



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR



LEONARDO PINHEIRO LANDIM

**QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM EXTRATOS DE *Dimorphandra*
gardneriana Tulasne E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E
FOTOESTABILIDADE**

CRATO, CE

2012

LEONARDO PINHEIRO LANDIM

**QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM EXTRATOS DE *Dimorphandra
gardneriana* Tulasne E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E
FOTOESTABILIDADE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri- URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

CRATO, CE

2012

Landim, Leonardo Pinheiro.

L257q Quantificação de flavonóides em extratos de *Dimorphandra gardneriana* Tulasne e avaliação de propriedades antioxidantes e fotoestabilidade/ Leonardo Pinheiro Landim. – Crato-CE, 2012.

158p.; il.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri- URCA.

Orientador: Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

1. *Dimorphandra gardneriana*; 2. CLAE; 3. Isoquercetina;

I. Título.

CDD: 615.323

LEONARDO PINHEIRO LANDIM

QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM EXTRATOS DE *Dimorphandra
gardneriana* Tulasne E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E
FOTOESTABILIDADE

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa – **Orientador**
Universidade Regional do Cariri- URCA

Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento – **Avaliador Externo**
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Marcelo Oliveira Santiago – **Avaliador Interno**
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho – **Avaliador Interno (Suplente)**
Universidade Regional do Cariri - UFC

Dedico a meus pais, José Acúrcio Pinheiro Landim e Francisca Ivone Pinheiro Landim, e a minhas irmãs, Kelma Maria Pinheiro, Magda Pinheiro Landim e Magali Pinheiro Landim, por tudo que me ensinaram da vida, por sempre apoiarem os meus projetos, por me reerguerem nas derrotas e por celebrarem comigo as vitórias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ter sido sempre meu amparo e conforto nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai, José Acúrcio Pinheiro Landim, por ensinar-me dentre muitas virtudes, o princípio da honestidade e por ter me tornado o homem que sou.

À minha mãe, Francisca Ivone Pinheiro Landim, educadora com orgulho, por ter sido uma das minhas fontes inspiradoras para ingressar no mestrado.

Às minhas irmãs, Kelma Maria Pinheiro, Magda Pinheiro Landim, Magali Pinheiro Landim, que, mesmo distantes, sempre emanavam energias positivas, combustíveis essenciais para conclusão do mestrado.

A toda a minha família, por sempre vibrarem com as minhas conquistas e realizações.

À minha namorada, Fernanda Moura Victor, pela compreensão nos momentos em que precisei dedicar-me exclusivamente ao mestrado, pelas revisões ortográficas de artigos e da dissertação, bem como por todo amor e carinho dispensado durante este período.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa, por ter me dado a oportunidade de retornar à vida acadêmica. Obrigado, por ter acreditado e ter me apresentado com um projeto tão valoroso para meu crescimento profissional. Sou muito grato pelos seus conselhos e por toda a orientação dispensada durante o mestrado.

Aos professores, Msc. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues, Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes e Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho por toda ajuda direta ou indireta na execução deste trabalho.

Aos professores , Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira e Dr. José Abreu de Matos (*in memoriam*), por terem sido os primeiros a me mostrarem a importância das plantas medicinais, tanto no contexto científico, como no sócio-econômico.

Aos professores, Dr. Jefferson Queiroz Lima e Dr. Marcelo Oliveira Santiago, por aceitarem participar da minha banca de qualificação. Sou muito grato por toda a contribuição e sugestões apresentadas para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores, Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento e Dr. Marcelo Oliveira Santiago, pela disponibilidade em contribuir no engrandecimento deste trabalho, como membros da banca examinadora da dissertação.

À equipe do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN), Aracélio Colares, Eidla Mikaelle, Erlânio Oliveira, Fábio Galvão, Germana Freire, George Souza, Helenicy Veras, Heverton Mendes, Liana Souza, Manuele Eufrazio, Samara Alves, Thiago Almeida e Walmir Emanuel pela convivência e acolhimento. Ao Sr. Luis Leandro da Silva, pela contribuição na coleta do material vegetal.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bios prospecção Molecular, em especial pelos conhecimentos transmitidos, e por serem o sustento do programa de pós-graduação em Bioprospecção Molecular.

