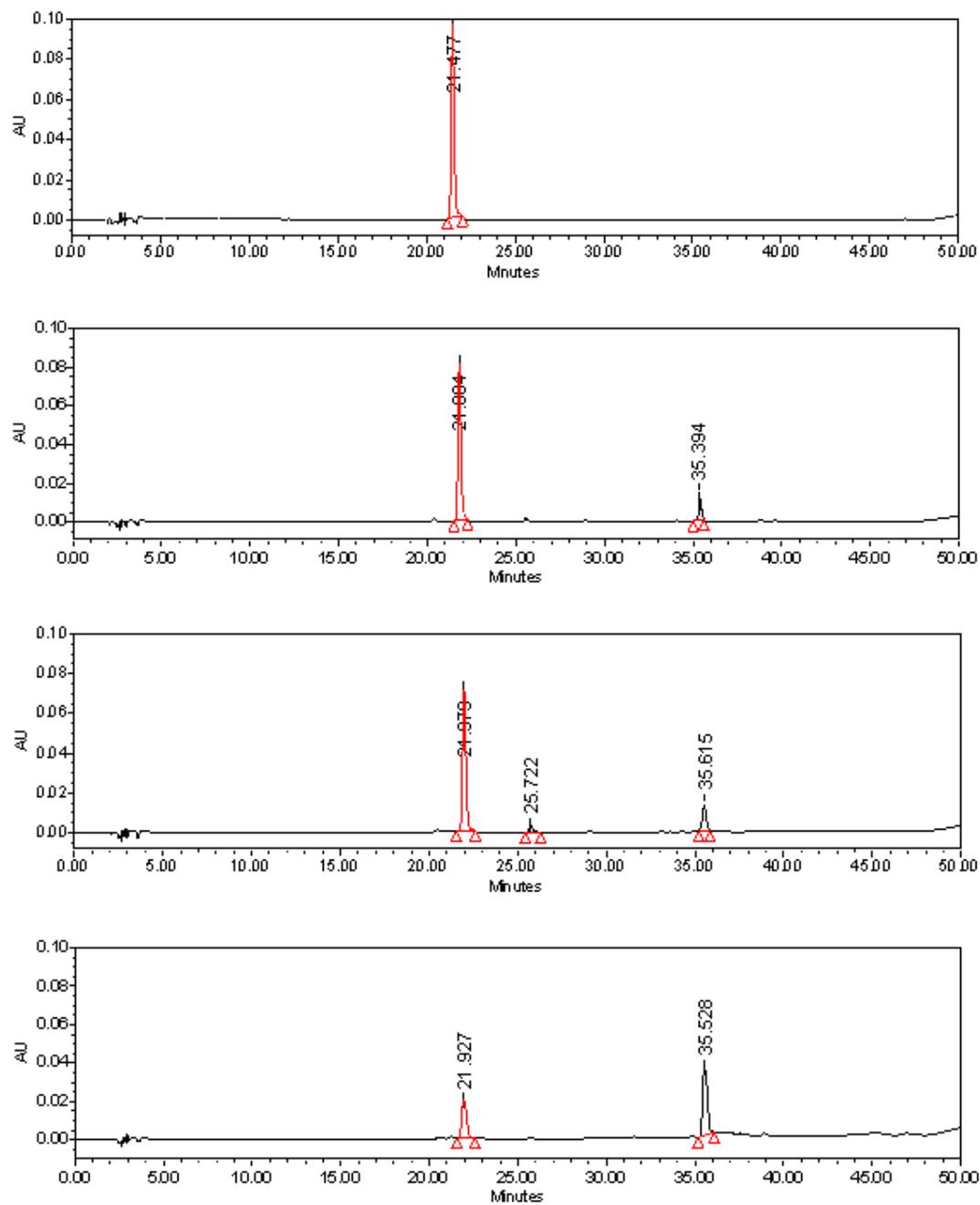


Figura 56 – Cromatogramas da cinchonina B, na condição D, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.

Os cromatogramas obtidos para o estudo de estabilidade em solução (MeOH:H₂O 1:1) da cinchonina B na condição E, descrita na tabela 9, nos tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias estão apresentados na figura 57.



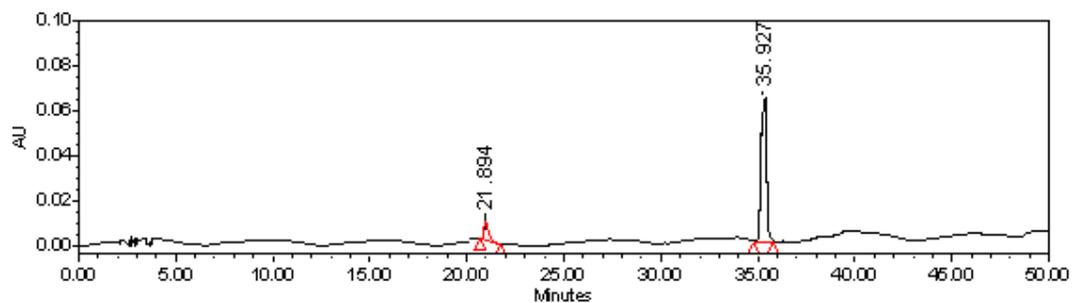


Figura 57 – Cromatogramas da cinchonaína B, na condição E, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.

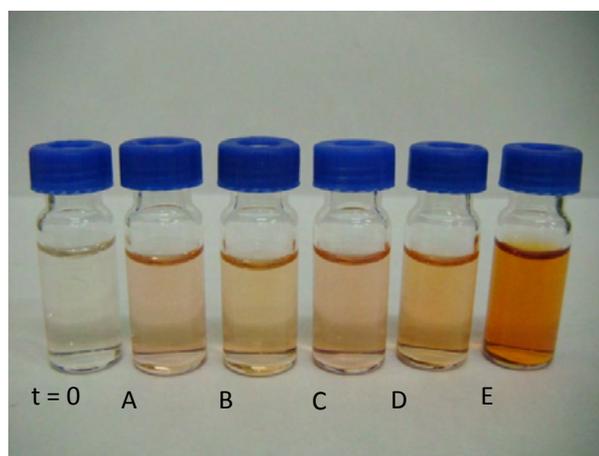


Figura 58: Aspecto das soluções (MeOH:H₂O 1:1) de cinchonaína B no tempo zero e após o período de 14 dias nas condições A, B, C, D e E respectivamente.

Na tabela 28 estão apresentados os valores de porcentagem de área obtidos das análises nos tempos 0, 1, 2, 7 e 14 dias e nas condições A, B, C, D e E de armazenamento, considerando a área do pico de cinchonaína B no tempo zero como 100%.

Tabela 28: Valores das porcentagens normalizadas da área da cinchonaína B durante o estudo de estabilidade em solução nas diferentes condições de armazenamento.

Tempo	Condição de armazenamento				
	A	B	C	D	E
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1	95,99	95,66	94,43	79,99	84,95
2	89,99	90,08	79,99	69,99	66,72
7	64,99	50,00	50,53	45,00	29,97
14	50,00	39,99	40,05	35,00	15,01

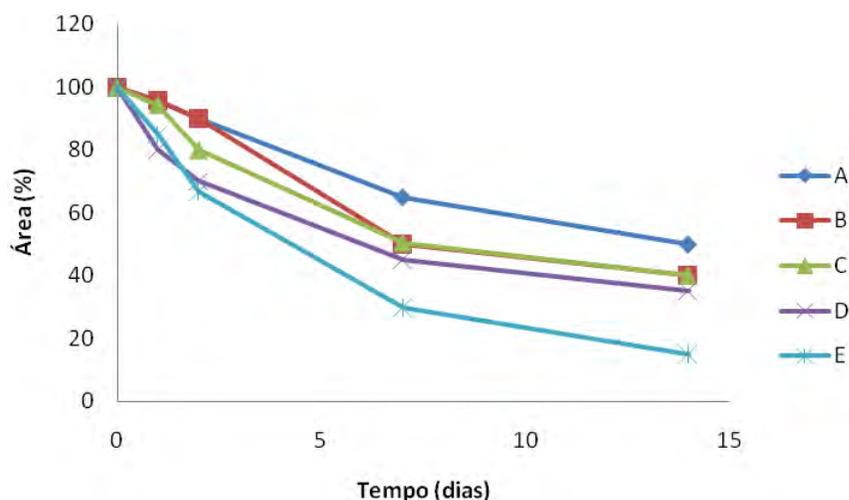
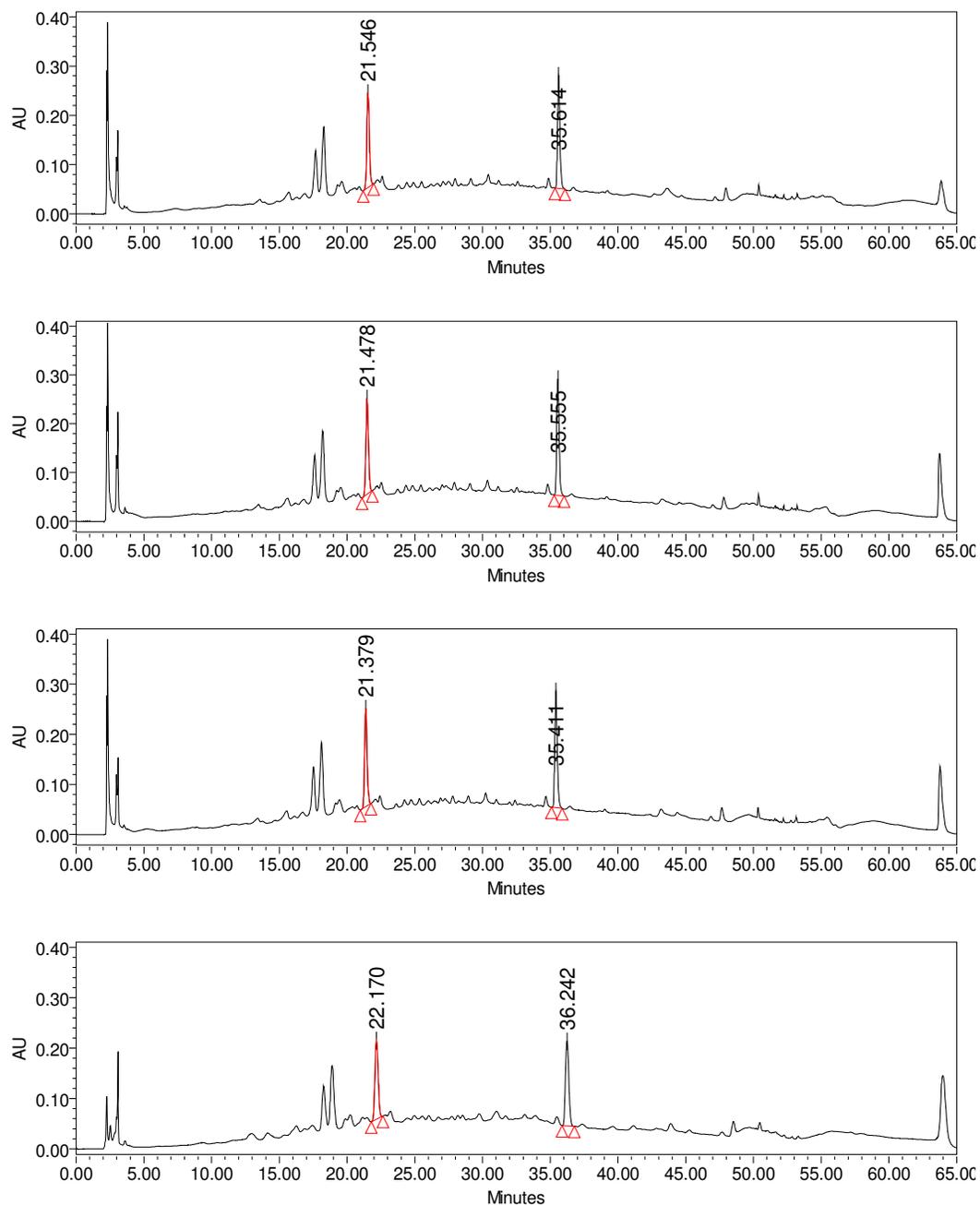


Figura 59: Gráfico do decaimento da área do pico da cinchonaína B durante o período do estudo de estabilidade em solução nas condições A, B, C, D e E.

Assim como para a cinchonaína A, através do gráfico apresentado na figura 59, observa-se um decaimento menor de área para a amostra armazenada a 8°C (condição A) enquanto uma maior degradação ocorre para a amostra armazenada em câmara climática (condição E).

6.9.3 – Estudo de estabilidade do extrato hidroalcolólico de cascas de catuaba

Os cromatogramas obtidos para o estudo de estabilidade em solução do extrato hidroalcolólico de cascas de catuaba, na condição A, descrita na tabela 9, nos tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias estão apresentados na figura 60.



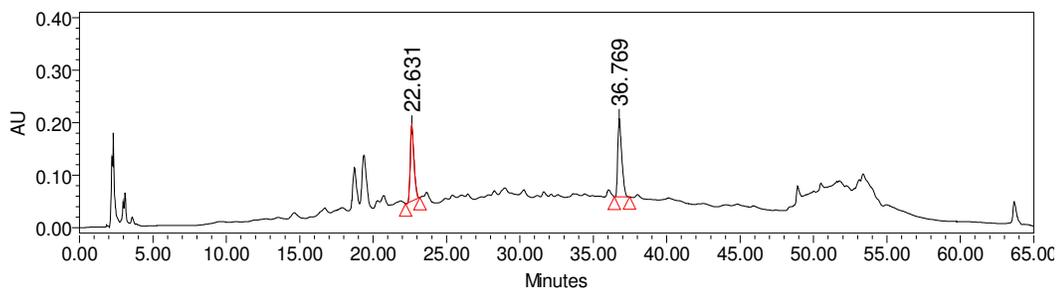
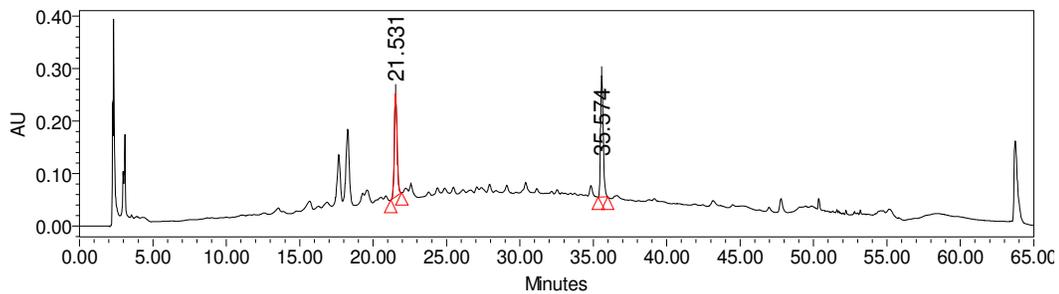
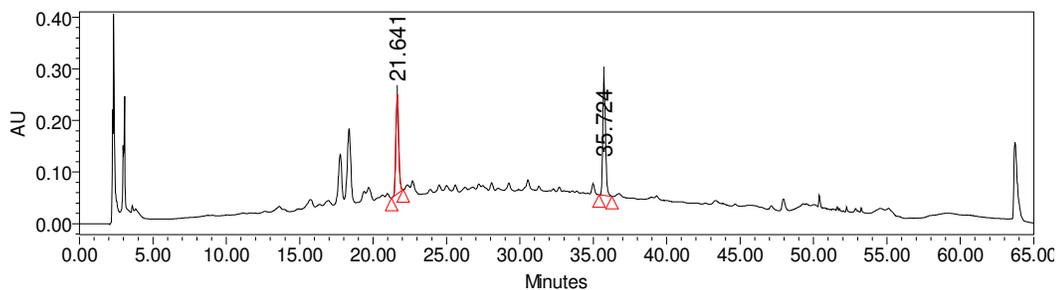
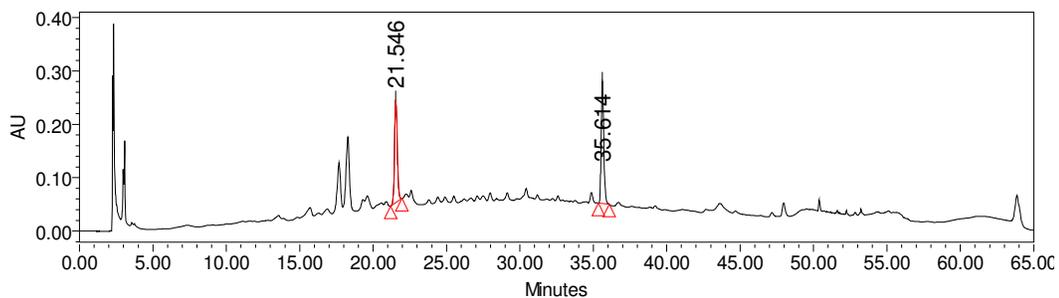


Figura 60 – Cromatogramas do extrato, na condição A, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254\text{nm}$.