Aos amigos do mestrado, Anita Oliveira, Diógenes de Queiroz, Emília Naiana, Gillena Maria, Jacqueline Cosmo, Luiz Jardelino, Natallyanea Silva, Olga Paiva, Patrícia Rosane, Renata de Souza, Renata Pereira, Thiago Almeida, pois, mesmo com a minha ausência constante na instituição, sempre foram atenciosos e carinhosos.

Aos coordenadores do Programa de Pós-graduação em Bios prospecção Molecular, Dr. Waltécio de Oliveira Almeida e Dr. Alysson Pontes Pinheiro e às secretárias, Maria Andecieli Rolim de Brito e Maria Lenira Pereira, por toda disponibilidade e compromisso com o programa.

Ao Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima coordenado pela Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva, pela identificação da espécie em estudo.

A Farmace Indústria Químico-Farmacêutica Cearense Ltda., pois, além de oferecer-me uma oportunidade de emprego, constantemente tem investido em meu crescimento profissional com cursos, viagens, congressos, entre outros. Além disso, sou muito grato por terem permitido a execução da maior parte do trabalho no laboratório de controle de qualidade da fábrica. Gostaria de agradecer, em especial, aos analistas deste laboratório, por toda ajuda na realização dos testes.

A todos aqueles que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para conclusão deste trabalho.

Ao CNPq, FUNCAP e CAPES, pelo suporte financeiro.

*“Nunca andes pelo caminho traçado, pois ele
conduz somente aonde outros já foram.”*

Alexander Graham Bell

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FLUXOGRAMAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo Geral	24
2.2	Objetivo Específico	24
3	REFERENCIALTEÓRICO	26
3.1	Considerações botânicas	26
3.1.1	A família <i>Leguminosae</i>	26
3.1.2	O gênero <i>Dimorphandra</i>	27
3.1.3	<i>Dimorphandra gardneriana</i> Tul.	28
3.1.3.1	Extrativismo na região do Araripe	30
3.1.4	Flavonóides	30
3.2	Controle de qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos	35
3.2.1	Fitoterápicos	35
3.2.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	37
3.3	Validação de Métodos Analíticos	39
3.4	Atividade Antioxidante	42
3.5	Estudos de Fotoestabilidade	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	Material Vegetal	46
4.2	Preparação do extrato	46
4.3	Substâncias químicas de referência	47
4.4	Solventes e reagentes	47
4.5	Desenvolvimento e validação do método analítico	48

4.5.1 Seleção de condições cromatográficas	48
4.5.2 Preparo de padrão	49
4.5.3 Preparo da amostra	59
4.5.4 Método de Validação	52
4.5.4.1 Especificidade	52
4.5.4.2 Linearidade.....	52
4.5.4.3 Sensibilidade	53
4.5.4.4 Exatidão	53
4.5.4.5 Precisão	53
4.5.4.6 Robustez	54
4.6 Determinação da atividade antioxidante	54
4.7 Doseamento de rutina em dois fitoterápicos	56
4.8 Estudo de fotoestabilidade do extrato metanólico de <i>D. gardneriana</i>	56
 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 60
5.1 Desenvolvimento e validação de método por CLAE	60
5.1.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico e Especificidade	60
5.1.2 Linearidade	63
5.1.3 Sensibilidade.....	66
5.1.4 Exatidão	67
5.1.5 Precisão	71
5.1.6 Robustez.....	75
5.2 Quantificação dos flavonóides no extrato metanólico de <i>D. gardneriana</i> ..	77
5.3 Determinação da atividade antioxidante	77
5.4 Quantificação de rutina em fitoterápicos	78
5.5 Fotoestabilidade do extrato metanólico de <i>D. gardneriana</i>	79
 6 CONCLUSÕES.....	 81
 REFERÊNCIAS.....	 84

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Classificação taxonômica de <i>Dimorphandra gardneriana</i> Tulasne, conforme Martius <i>et al.</i> (1870).....	27
Figura 2- <i>Dimorphandra gardneriana</i> Tul. (indivíduo adulto e infrutescência) ...	29
Figura 3- Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração	31
Figura 4- Representação esquemática simplificada da biossíntese de flavonóides	33
Figura 5- Estruturas químicas dos flavonóides rutina, isoquercetina e quercetina.....	34
Figura 6- ... Estrutura do DPPH antes e depois da reação com antioxidante....	43
Figura 7- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Japão), utilizado para determinação quantitativa dos flavonóides rutina, quercetina e isoquercetina no extrato metanólico de <i>Dimorphandra gardneriana</i>	49
Figura 8- Câmara de Fotoestabilidade Zem®, utilizada para exposição das amostras de <i>D. gardneriana</i> na realização dos estudos de fotoestabilidade.....	58
Figura 9- Cromatograma do ensaio da especificidade com a injeção de um branco	61
Figura 10- Cromatograma do ensaio da especificidade com a injeção do padrão.....	62
Figura 11- Cromatograma do ensaio da especificidade com a injeção da amostra	62
Figura 12- Curva de calibração construída a partir dos resultados do ensaio de linearidade do flavonóide rutina.....	65
Figura 13- Curva de calibração construída a partir dos resultados do ensaio de linearidade do flavonóide isoquercetina	65
Figura 14- Curva de calibração construída a partir dos resultados do ensaio de linearidade do flavonóide quercetina.....	66

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1- Representação esquemática simplificada da metodologia de obtenção do extrato bruto de <i>D. gardneriana</i>	47
Fluxograma 2- Metodologia de preparo das soluções padrões, contendo rutina, isoquercetina e quercetina	51
Fluxograma 3- Representação esquemática simplificada do procedimento analítico para avaliação da atividade antioxidante de extrato metanólico de <i>D. gardneriana</i> , empregando o método do DPPH	55
Fluxograma 4- Representação esquemática simplificada da metodologia realizada para o estudo de fotoestabilidade	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Programa de gradiente de eluição utilizado para promover a separação dos três flavonóides (RUT, ISO e QUE).....	49
Tabela 2- Resultados obtidos no ensaio da linearidade para o flavonóide rutina e os valores de coeficiente de correlação (r) e desvio padrão relativo (DPR)	63
Tabela 3- Resultados obtidos no ensaio da linearidade para o flavonóide isoquercetina e os valores de coeficiente de correlação (r) e desvio padrão relativo (DPR).....	63
Tabela 4- Resultados obtidos no ensaio da linearidade para o flavonóide quercetina e os valores de coeficiente de correlação (r) e desvio padrão relativo (DPR)	64
Tabela 5- Resultados obtidos no ensaio de exatidão para o flavonóide rutina e os valores médios de recuperação e DPR	68
Tabela 6- Resultados obtidos no ensaio de exatidão para o flavonóide isoquercetina e os valores médios de recuperação e DPR	69
Tabela 7- Resultados obtidos no ensaio de exatidão para o flavonóide quercetina e os valores médios de recuperação e DPR	70
Tabela 8- Resultados obtidos no ensaio de precisão para o flavonóide rutina e os valores DPR (intra-corrida e inter-corrida).....	72
Tabela 9- Resultados obtidos no ensaio de precisão para o flavonóide isoquercetina e os valores DPR (intra-corrida e inter-corrida).....	73
Tabela 10- Resultados obtidos no ensaio de precisão para o flavonóide quercetina e os valores DPR (intra-corrida e inter-corrida)	74
Tabela 11- Resultados do ensaio de robustez, com variações do pH da fase móvel, do comprimento de onda de absorção e dos fabricantes de coluna.....	76
Tabela 12- Valores da Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato metanólico das entrecascas dos frutos de <i>D. gardneriana</i> utilizando o BHT como controle positivo e a técnica do DPPH	78

Tabela 13- Resultados do estudo de fotoestabilidade com amostras de <i>D. gardneriana</i> , submetidas a diferentes condições de luminosidade	79
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Por cento; percentual

< - Menor que

± - Mais ou menos

® - Marca registrada

µg/ mL - Micrograma por mililitro

µS/cm - Microsiemens por centímetro

µL - Microlitro

µm - Micrômetro

µM - Micromolar

AA - Atividade Antioxidante

BHT - 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CG - Cromatografia Gasosa