Os cromatogramas obtidos para o estudo de estabilidade em solução do extrato hidroalcolico de cascas de catuaba, na condição B, descrita na tabela 9, nos tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias são apresentados na figura 61.



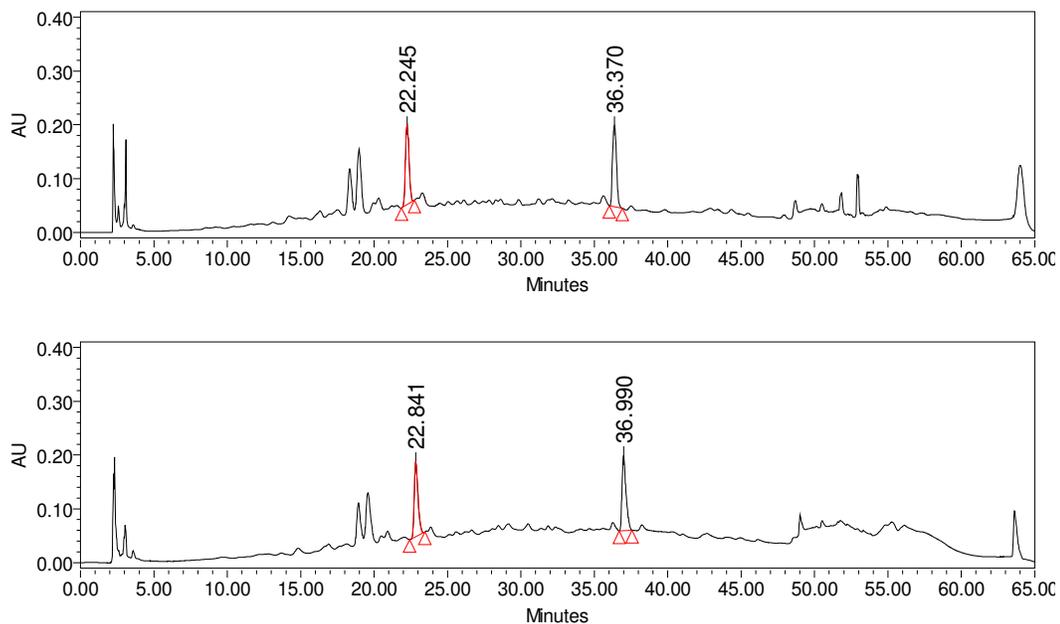


Figura 61 – Cromatogramas do extrato, na condição B, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254$ nm.

Os cromatogramas obtidos para o estudo de estabilidade em solução do extrato hidroalcolico de cascas de catuaba, na condição C, descrita na tabela 9, nos tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias são apresentados na figura 62.

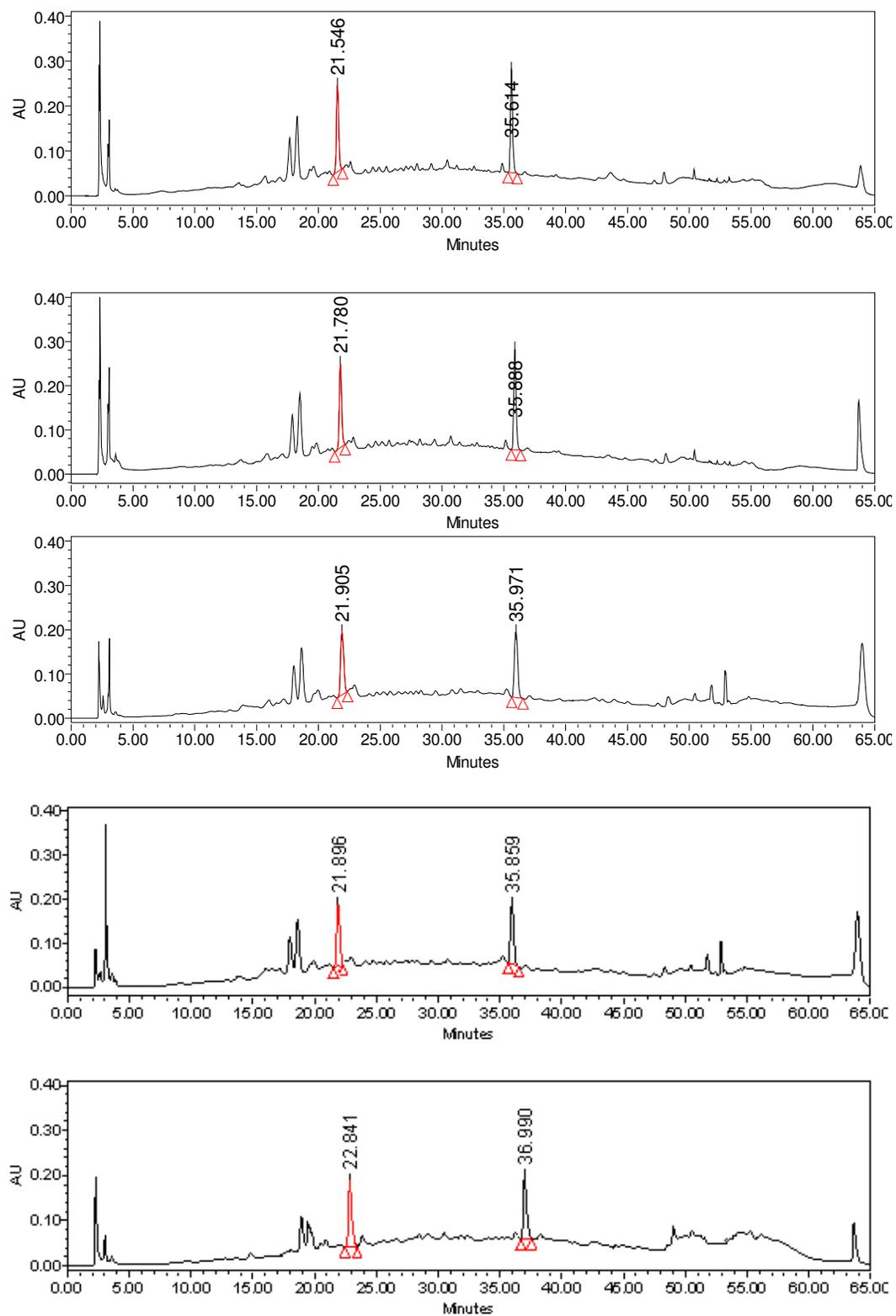
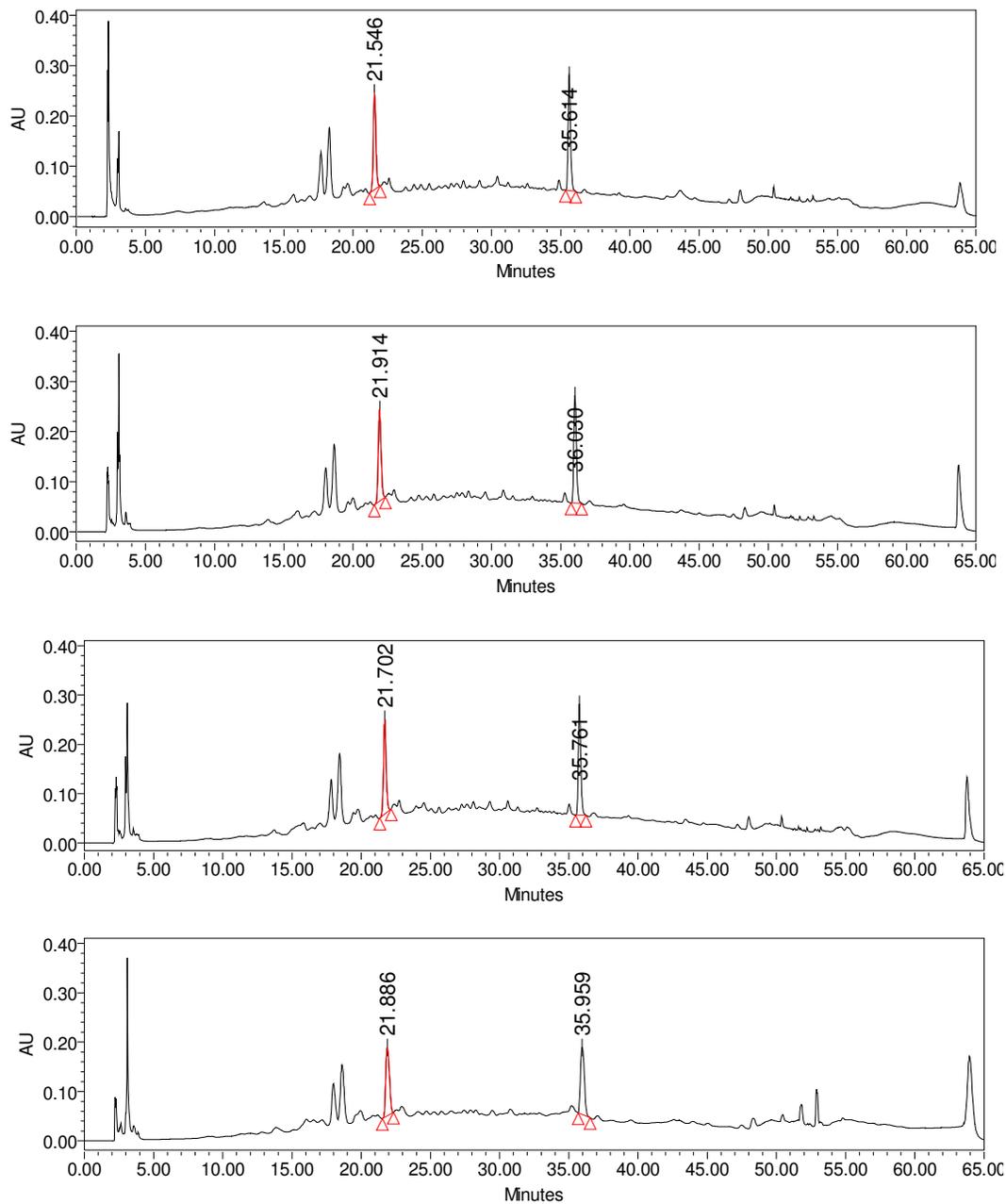


Figura 62 – Cromatogramas do extrato, na condição C, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254\text{nm}$.

Os cromatogramas obtidos para o estudo de estabilidade em solução do extrato hidroalcolólico de cascas de catuaba, na condição D, descrita na tabela 9, nos tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias estão apresentados na figura 63.



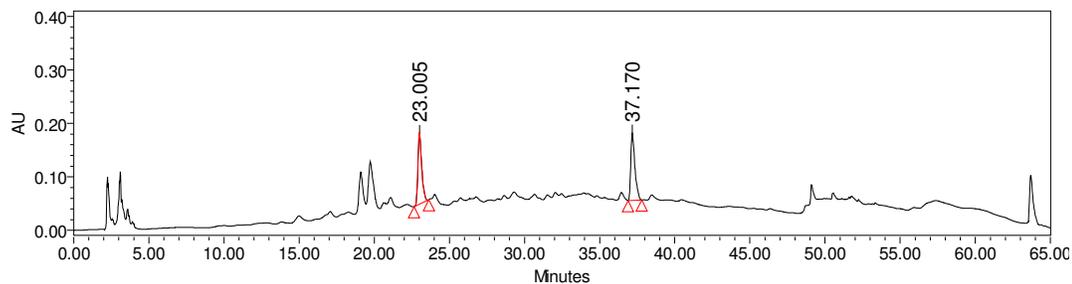
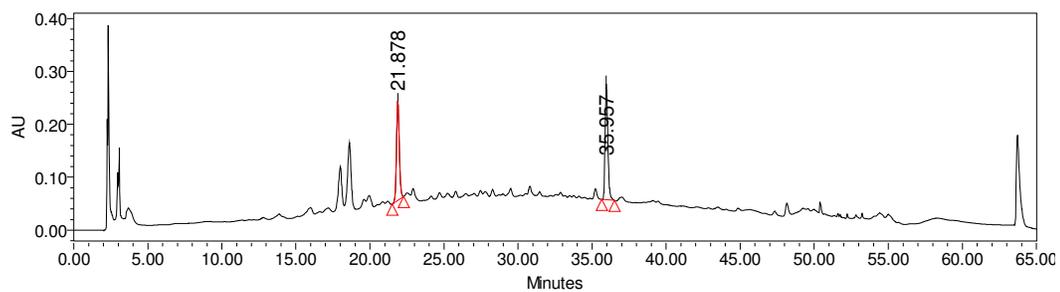
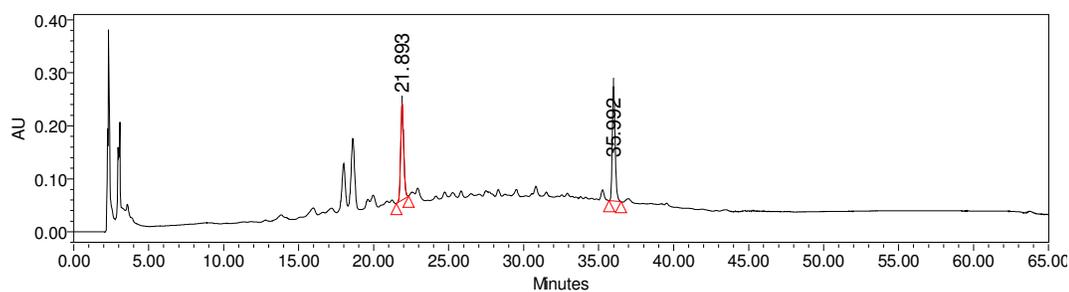
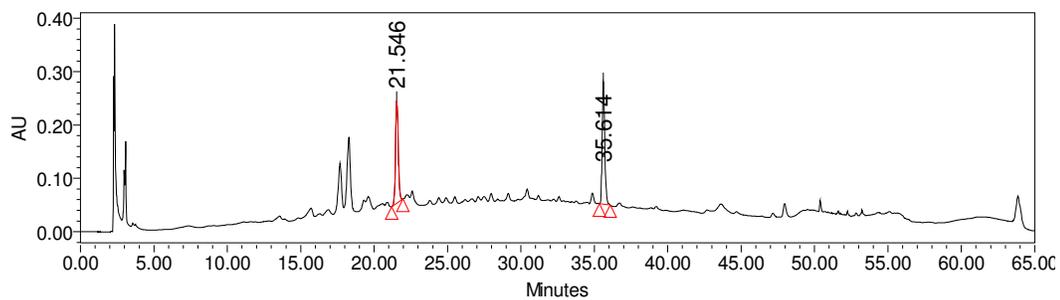


Figura 63 – Cromatogramas do extrato, na condição D, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254\text{nm}$.