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

cm - Centímetro

C₈ - Octilsilano

CE₅₀ - Concentração efetiva para se obter 50% de atividade antioxidante

C₁₈ - Octadecilsilano

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DP - Desvio Padrão

DPR - Desvio Padrão Relativo

EDG - Extrato metanólico de *Dimorphandra gardneriana*

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

et al. - E colaboradores

EUA - Estados Unidos da América

g - Gramas

g/L - Gramas por litro

FR - Fator de relação

h - Horas

HCDAL - Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima

HPTLC - *High-performance thin layer chromatography*

IC - Inclinação da curva
ICH - *International Conference on Harmonisation*
ISO - Isoquercetina
IV - Infravermelho
L - Litro
LDL - *Low Density Lipoprotein*
LOD - *Limit of detection*
LOQ - *Limit of quantification*
m - Metro
mg - Miligrama
min - Minuto
mL - Mililitro
mL/min - Mililitros por minuto
mg/mL - Miligrama por mililitro
mm - Milímetro
MA - Massachusetts
n - Número de amostras
n° - Número
nm - Nanômetro
°C - Grau Celsius
OH - Ohio
Ont. - Ontário
pH - Potencial hidrogeniônico
QUE – Quercetina
RNM – Ressonância nuclear magnética
r - Coeficiente de correlação
 r^2 - Coeficiente de determinação
redox – Redução-oxidação
RUT - Rutina
THF - Tetrahidrofurano
TM - *Translation Memory*
Tul. - Tulasne
URCA - Universidade Regional do Cariri
UV - Ultravioleta

UV-VIS - Ultravioleta-visível

watt.horas/m² - watt.horas por metro quadrado

RESUMO

Plantas medicinais produzem uma grande variedade de substâncias químicas, de diferentes classes metabólicas e o fazem em diferentes proporções. Um método para separação e quantificação de três flavonóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi desenvolvido e validado. O extrato bruto metanólico da entrecasca de *Dimorphandra gardneriana* Tulasne foi analisado. Rutina, isoquercetina e quercetina foram utilizados como padrões de calibração. A análise foi conduzida pela utilização de coluna cromatográfica Thermo Scientific Hypersil C₁₈ (250 mm x 4.0 mm; tamanho da partícula, 5µm), como fase estacionária, e mistura de tetrahidrofurano e solução tampão de fosfato de potássio como fase móvel, com fluxo de 0,8 mL/min e detecção no comprimento de onda de 356 nm. O método proposto foi validado, conforme resolução RE nº. 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. No presente estudo, uma excelente linearidade foi obtida com r maior que 0.99. Além disso, os picos cromatográficos mostraram uma boa resolução. Com os outros dados da validação, incluindo precisão, especificidade, exatidão e robustez, esse método demonstrou boa repetibilidade e sensibilidade e pode ser convenientemente utilizado para quantificação de rutina, isoquercetina e quercetina em extrato bruto metanólico de vagens de *D. gardneriana*. Além do mais, apresenta as vantagens de fácil preparação da amostra e curto tempo de análise entre cada injeção. Vale ressaltar que o presente estudo trata do primeiro relato de método de quantificação de flavonóides em extratos brutos de *D. gardneriana*, através da técnica de CLAE.

Palavras-chave: *Dimorphandra gardneriana*, CLAE, isoquercetina, quercetina, rutina, validação.

ABSTRACT

Herbal medicine produce a variety of chemical substances and metabolic different classes and do so in different proportions. A method for separation and quantification of three flavonoids by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) was developed and validated. The crude methanolic extract of the inner bark of *Dimorphandra gardneriana* Tulasne was analyzed. Rutin, isoquercitrin and quercetin were used as calibration standards. The analysis was performed using a Thermo Scientific Hypersil C₁₈ column (250 mm x 4.0 mm i.d., 5 µm particle size), as stationary phase and a mixture of tetrahydrofuran and buffer solution of potassium phosphate as the mobile phase with a flow rate of 0.8 mL / min and detection at a wavelength of 356 nm. The proposed method was validated by resolution RE No. 899/2003 of the National Health Surveillance Agency. In this study, an excellent linearity was obtained with *r* higher than 0.99. Besides, the chromatographic peaks showed good resolution. With other validation data, including precision, specificity, accuracy and robustness, this method demonstrated good reliability and sensitivity, and can be conveniently used for the quantification of rutin, isoquercitrin and quercetin in crude methanolic extract of *D. gardneriana* pods. Furthermore, there are the advantages of easy sample preparation and short time between each injection. It is noteworthy that the present study is the first report of quantification method of flavonoids in crude extracts of *D. gardneriana* through the technique of HPLC.

Keywords: *Dimorphandra gardneriana*, HPLC, isoquercitrin, quercetin, rutin, validation.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Dimorphandra* tem grande relevância, sobretudo nos aspectos medicinais e de biodiversidade, por incluir duas espécies que são importantes economicamente como fontes de flavonóides para a indústria farmacológica (*Dimorphandra mollis* Benth. e *Dimorphandra gardneriana* Tul.) (SUDRÉ *et al.*, 2011).

Dimorphandra gardneriana Tul., conhecida como fava d'anta ou faveiro, é uma árvore brasileira leguminosa nativa, ocorrendo naturalmente nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia, Pará, Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais (MONTANO *et al.*, 2007).

A fava d'anta (*Dimorphandra* sp.) é uma planta cujos frutos são utilizados na extração de rutina para abastecimento da indústria farmacêutica. A rutina é um flavonóide que atua no fortalecimento e permeabilidade das paredes dos vasos capilares, em combinação com a vitamina C (RIZZINI e MORS, 1995).

Quercetina é outra substância extraída desta planta e de grande interesse para indústria farmacêutica. Ela é um antioxidante fenólico natural, presente em vegetais, frutas e sucos. Quimicamente, quercetina é uma aglicona de rutina e outros glicosídeos. É um potente antioxidante e eliminador de radicais livres (FILHO *et al.*, 2001). Outro flavonóide que pode ser encontrado no gênero *Dimorphandra* é a isoquercetina (DORES, 2007).

Entretanto, um dos impedimentos para aceitação de produtos vegetais é a falta de padronização de controle de qualidade (SHINDE *et al.*, 2009). Análises químicas e técnicas cromatográficas podem ser usadas para ajudar na identificação de material vegetal ou extrato. Técnicas cromatográficas, tais como CLAE, CCD, CG, eletroforese capilar e métodos espectroscópicos como infravermelho, ressonância magnética nuclear e ultravioleta podem ser usados como impressões digitais no processo de identificação e quantificação de metabólitos secundários (SHAW e BUT, 1995).

A fim de controlar a qualidade dos medicamentos à base de plantas de uma maneira mais adequada, metodologias analíticas bem fundamentadas devem ser utilizadas. Estas, quando não descritas em compêndios oficiais ou formulários nacionais, devem ser validadas. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA) define o processo de validação como uma garantia, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. (ANVISA, 2003).

O desenvolvimento e validação de um método analítico eficiente é uma parte integral do controle de qualidade do material bruto para garantir a segurança e a eficácia do composto resultante (HEFNAWY *et al.*, 2006).

Dessa forma, e considerando o potencial farmacológico e a falta de especificação para o controle de qualidade do extrato bruto da espécie em estudo, que é um pré-requisito para produção e registro de fitomedicamentos (ANVISA, 2010), o presente trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver e validar um método para separação e quantificação, através de CLAE, de rutina, quercetina e obtidas de extrato metanólico da entrecasca das vagens de *D. gardneriana*. Esse estudo tentará prover base científica para o controle de qualidade de extratos preparados da entrecasca das vagens desta planta. A escolha dos três flavonóides foi baseada em estudos que reportaram a presença destes compostos em outra espécie de *Dimorphandra* (SOUSA *et al.*, 1991; FERREIRA *et al.*, 2001; DORES, 2007; LUCCI e MAZZAFERA, 2009).

O método foi validado em conformidade com a regulamentação RE 899 de 2003 da ANVISA. Os seguintes parâmetros de validação foram avaliados: especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez (ANVISA, 2003).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar método analítico para determinação quantitativa dos flavonóides rutina, quercetina e isoquercetina no extrato metanólico de *D. gardneriana* e avaliar sua propriedade antioxidante e sua fotoestabilidade.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar método para obtenção dos teores dos flavonóides rutina, isoquercetina e quercetina em extrato metanólico de *D. gardneriana* por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Determinar a atividade antioxidante do extrato metanólico de *D. gardneriana* através do método DPPH;
- Quantificar o flavonóide rutina em dois fitoterápicos disponíveis no mercado, através da técnica de CLAE;
- Determinar a fotoestabilidade de extrato metanólico de *D. gardneriana* através da exposição das amostra, subdivididas em grupos (controle, protegido e exposto), à câmara de fotoestabilidade;
- Fornecer dados científicos que facilitem o controle de qualidade do extrato de *D. gardneriana*, podendo servir como base para elaboração de monografia desta espécie na Farmacopéia Brasileira.