Os cromatogramas obtidos para o estudo de estabilidade em solução do extrato hidroalcolólico de cascas de catuaba, na condição E, descrita na tabela 9, nos tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias são apresentados na figura 64.



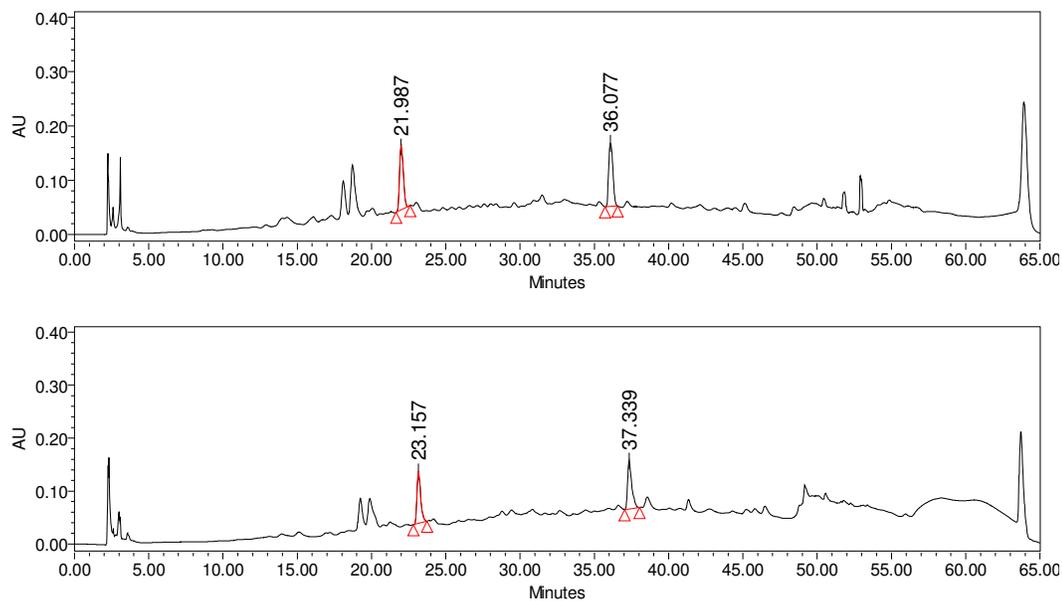


Figura 64 – Cromatogramas do extrato, na condição E, no tempo zero, 1 dia, 2 dias, 7 dias e 14 dias respectivamente, $\lambda = 254\text{nm}$.

Tabela 29: Valores das porcentagens normalizadas de área da cinchonina A durante o estudo de estabilidade do extrato hidroalcolico de catuaba.

Tempo	Condição de armazenamento				
	A	B	C	D	E
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1	99,70	99,90	99,49	98,70	98,10
2	99,70	98,51	98,32	96,94	95,09
7	98,21	98,12	98,15	93,76	79,35
14	98,06	86,00	86,37	78,84	57,68

Tabela 30: Valores das porcentagens normalizadas de área da cinchonaína B durante o estudo de estabilidade do extrato hidroalcolólico de catuaba.

Tempo	Condição de armazenamento				
	A	B	C	D	E
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1	99,80	98,78	98,95	97,53	97,89
2	96,74	95,18	97,52	96,82	89,24
7	95,07	94,05	94,15	93,18	82,85
14	94,07	93,65	94,02	90,73	63,88

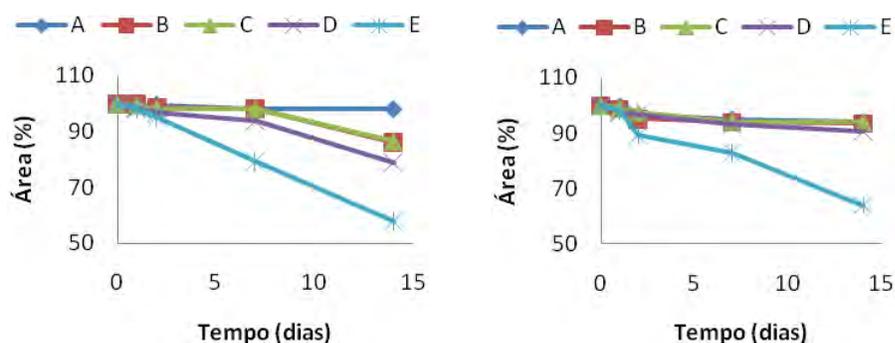


Figura 65: Gráfico do decaimento de área das cinchonaínas A (esquerda) e B (direita) durante o estudo de estabilidade em solução da planta de catuaba.

Os gráficos acima mostram que para as condições A, B, C e D, de armazenamento, a área dos picos correspondentes a cinchonaína A e B não mostram grande variação nos primeiros 7 dias, tendo suas áreas diminuídas mais rapidamente para a condição E.

6.10 – CLAE-EM

6.10.1 – Caracterização do produto de degradação das cinchonaínas

Os cromatogramas apresentados na figura 66 foram obtidos por CLAE-EM, para a caracterização do composto de degradação majoritário.

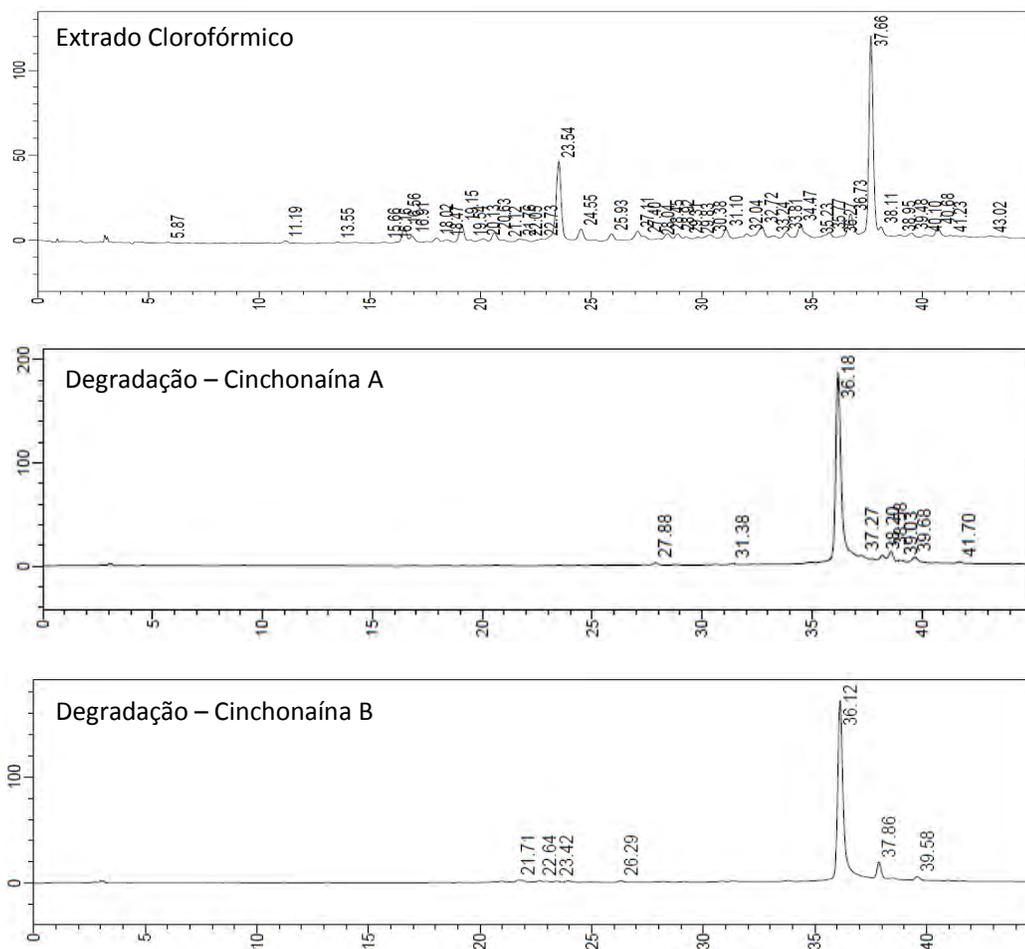
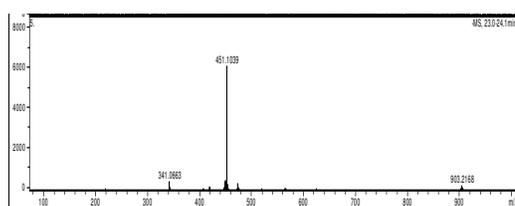
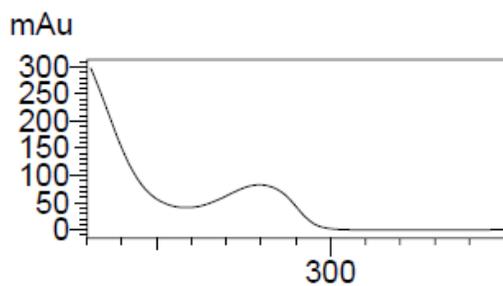
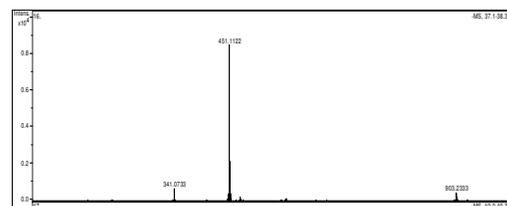
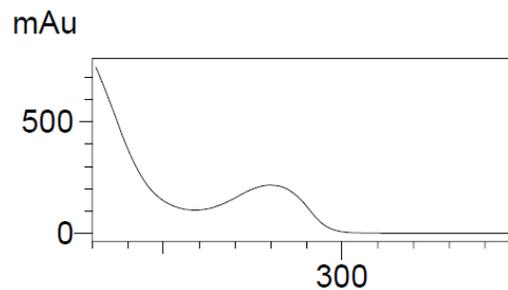
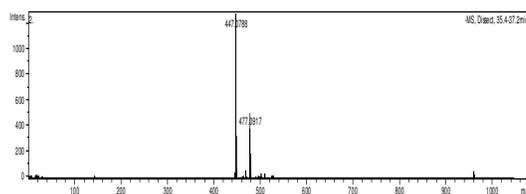
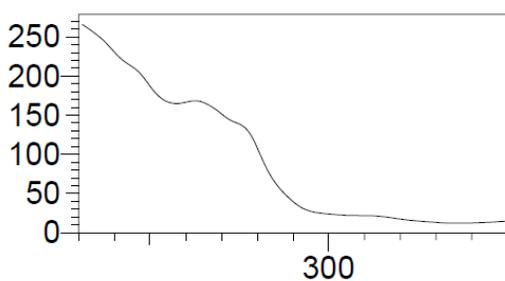
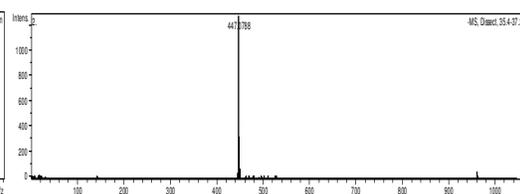
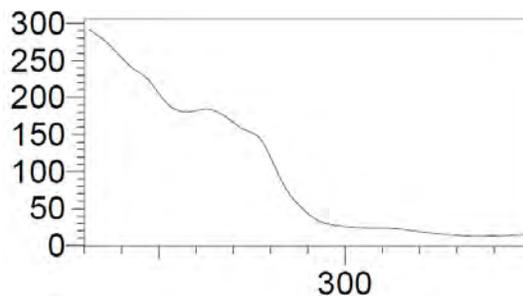


Figura 66: Cromatogramas obtidos por CLAE – EM para identificação do composto de degradação.

Cinchonaina B (TR = 23,54 min.)

**Figura 67:** Espectros de UV e EM da cinchonaina B.

Cinchonaina A (TR = 37,6min.)

**Figura 68:** Espectros de UV e EM da cinchonaina A.**Figura 69:** Espectros de UV e EM da degradação da cinchonaina A.**Figura 70:** Espectros de UV e EM da degradação da cinchonaina B.

A perda de 4,04 unidades de massa (451,10 - 447,07) sugere a perda de 4 átomos de hidrogênio, indicativo da oxidação da molécula nos dois grupos catecólicos (figura 71).

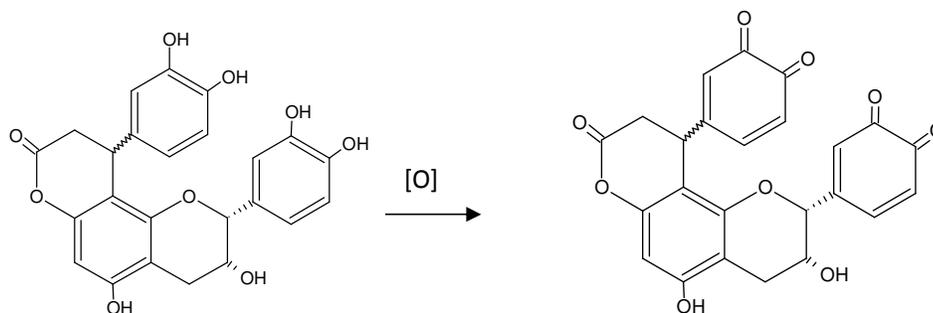


Figura 71: Oxidação da cinchonaína.

6.10.2 – Análise por CLAE-EM do Extrato Clorofórmico

Através da análise do cromatograma do extrato clorofórmico obtido em CLAE-EM (figura 72) é possível observar os picos correspondentes às cinchonaínas A ($t_R = 37,7$ min) e B ($t_R = 26,3$ min), que apresentaram m/z de 451. Porém, outros quatro picos distribuídos simetricamente no cromatograma também apresentaram essa mesma relação m/z , atribuída ao aduto de sódio dessas substâncias (figuras 73). Adicionalmente, o espectro no UV obtido para esses picos também é muito semelhante aqueles obtidos para as duas cinchonaínas isoladas (figuras 67 e 68). Isto sugere que além das cinchonaínas A/B, também podem estar presentes neste extrato outras cinchonaínas, como as cinchonaínas C/D já descritas na literatura para esta planta (PIZZOLATTI *et al.*, 2002) além de outros isômeros de cinchoninas, como proposto na figura 74.