REFERENCIAL TEÓRICO

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Considerações botânicas

3.1.1 A família *Leguminosae*

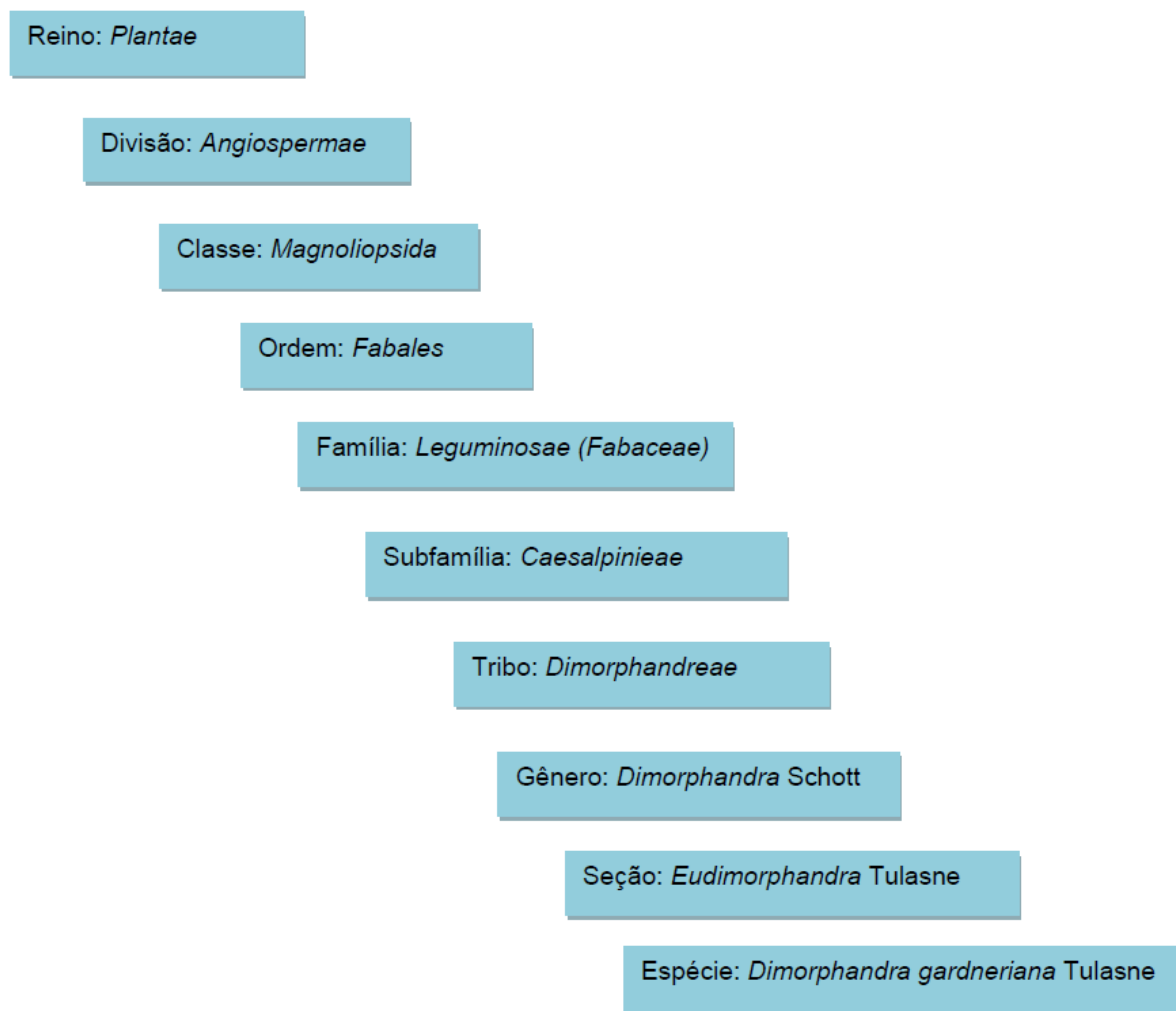
A família *Leguminosae* (Figura 1, p. 27) é constituída por 727 gêneros e 19.327 espécies, e é tradicionalmente subdividida em três subfamílias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae* (LEWIS *et al.* 2005), situando-se entre as três maiores famílias de *Angiospermae* (POLHILL *et al.* 1981; MABBERLEY, 1997). Apresenta distribuição cosmopolita, com centro de diversidade nos trópicos (LEWIS, 1987).

No Brasil, foram catalogados cerca de 210 gêneros e 2.694 espécies (LIMA *et al.*, 210), distribuídas em quase todas as formações vegetacionais (LIMA, 2000).

Apresenta hábito variado, desde ervas perenes até árvores de grande porte, folhas, em geral, compostas, inflorescência racemosa, flores com corola dialipétala e zigomorfa, com exceção das *Mimosoideae*, que possuem corola gamopétala, de simetria radiada, frutos do tipo legume e suas variações, como legume bacóide, nucóide e samaróide, lomento, folículo, sâmara e drupa (BARROSO *et al.* 1991; BARROSO *et al.* 1999).

Em relação à importância econômica, a *Leguminosae* é a mais importante família da classe *Magnoliopsida* (HARBORNE, 1994).

Figura 1 – Classificação taxonômica de *Dimorphandra gardneriana* Tulasne, conforme Martius et al. (1870).



3.1.2 O gênero *Dimorphandra*

O gênero *Dimorphandra* Schott (Fabaceae) pertence à subfamília *Caesalpinieae* (JOLY, 1993) e é formado por três subgêneros: *Dimorphandra*, *Phaneropsia* e *Pocillum* (SILVA, 1986).

As espécies do gênero *Dimorphandra* são todas lenhosas, em geral de porte arbóreo, incluindo desde árvores de médio porte de 3 a 7 m de altura até árvores gigantescas de 30 a 50 m de altura. O caule é em geral cilíndrico, ereto, podendo ser delgado e tortuoso nas espécies do cerrado e em algumas típicas das campinas ou caatingas da Amazônia. A casca do fuste em geral é lisa, finamente

escamosa e persistente, em contraste com as espécies do cerrado como *D. gardneriana* e *D. mollis*, que apresentam casca grossa. As folhas são alternas, bipinadas ou multipinadas, pecioladas, com as margens menos revolutas ou, na maioria das vezes, plana e com menor número de pinas nas folhas, como encontradas em *D. gardneriana* (SILVA, 1986); as formas dos folíolos são variáveis, podendo ser oblongas, ovadas ou arredondadas ou, ainda, como em *D. gardneriana*, cujos folíolos são maiores e menos pilosos que em *D. mollis* (SILVA, 1986). A inflorescência é uma panícula com espigas curtas. O fruto é um legume indeiscente, como observado em *D. mollis* (FERREIRA *et al.*, 2001) e *D. gardneriana*, sendo achatado, com coloração variando de marrom-escuro a quase negro, opaco, de superfície irregular, rugoso, com ápice e base arredondados, bordo irregular, lenhosos (seco), com 9,2 a 18,5 cm de comprimento e 2,4 a 3,5 cm de largura e espessura variando de 0,8 a 1,3 cm; pedúnculo persistente de consistência lenhosa. Apresenta pericarpo bem distinto quando aberto, epicarpo fino e mesocarpo de consistência farinácea, macia, marrom-escuro; endocarpo amarelo esbranquiçado. Tem odor forte e adocicado (FERREIRA *et al.*, 2001).

O número de espécies conhecidas varia de 11 a 43 no gênero *Dimorphandra* (GONÇALVES, 2007). Entre essas, *D. mollis* Benth e *D. gardneriana* Tul. são consideradas as mais importantes por serem frequentemente encontradas na natureza, sendo as mais coletadas e usadas na indústria química e farmacêutica (GONÇALVES *et al.*, 2010; CUNHA *et al.*, 2009).

Este gênero tem grande relevância, sobretudo nos aspectos medicinais e de biodiversidade, por incluir duas espécies que são importantes economicamente como fontes de flavonóides para a indústria farmacoquímica (*D. mollis* Benth. e *Dimorphandra gardneriana* Tul.), e espécies endêmicas do Brasil, como a *D. jorgei* Silva e *D. wilsonii* Rizz., sendo esta ameaçada de extinção (SUDRÉ *et al.*, 2011).

3.1.3 *Dimorphandra gardneriana* Tul.

D. gardneriana Tul. (Figura 2, p. 29), popularmente conhecida como faveira ou fava d'anta, é uma árvore pequena que habita os cerrados. No Nordeste Brasileiro, esta espécie ocorre nos estados do Maranhão, Bahia, Piauí e Ceará (CUNHA *et al.*, 2009; VIEIRA, 2003). Essa espécie ocorre em altitudes que variam

de 190 m até 950 m. No cerrado da Chapada do Araripe, ocorre em altitudes superiores a 800 m (FIGUEIREDO, 1997). No interior da Floresta Nacional do Araripe, *D. gardneriana* ocorre em áreas mais abertas e de luminosidade (SILVA, 2007).