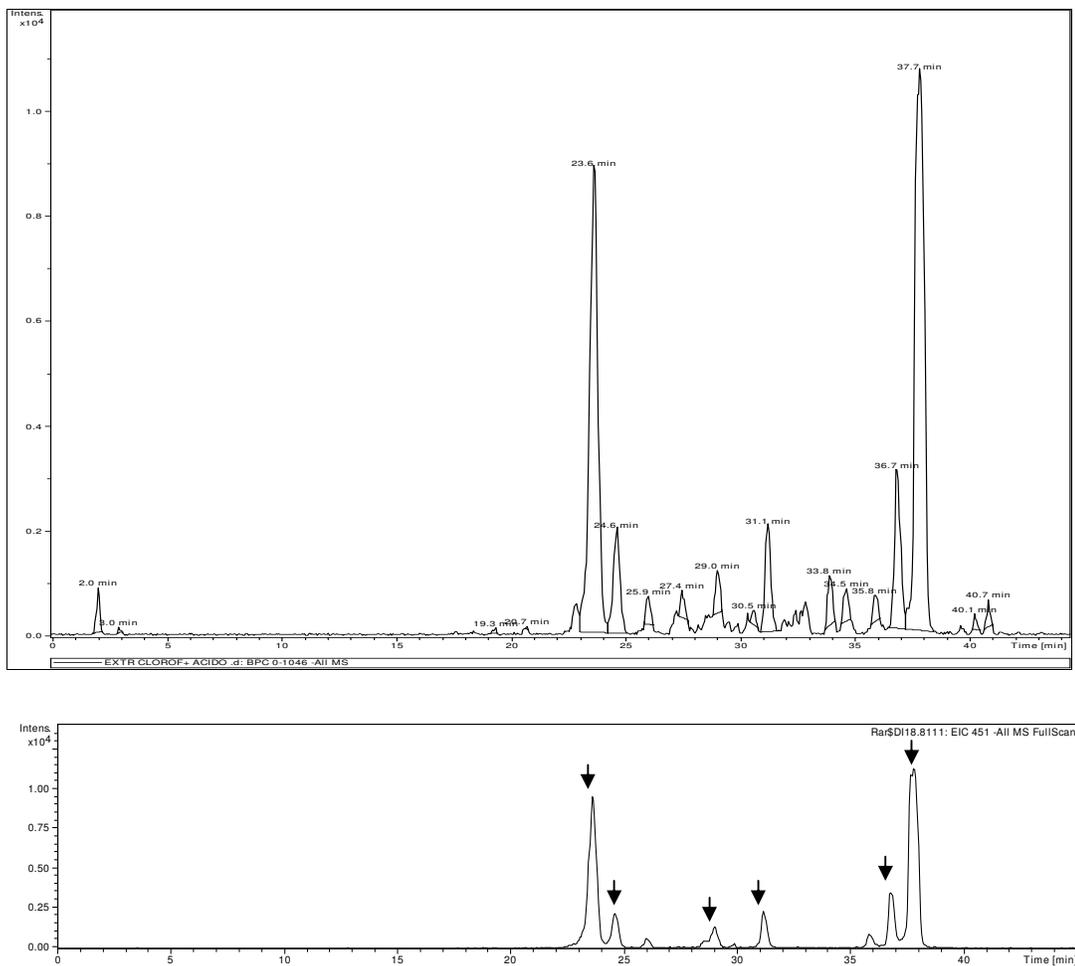


Figura 72: Cromatogramas do extrato clorofórmico de catuaba, com detalhe para os picos com mesmo m/z.

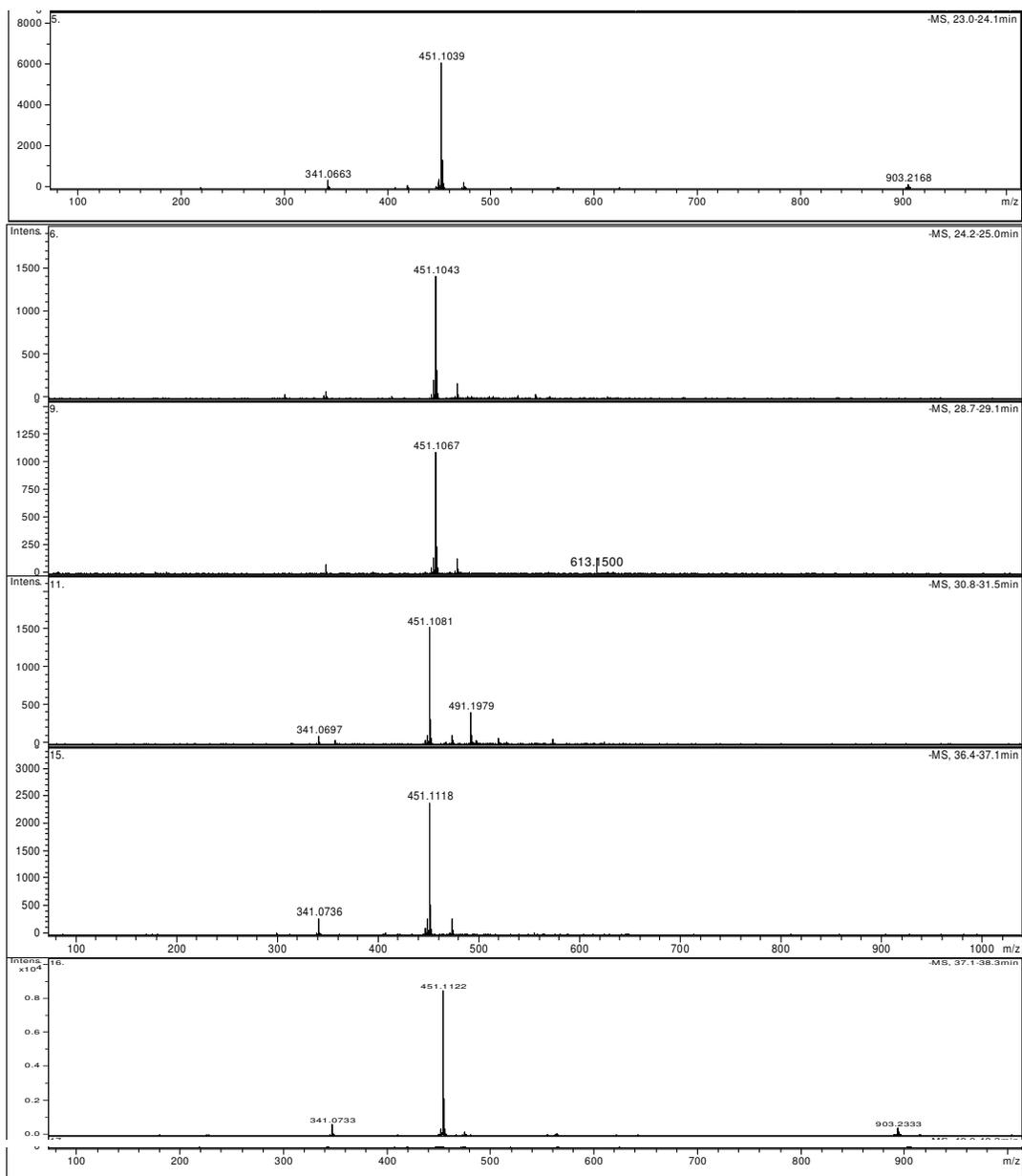
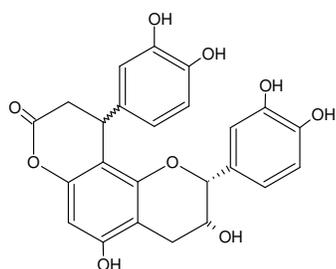
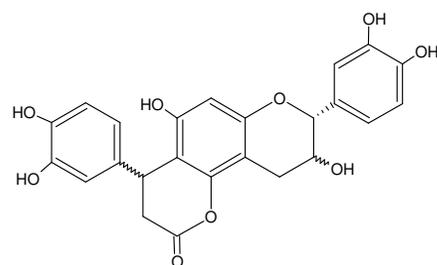


Figura 73: Espectros de massas dos picos destacados na figura 72.



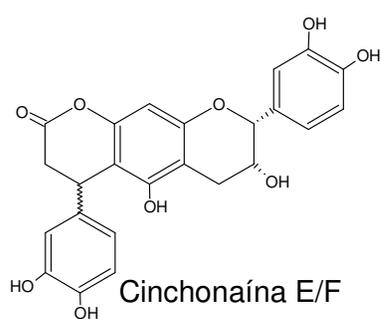
Cinchonaína A/B

(1)



Cinchonaína C/D

(2)



Cinchonaína E/F

(3)

Figura 74: Estruturas químicas das cinchonaínas A/B (1), cinchonaínas C/D (2) e estruturas propostas para cinchonaínas E/F (3).

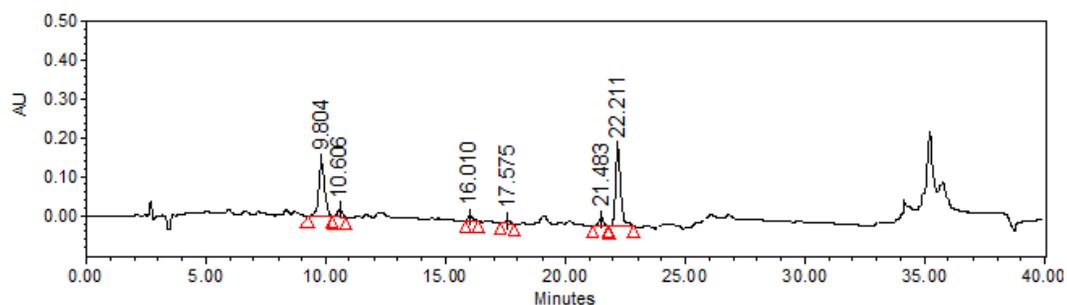
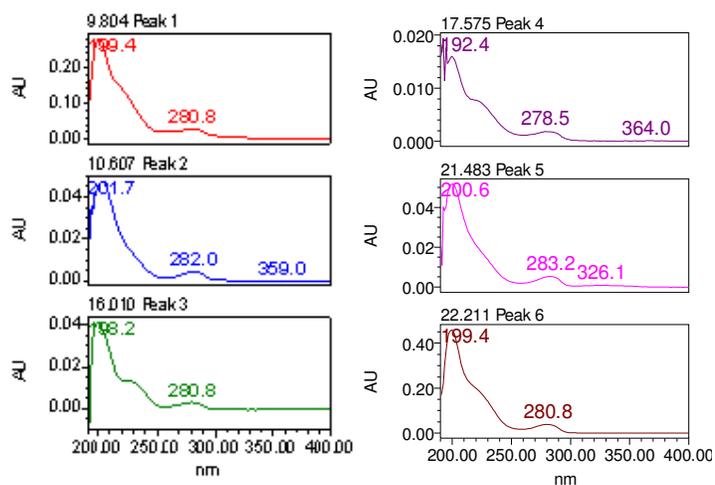
Diante destas observações, propôs-se uma condição cromatográfica para análise de cinchonaínas totais do extrato clorofórmico de cascas de catuaba. A condição cromatográfica é descrita na tabela 33 e o cromatograma apresentado na figura 75.

Tabela 31: Condição cromatográfica para determinação de cinchonainas totais.

Tempo (min)	Fase A* (%)	Fase B** (%)
0	70	30
30	40	60
31	0	100
35	0	100
36	70	30
40	70	30

* Ácido acético 0,1 %

** MeOH

**Figura 75:** Cromatograma do extrato clorofórmico para determinação de cinchonainas totais, $\lambda = 254$ nm.**Figura 76:** Espectros de UV dos picos correspondentes ao cromatograma apresentado na figura 75.

7 - Discussão dos resultados

Cinchonaínas A e B são os fenólicos majoritários do extrato hidroalcoólico de cascas de catuaba e podem ser relacionados às atividades antibacteriana e antioxidante já relatadas na literatura (TANG et al., 2007). Por isso foram escolhidas

O extrato hidroalcoólico de catuaba foi submetido à extração líquido-líquido (LLE) com EtOH/H₂O/CHCl₃, fornecendo a fração clorofórmica, enriquecida em cinchonaínas, com rendimento de 1,03 %.

Através do fracionamento em CLAE preparativo obtiveram-se as duas cinchonaínas majoritárias, identificadas por EM de alta resolução e RMN de ¹H e RMN de ¹³C. A pureza dessas substâncias, determinada cromatograficamente e por análise térmica, foi de 88,82% para cinchonaína A e de 92,54% para cinchonaína B.

Otimizou-se também as condições de preparação do extrato hidroalcoólico das cascas de catuaba enriquecido em cinchonaínas, avaliando-se parâmetros como a proporção de solvente, tempo e temperatura, bem como a proporção planta/solvente. As condições definidas para o preparo das amostras para análises qualitativas e quantitativas ficaram assim estabelecidas: extração por refluxo a 60°C por 1 hora de 2 g da planta com 20 mL de EtOH:H₂O (1:1).

Para a quantificação dos extratos de catuaba e para a realização do estudo de estabilidade, conforme resolução RE 48 da ANVISA, o método proposto foi validado de acordo com parâmetros descritos na resolução RE 899, da ANVISA para métodos analíticos e bioanalíticos. De acordo com os parâmetros determinados o método é considerado válido.

Os cromatogramas obtidos no estudo de estabilidade comprovam a degradação das substâncias quando estas são armazenadas em solução (MeOH:H₂O 1:1). Maior degradação foi observada para as substâncias mantidas em câmara climática, isto ocorre, pois a câmara climática oferece condições mais drásticas de temperatura (40°C) e umidade (75% UR) em relação às condições “normais”, o que acelera a degradação.

Os estudos de estabilidade acelerada destes compostos indicam que os padrões de cinchonaína A e B podem ser mantidos secos sob condições ambientais por um prazo estimado de dois anos, devendo ser confirmado pelo estudo de estabilidade de longa duração. No entanto, em solução hidrometanólica (MeOH:H₂O 1:1) ocorre rápida oxidação com formação das di - orto – quinonas, indicando que as soluções mães desses padrões não podem ser estocados por mais de 1 dia.

O perfil cromatográfico das soluções hidrometanólicas da planta não apresentou alteração durante o período de 7 dias, indicando que amostras podem ser preparadas e estocadas por esse período.

Sabendo que para o registro de um fitoterápico a ANVISA exige que o mesmo tenha um marcador químico e que este marcador seja monitorado, tanto nos processos industriais como no controle de qualidade e estudos de estabilidade, este trabalho teve uma importante contribuição já que comprovou a possível utilização dos padrões de cinchonaínas A e B para monitoração e padronização de extratos polares de catuaba.

É relevante ressaltar também que, conforme os estudos de estabilidade do extrato hidroalcolico, houve a degradação das cinchonaínas A e B após o período de sete dias, portanto se faz necessário reavaliar a utilização das tinturas de catuaba, que provavelmente após este período, muito pouco ou nada restaria destas substâncias, sendo interessante estudar as possíveis atividades biológicas das di-orto quinonas, resultantes da degradação das cinchonaínas A e B.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 398, de 12 novembro 2004. Guia para a realização do estudo de estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 nov. 2004a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 48, de 16 março 2004. Registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 18 mar. 2004b.

ALADESANMI, A. J.; ODERIAN, S. A. Antimicrobial activity of *Trichilia heudelotti* leaves. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 179-182, 2000.

ARIAS, A. R.; HIRSCHMANN, G. S. The effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans* bugs. **Fitoterapia**, v. 59, n. 2, p. 148-149, 1988.

AWE, S. O.; MAKINE, J. M. Antimalarial effects of the stem bark aqueous extracts of three *Kaya* species. **Fitoterapia**, v. 62, n. 6, p. 467-473, 1991.

BALOGUN, A. M.; FETUGA, B. L. Fatty acid composition of seed oils of some members of the Meliaceae and Combretaceae families. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 62, p. 529-531, 1985.

BANERJI, B.; NIGAM, S. K. Wood constituents of meliaceae: a review. **Fitoterapia**, v. 55, n. 1, p. 3-36, 1984.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. Viçosa: Ed. UFV, 1984. v. 2, p. 283-303.

BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; CALLORI, S.; MAZZI, G.; VINCIERI, F. F. Stability of the constituents of calendula, milk-thistle and passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 30, p. 613-624, 2002.

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

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 500.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin American: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A. Herbal medicine catuama induces endothelium-independent vasorelaxant action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. **Phytotherapy**, v. 11, p. 32-38, 1997.

CAMPOS, M. M.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Antidepressant like effects of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract: evidence for dopaminergic mediated mechanisms. **Psychopharmacology**, v. 182, p. 45-53, 2005.

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

CHAURET, D. C.; DURST, T.; ARNASON, J. T.; SANCHES-VINDAS, P.; ROMAN, L. S.; POVEDA, L.; KEIFER, P. A. Novel steroids from *Trichilia hirta* as identified by nanoprobe inadequate 2D-NMR spectroscopy. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 44, p. 7875-7878, 1996.

CORDEIRO, G. A. **Desenvolvimento de metodologias espectroscópicas multivariadas para quantificação de fármacos em formas farmacêuticas**. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)- Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CORTEZ, D. A. G.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, A. G. Limonoids from *Trichilia hirta*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 625-628, 1992.

CUNHA, P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

FEIDEN, K. (Ed.). **Arzneimittelprufrichtlinien**. Stuttgart: Wissenschaftl, 1994.

GEORGE, A.; DOMINIC, A. Okorie. Heudebolin: a new limonoid from *Trichilia heudelotii*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 3007-3008, 1973.

HEIGL, D.; FRANZ, G. Stability testing on typical flavonoid containing herbal drugs. **Die Pharmazie**, v. 12, p. 881-885, 2003.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 6. ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1983.

JUD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematics**: a phylogenetic approach. 3rd ed. Sunderland: Sinauer, 1999. p. 336-337.

KLEIN, R. M. **Flora ilustrada catarinense**: meliáceas. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1984. p. 138.

KOUL, O.; ISMAN, M. B.; KETKAR, C. M. Properties and use of neem *Azadiracta indica*. **Canadian Journal of Botany**, v. 68, n. 1, p. 1-11, 1990.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, cap. 256, p. 1277-1355.

LAGOS, J. B.; MIGUEL, O. G.; DUARTE, M. R. Caracteres anatômicos de catuaba. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 2, p. 185-190, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1992. p. 231-234.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. p. 203-419.

LOWEN, D.; HABS, M.; KLIMM, H. D.; TRUNZLER, G. **Phytopharmakareport**. 2. Aufl. Darmstadt: Steinkopff, 1999. p. 1.

MATOS, A. P.; NEBO, L.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. da; RODRIGUES, R. R. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* and *T. catiguá* (Meliaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1553-1556, 2009.

MIKOLAJCZAK, K. L.; ZILKOWSKI, B. W.; BARTELT, R. J. Effect of meliaceous seed extracts on growth and survival of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, n. 1, p. 121-128, 1989.

- MUSZA, L. I.; KILLAR, I. M.; SPEIGHT, P.; BARROW, C. J.; GILLUM, A. M.; COOPER, R. Minor limonoids from *Trichilia rubra*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 621-624, 1995.
- NAKATANI, M.; IWASHITA, T.; NAOKI, H.; HASE, T. Structure of a limonoid antifeedant from *Trichilia roka*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 1, p. 195-196, 1985.
- NUDELMAN, N. S. **Estabilidade de medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneo, 1976. p. 186.
- OLUGBADE, A. T. Tetracyclic triterpenoids from *Trichilia prieuriana* leaves. **Phytochemistry**, v. 30, n. 2, p. 698-700, 1991.
- OLUGBADE, A. T.; ADESANYA, A. A. Prieurianoside, a protolimonoid glucoside from the leaves of *Trichilia prieuriana*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 8, p. 867-870, 2000.
- PENNINGTON, T. D.; STYLES, B. T. A generic monograph of the meliaceae. **Blumea**, v. 22, p. 419-540, 1975.
- PIZZOLATTI, M. G.; VENSON, F. A.; SMANIA JÚNIOR, A.; SMÂNIA, F. A.; BRAZ FILHO, R. Two epimeric flavalignans from *trichilia catiguá* (Meliaceae) with antimicrobial activity. **Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences**, v. 57, n. 5/6, p. 483-488, 2002.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.
- RODRÍGUEZ, V. F.; CARMO, H. M. do; OLIVEIRA, R. R.; BRAZ FILHO, R.; MATHIAS, L.; VIEIRA, I. J. C. Isolation of terpenoids from *Trichilia quadrijuga* (Meliacea by Droplet Counter Current Chromatography). **Cromatografia**, v. 70, n. 7-8, p. 1191-1195, 2000.
- SOARES, A. K. A.; CARMO, G. C.; QUENTAL, D. P.; NASCIMENTO, D. F.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Avaliação da segurança clinica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 447-454, 2006.
- SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M.; O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2003. p. 1102.

TANG, W.; HIOKI, H.; HARADA, K.; KUBO, M.; FUKUYAMA, Y. Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 12, p. 2010-2013, 2007.

VAS, Z. R.; MATAL, L. V.; CALIXTO, J. B. Analgesic effect of the herbal medicine catuama in thermal and chemical models of nociception in mice. **Phytotherapy**, v. 11, p. 101-106, 1997.

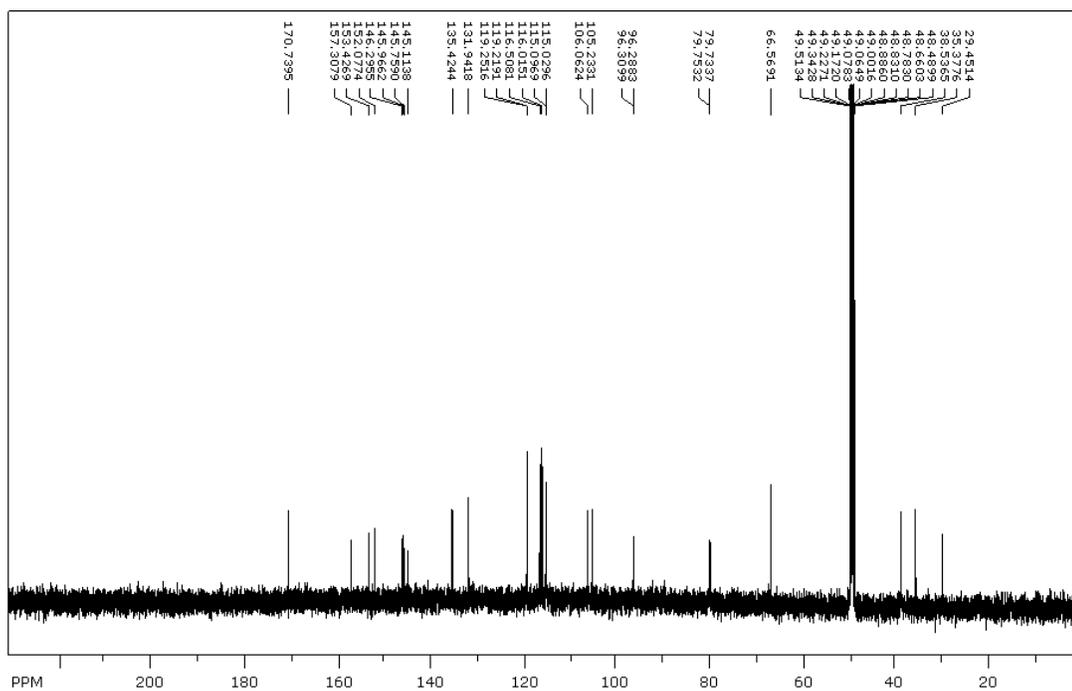
VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na região centro-norte do estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 308-313, 2008.

VEIGA JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 464-471, 2008.

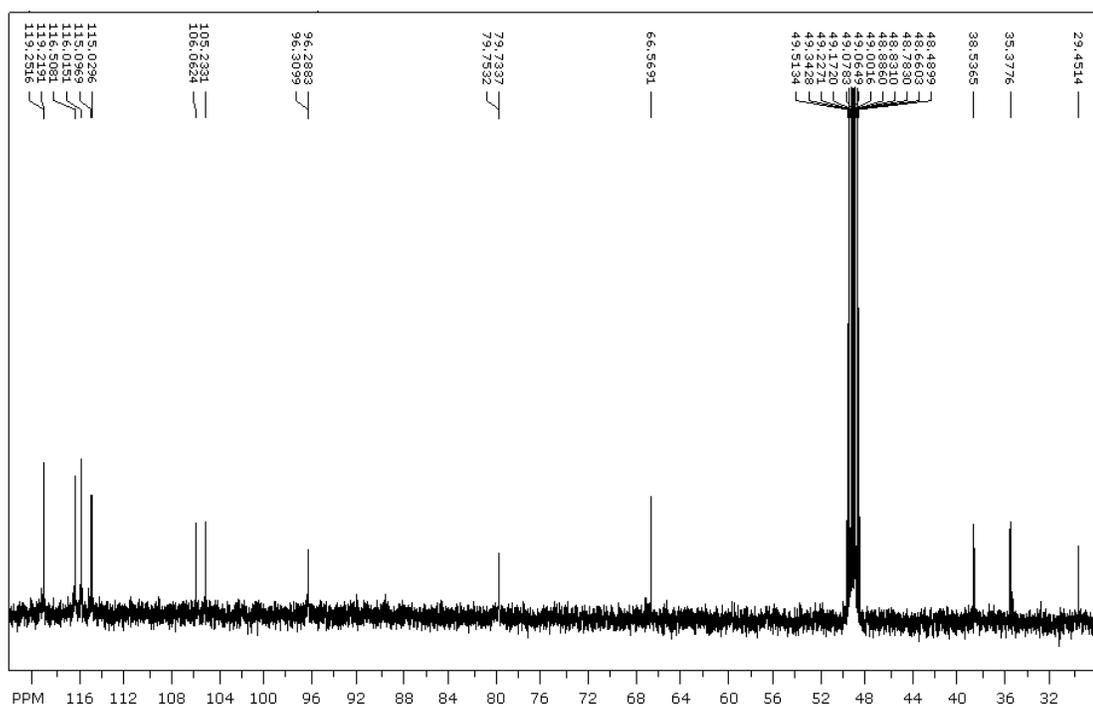
VENDRAMIM, J. D. Uso de plantas inseticidas no controle de pragas. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE AGRICULTURA ORGÂNICA, 2., 1997, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Fundação Cargill, 1997. p. 64-69.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Annex 5: guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms. **WHO Technical Report Series**, n. 863, p. 65-79, 1996. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s5516e/s5516e.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2010.

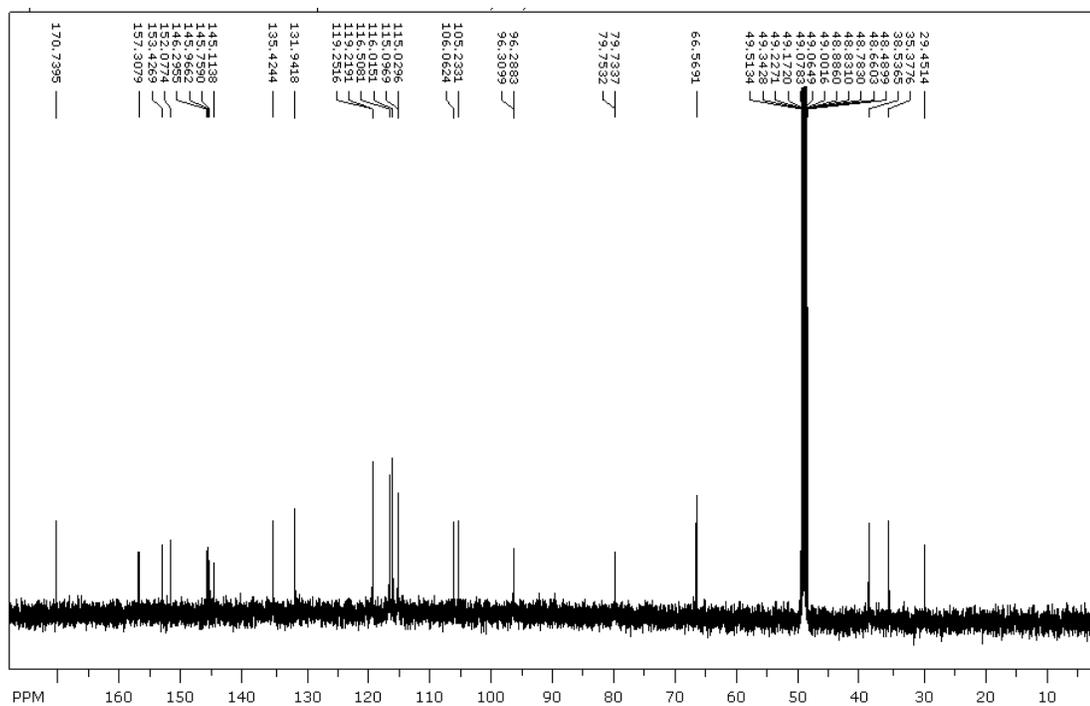
ANEXOS



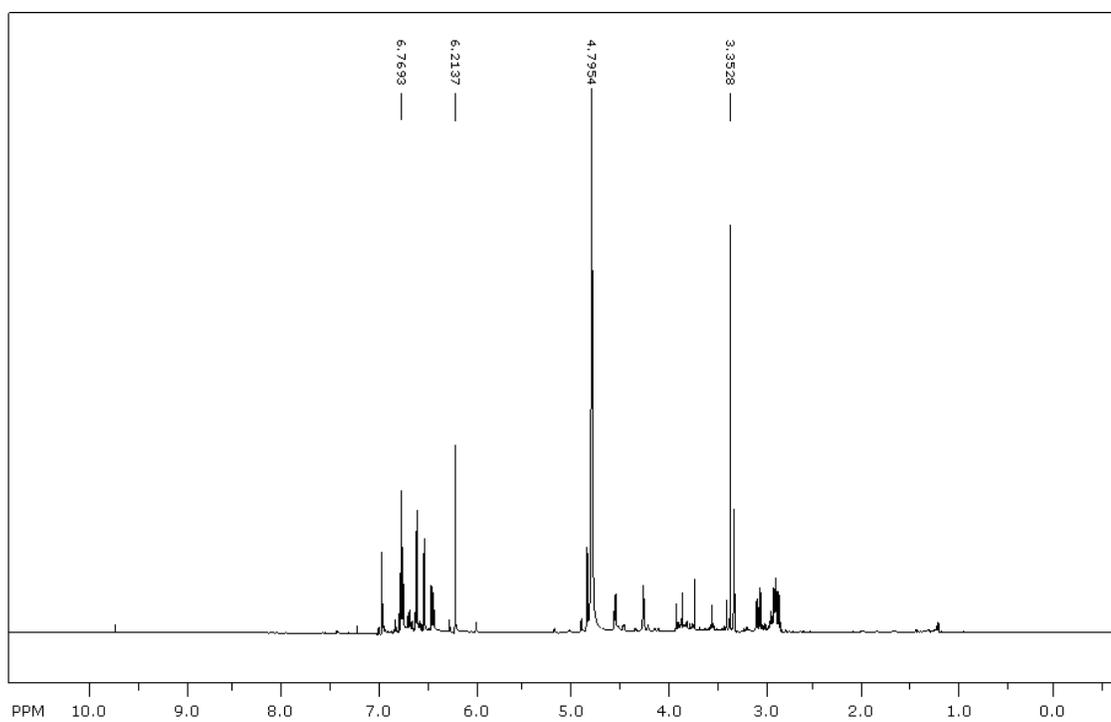
Anexo 1: Espectro de RMN ^{13}C , (MeOD, δ ppm), da subfração 1 – Cinchonaína B



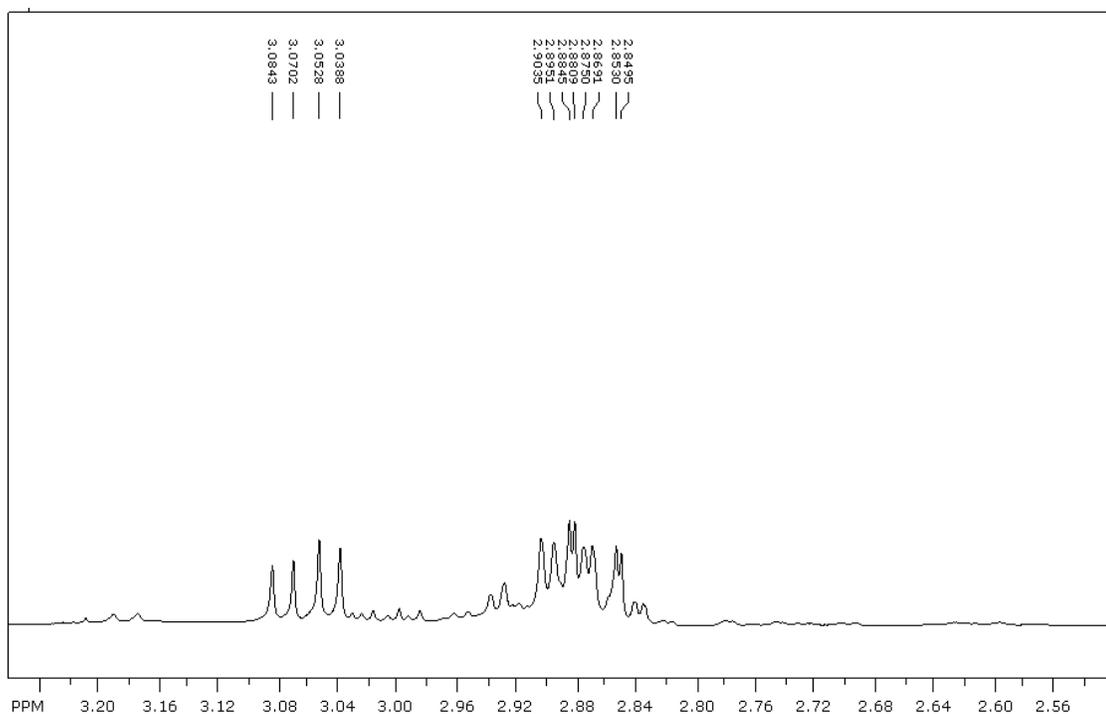
Anexo 2: Espectro de RMN ^{13}C ampliado da subfração 1 – Cinchonaína B.



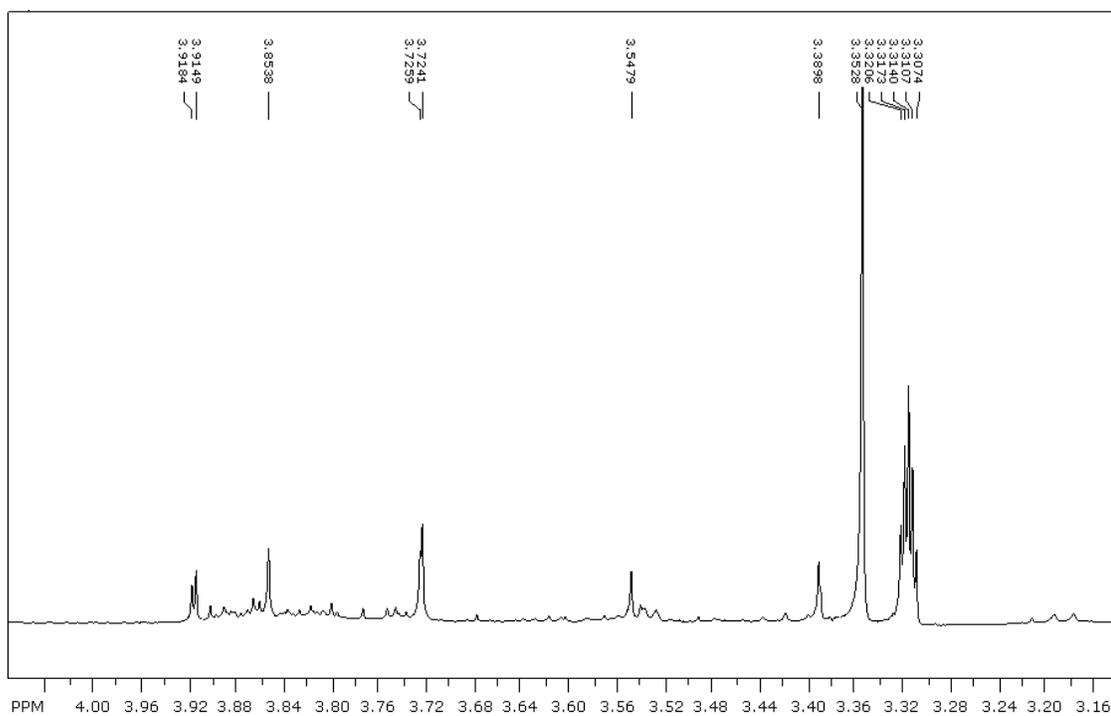
Anexo 3: Espectro de RMN ^{13}C ampliado da subfração 1 – Cinchonaína B.



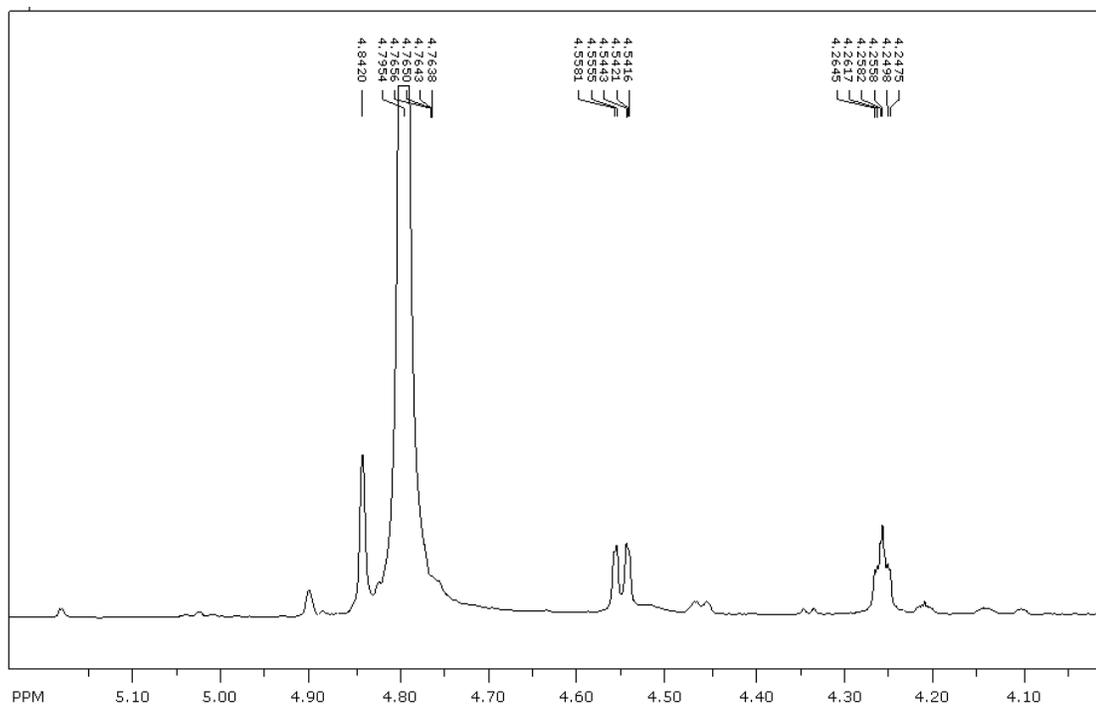
Anexo 4: Espectro de RMN ^1H , (MeOD, δ ppm), da subfração 1 – Cinchonaína B.



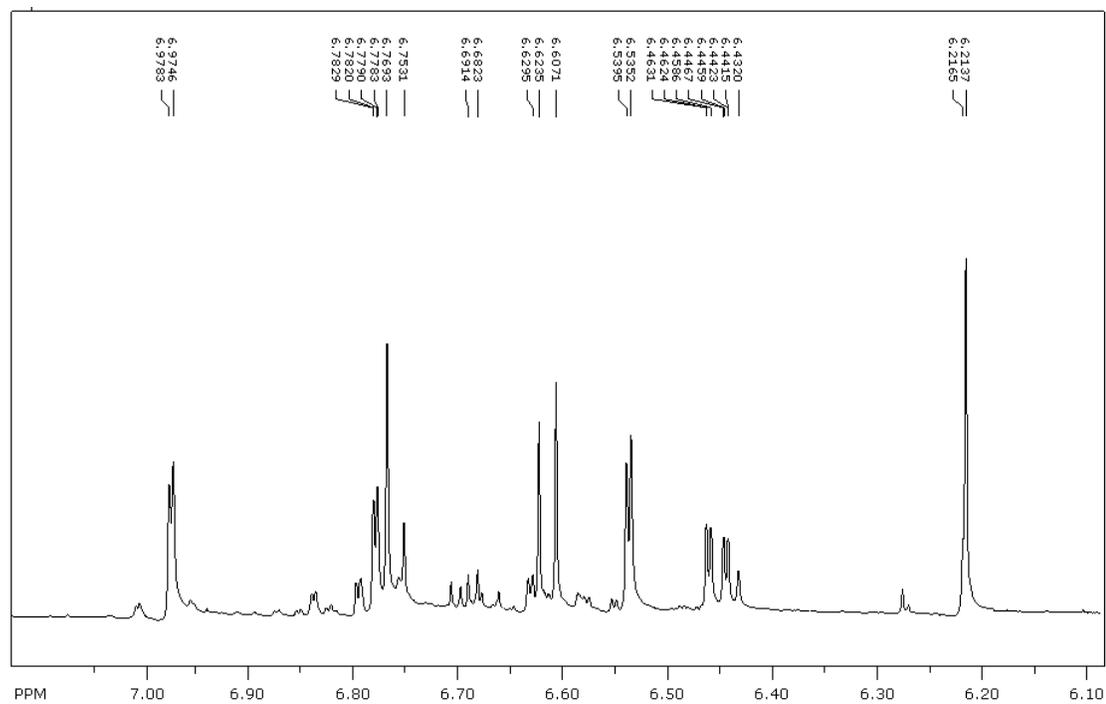
Anexo 5: Espectro de RMN ^1H ampliado da subfração 1 – Cinchonaína B

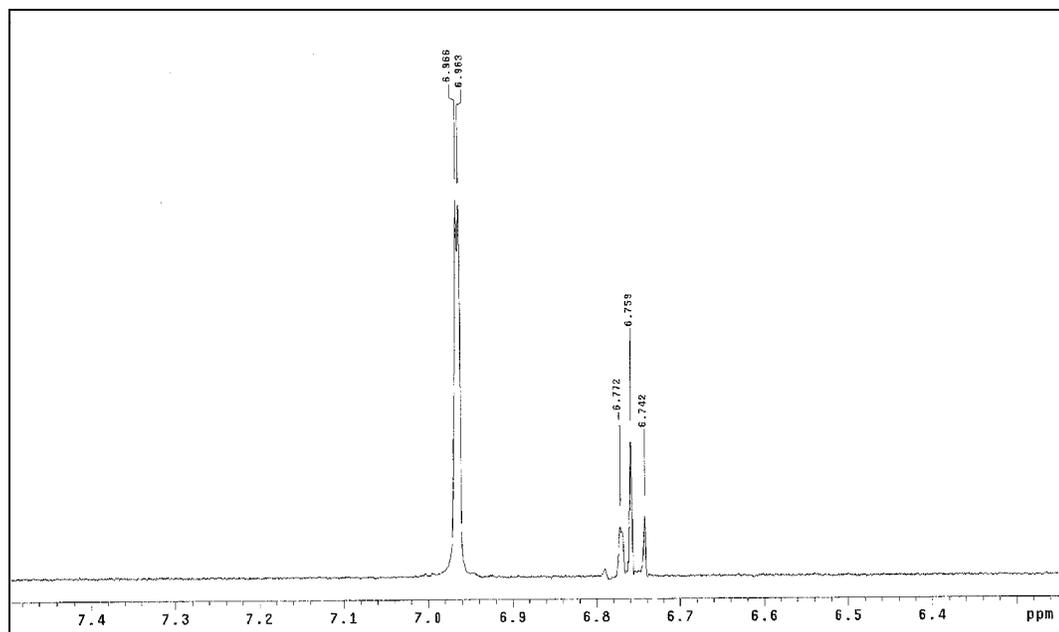


Anexo 6 : Espectro de RMN ^1H ampliado da subfração 1 – Cinchonaína B.

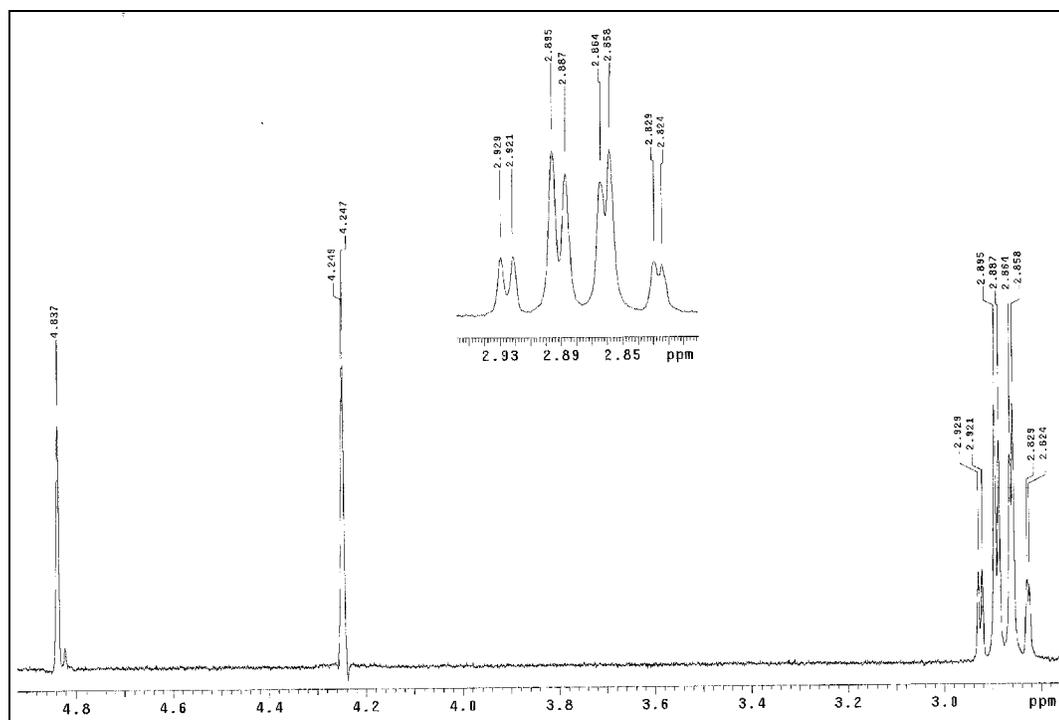


Anexo 7: Espectro de RMN ^1H ampliado da subfração 1 – Cinchonaína B.

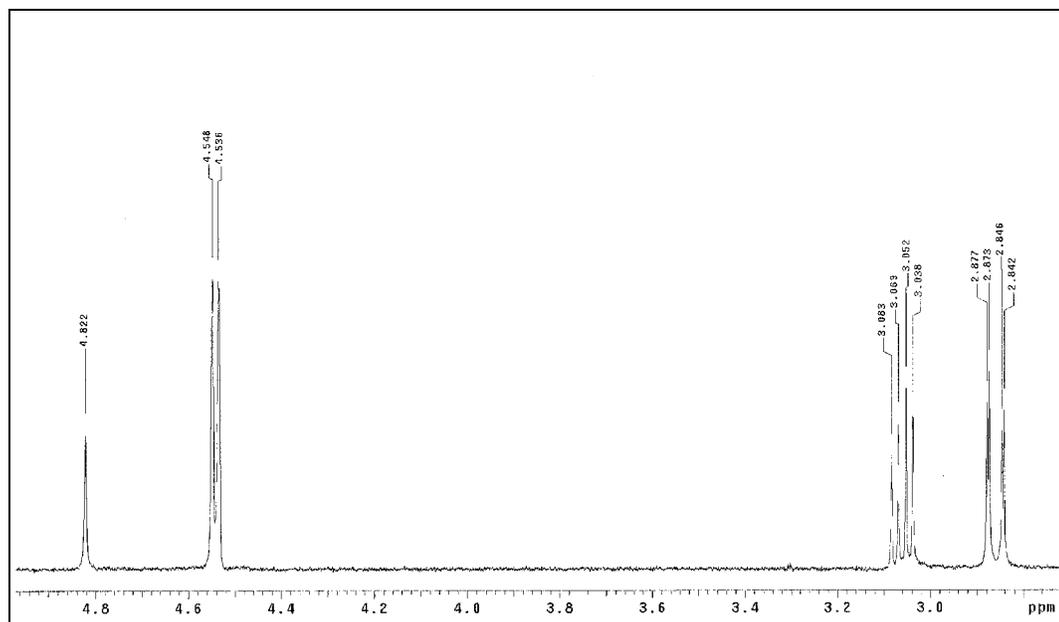




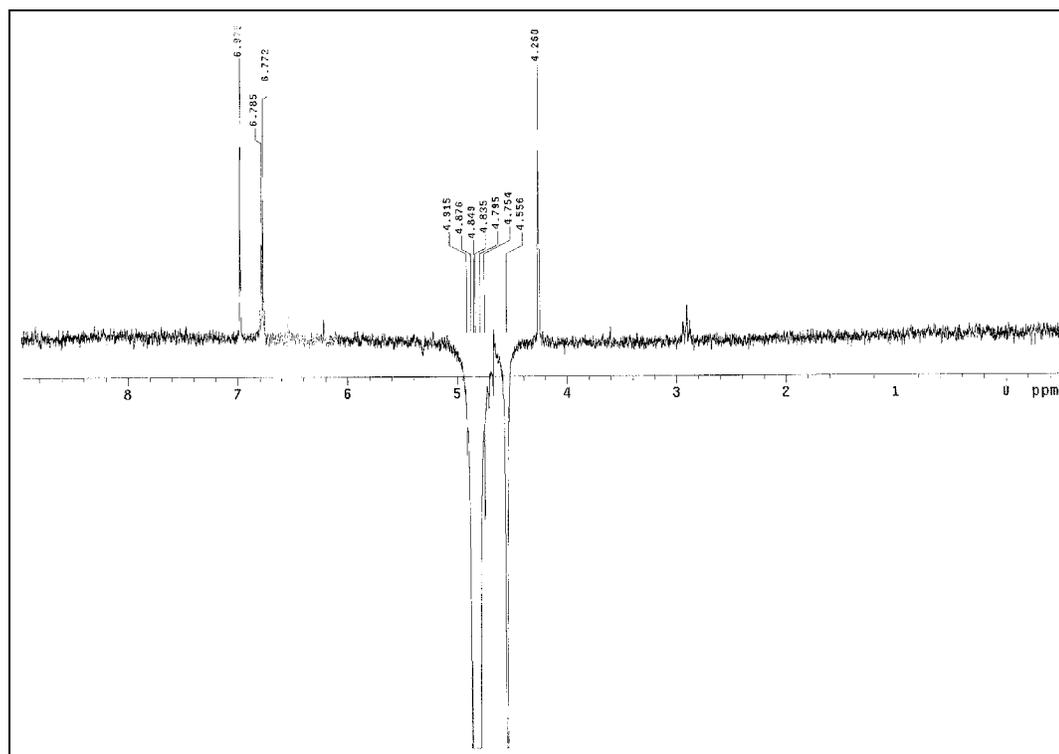
Anexo 9: Espectro de TOCSY (H2') da subfração 1 – Cinchonina B.



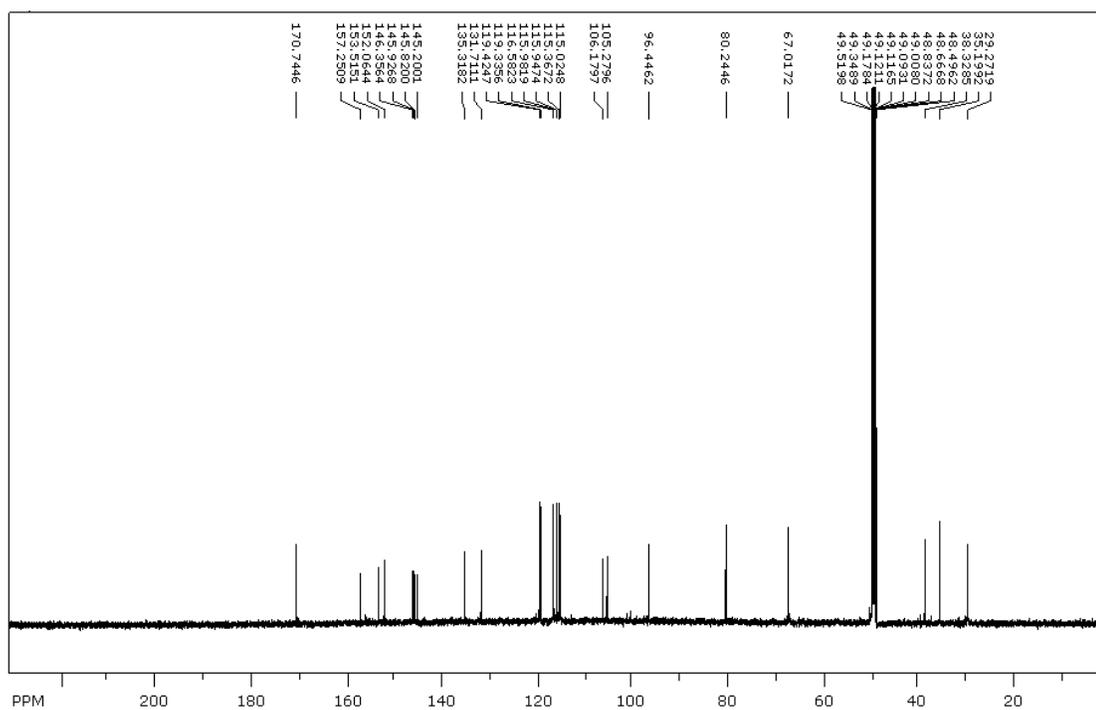
Anexo 10: Espectro de TOCSY (H3) da subfração 1 – Cinchonina B.



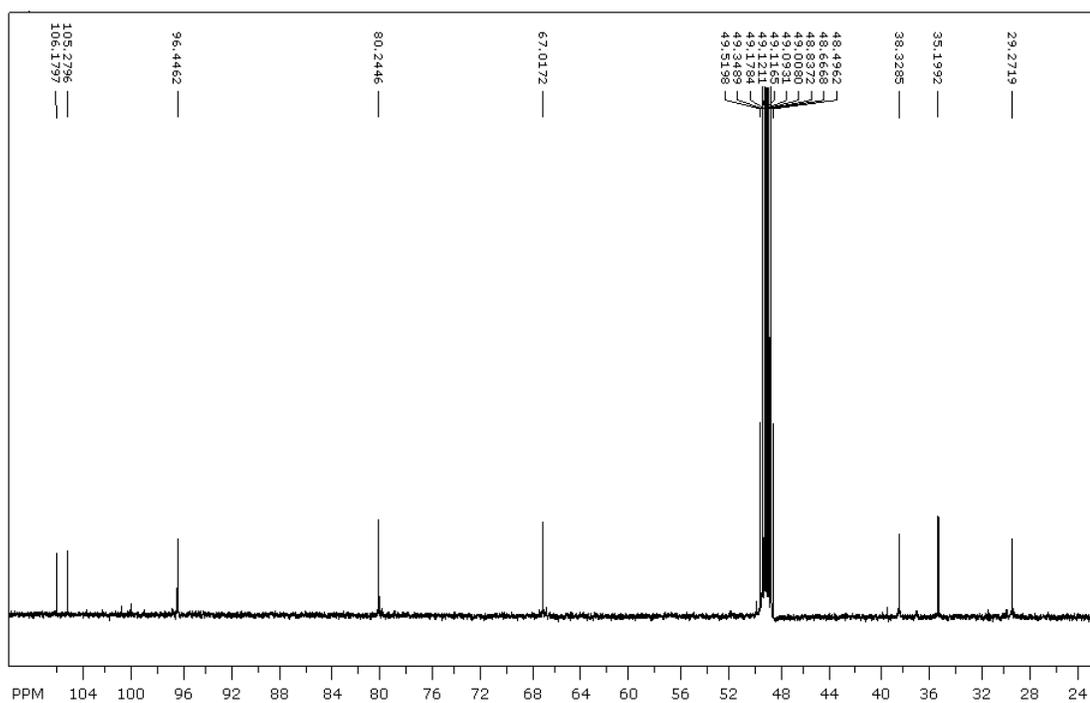
Anexo 11: Espectro de TOCSY (H7') da subfração 1 – Cinchonina B.



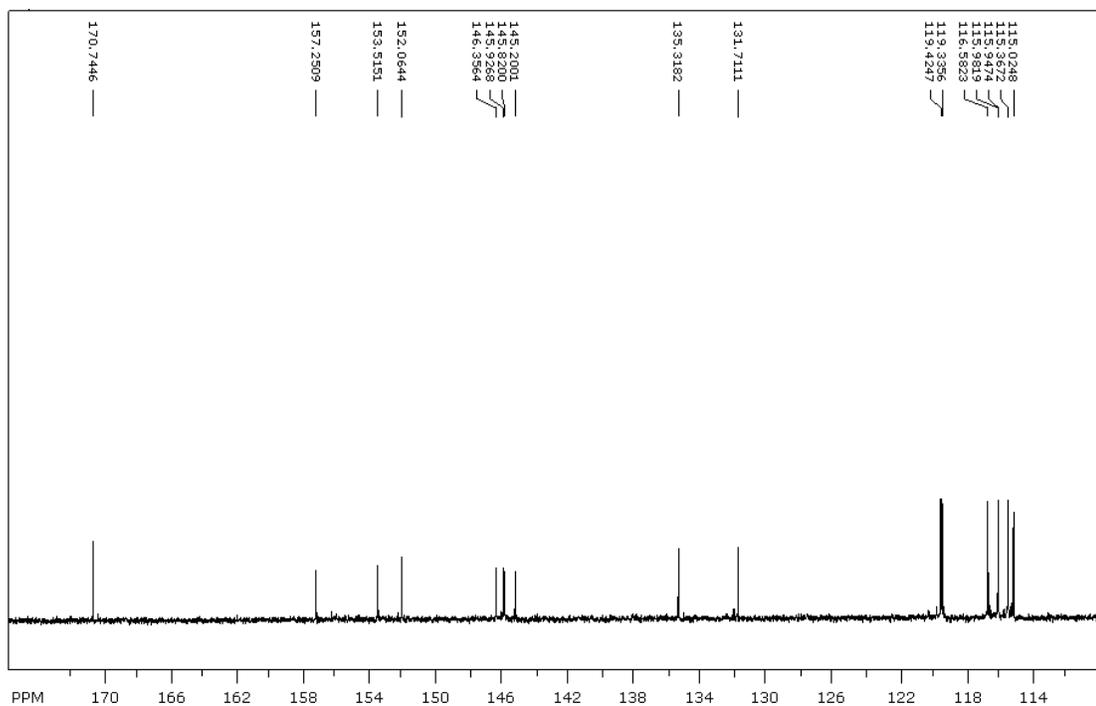
Anexo 12: Espectro de NOESY (H2) da subfração 1 – Cinchonina B.

Subfração 2

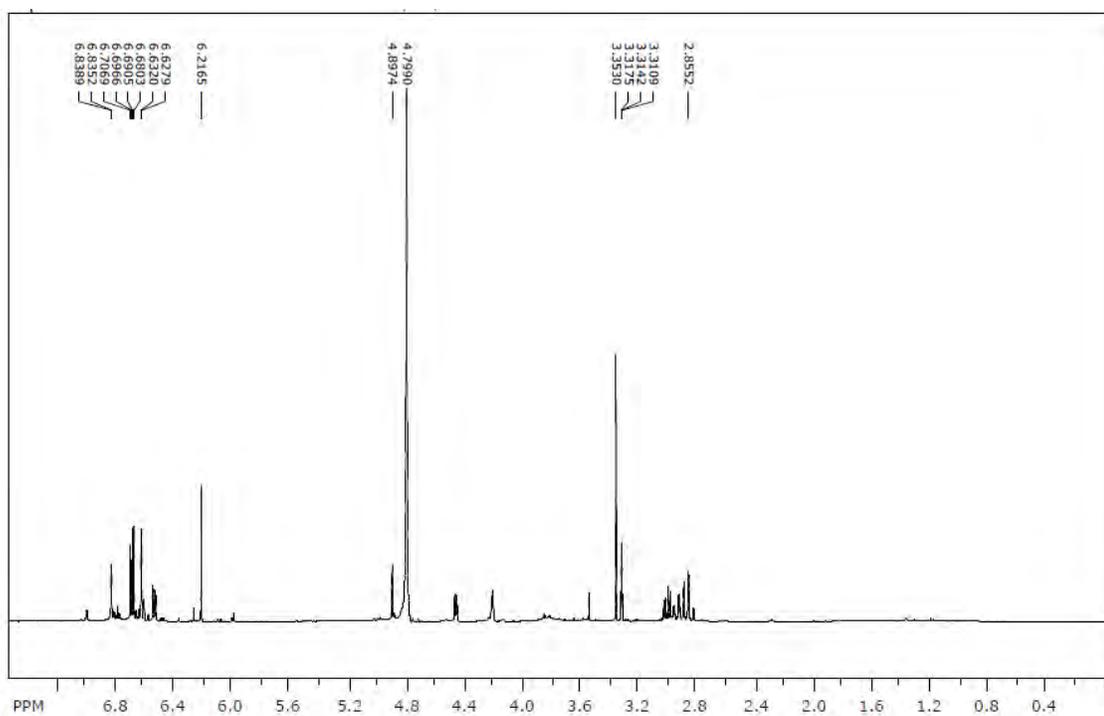
Anexo 13: Espectro de RMN ^{13}C , (MeOD, δ ppm), da subfração 2 – Cinchonaína A.



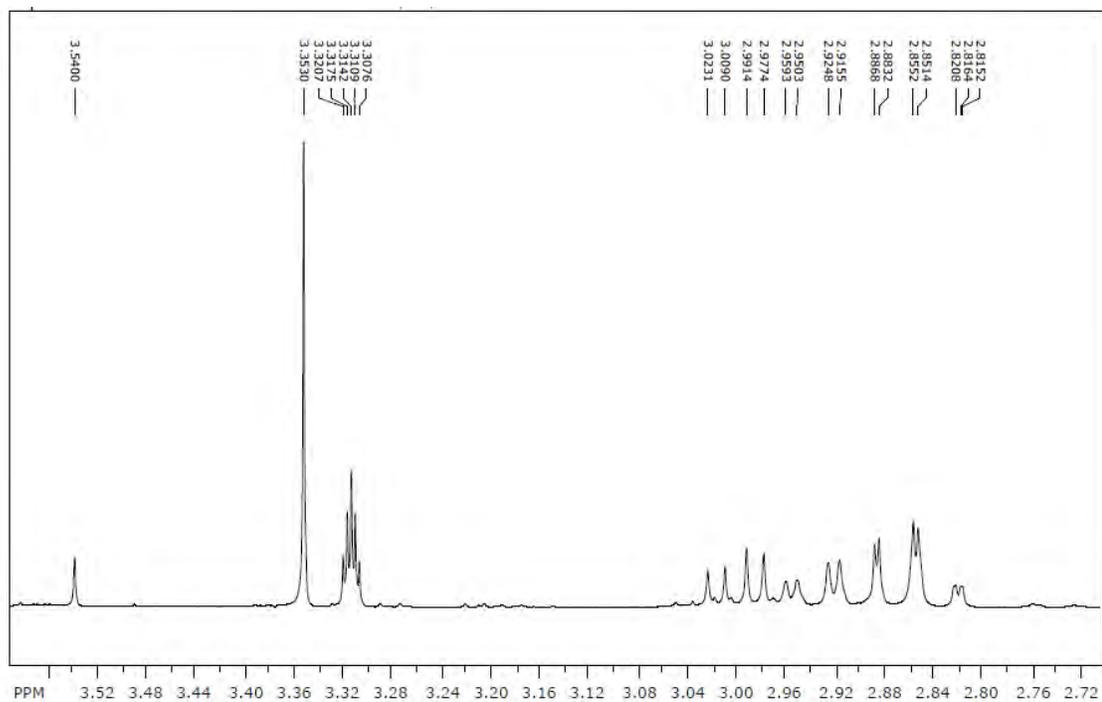
Anexo 14: Espectro de RMN ^{13}C ampliado da subfração 2 – Cinchonaína A.



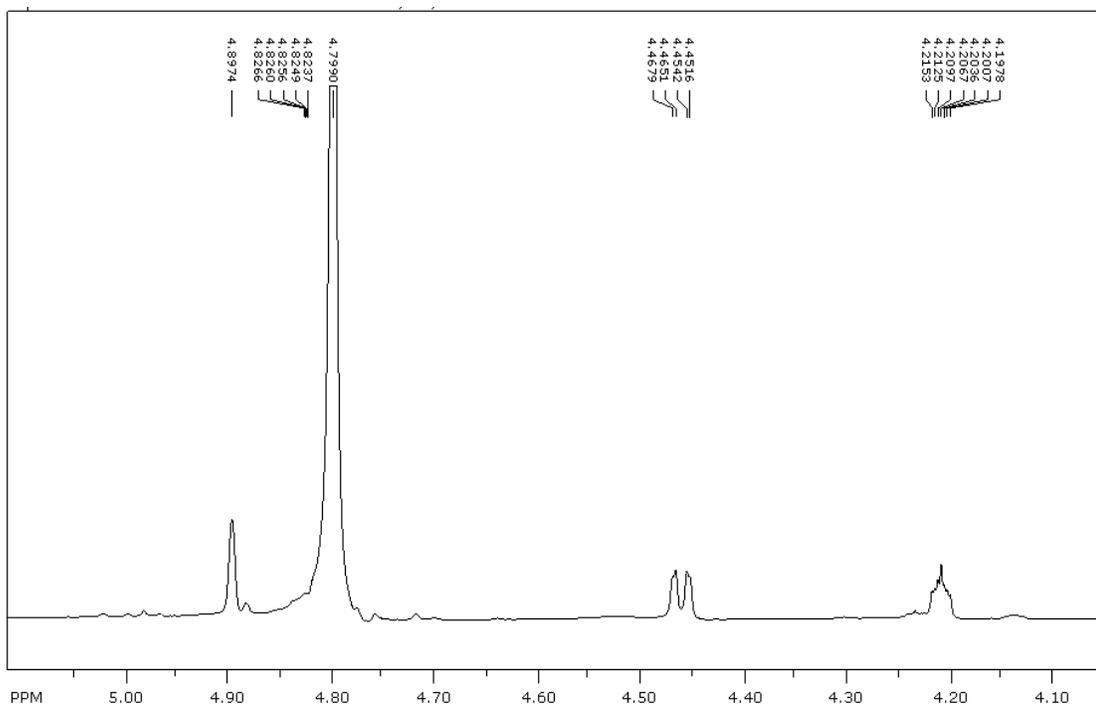
Anexo 15: Espectro de RMN ^{13}C ampliado da subfração 2 – Cinchonina A.



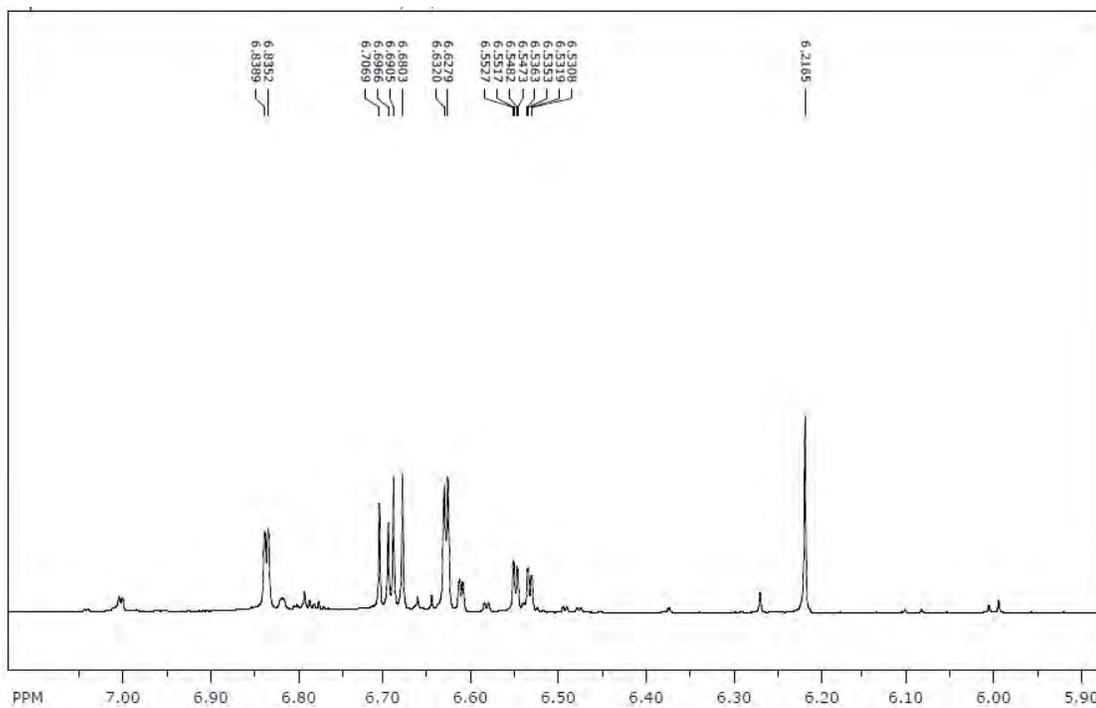
Anexo 16: Espectro de RMN ^1H , (MeOD, δ ppm), da subfração 2 – Cinchonina A.



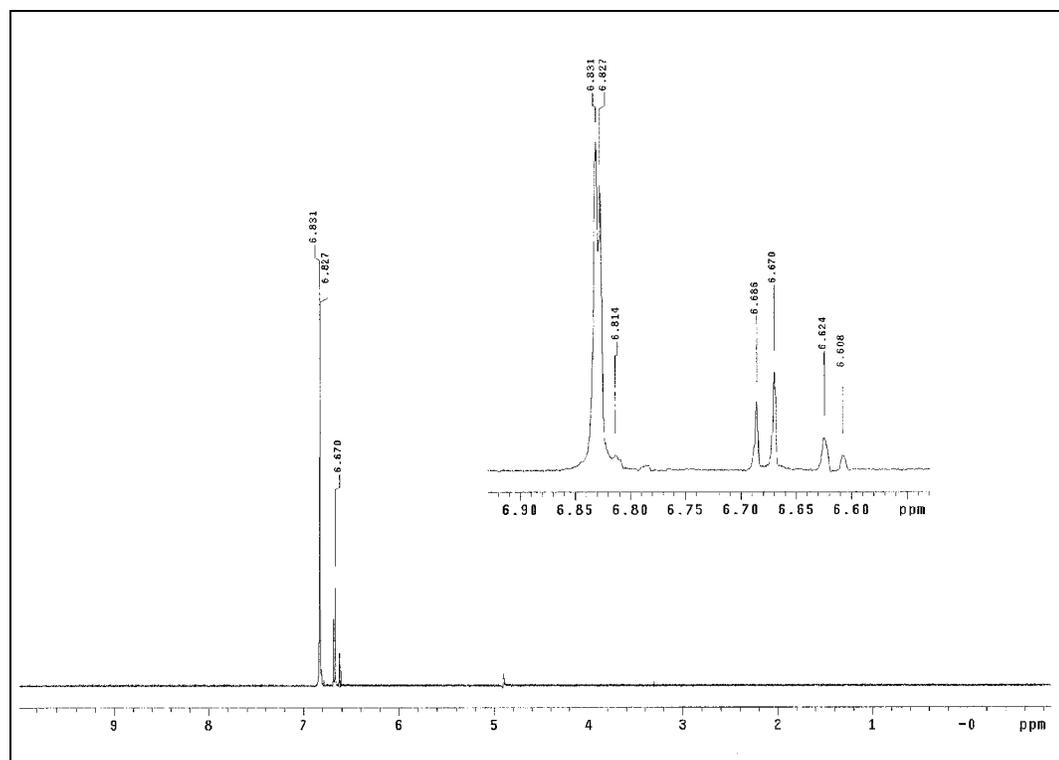
Anexo 17: Espectro de RMN ^1H ampliado da subfração 2 – Cinchonaína A.



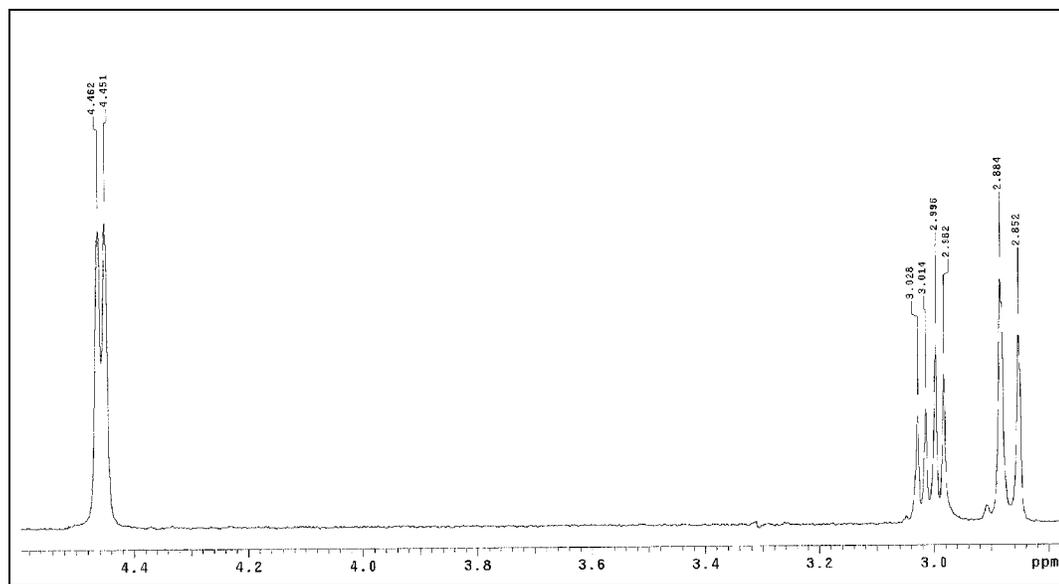
Anexo 18: Espectro de RMN ^1H ampliado da subfração 2 - Cinchonaína A.



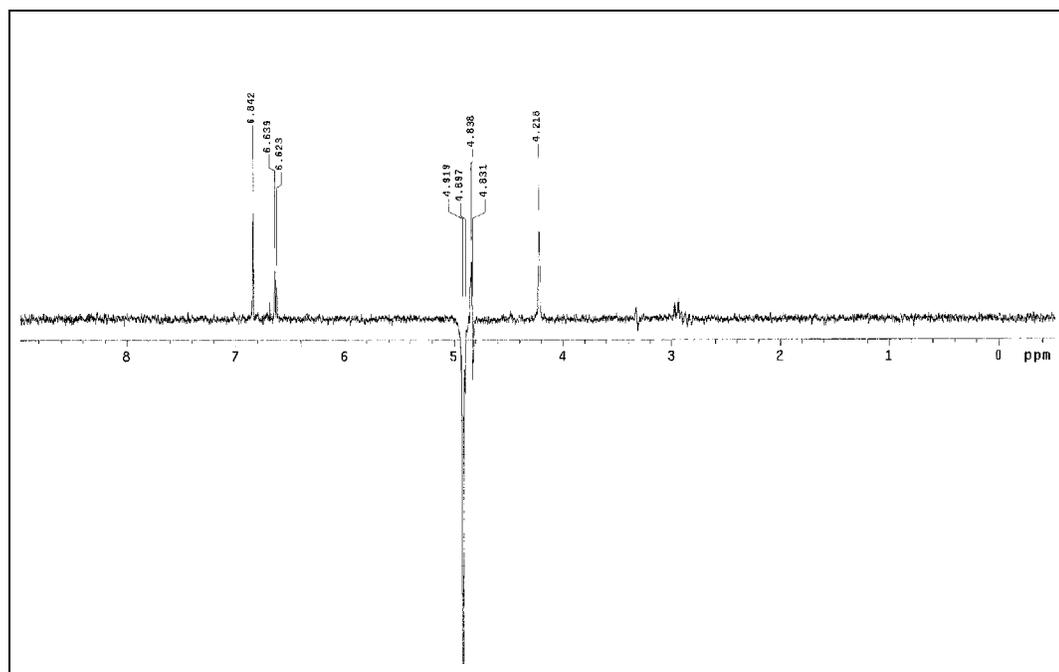
Anexo 19: Espectro de RMN ^1H ampliado da subfração 2 – Cinchonaína A.



Anexo 20: Espectro TOCSY (H_2) ampliado da subfração 2 – Cinchonaína A.



Anexo 21: Espectro TOCSY (H7'') ampliado da subfração 2 – Cinchonaína A.



Anexo 22: Espectro de NOESY (H2) ampliado da subfração 2 – Cinchonaína A.