Dimorphandra gardneriana apresenta folhas bipinadas, compostas, com 5-8 jugas formada de 10-20 jugos de folíolos largos-ovados, medindo cada uma de 3 a 4 cm, glabros na face superior e ferrugíneo-tomentosos na face inferior. Flores sésseis dispostas em espigas corimbiformes, os frutos são vagens que contêm glicosídeos flavônicos, principalmente a rutina, compridos, medindo até 15 cm de comprimento, muito procurados pelo gado (CORRÊA, 1984).

Frutos de *D. gardneriana* foram tradicionalmente usados para cura de coceiras pelos índios Paresi de Mato Grosso-MT (MORAIS e MACEDO, 1996) e o tronco para construção de cercas na região do Araripe (SILVA, 2007).

Figura 2 – *Dimorphandra gardneriana* Tul. (indivíduo adulto e infrutescência)



(a) Indivíduo adulto de *D. gardneriana* na Floresta Nacional do Araripe;
(b) - Árvore com frutos; (c)- Infrutescência de *D. gardneriana* (Fonte: SILVA, 2007)

3.1.3.1 Extrativismo na região do Araripe

Dimorphandra gardneriana Tul., por apresentar quantidades apreciáveis do flavonóide rutina, tem despertado grande interesse pela indústria farmacêutica nos últimos anos, sendo alvo de populações extrativistas na Região do Araripe.

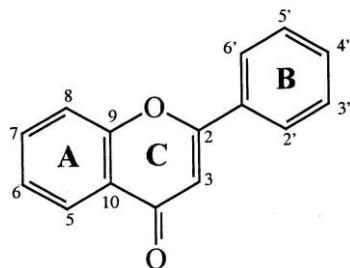
Na região do Araripe - Ceará, a cadeia de comercialização de *Dimorphandra gardneriana* é caracterizada por extratores, corretores, atravessadores e empresa processadora e exportadora. Em 22 comunidades dos municípios de Crato, Barbalha, Missão Velha, Santana do Cariri, Nova Olinda e Jardim, foram identificados 768 extratores (SILVA, 2007). Para extração deste flavonóide, cerca de 600 toneladas por ano de sementes são descartadas (CUNHA *et al.*, 2009).

O preço do quilo da faveira vendida pelos coletores (primeiro elemento da cadeia) é variável. Na região do Araripe, a maioria dos extrativistas vende o quilo a um preço de R\$ 0,15 (quinze centavos), porém outros vendem a R\$ 0,10 (dez centavos), R\$ 0,12 (doze centavos) e R\$ 0,20 (vinte centavos). É variável também entre os elementos da cadeia. Por exemplo, os atravessadores (segundo elemento da cadeia) chegam a vender o quilo a R\$ 0,60 (sessenta centavos). De acordo com cada coletor, a produção média por planta pode variar de 10 a 20 kg (quantidade mais comumente encontrada por planta de acordo com os extratores), 21 a 40kg, 41 a 80 kg e acima de 100 kg. A maioria coleta entre 1000 e 1500 kg por safra. A renda familiar em consequência da colheita de frutos de *D.gardneriana* pode alcançar no ano mais de meio salário mínimo (SILVA, 2007).

3.1.4 Flavonóides

Os flavonóides (Figura 3, p. 31), biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides (Figura 4, p. 33), constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais (CARVALHO *et al.*, 2003). A capacidade dos flavonóides em atuar como agentes antioxidantes nos sistemas biológicos é, talvez, sua atividade mais importante e a mais estudada nos últimos anos (SAKIHAMA *et al.*, 2002; VAYA *et al.*, 2003).

Figura 3 – Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração



(Fonte: SIMÕES *et al.*, 2000)

São encontrados em maior quantidade nas famílias *Leguminosae* e *Compositae* (MARTINS *et al.*, 1994). Esse é o caso para *Dimorphandra* sp.(fava d'anta), cujos frutos tem concentrações consideráveis de flavonóides, principalmente rutina e quercetina (Figura 5, p. 34) (SUDRÉ *et al.*, 2011). De acordo com Hubinger *et al.* (2009), o teor de flavonóides pode atingir cerca de 10,25% no fruto seco.

Santos *et al.* (2006), na caracterização de classes químicas no extrato etanólico dos frutos de *Dimorphandra gardneriana*, observaram o aparecimento e a intensificação de cores diversas, principalmente a cor vermelha, indicativo da presença de várias subclasses de flavonóides (flavonóis, flavanonas, flavononóis e/ou xantanas, livres ou seus heterosídeos).

A rutina (3-o-rutinosídeo-quercetina), flavonóide da classe dos flavonóis, é tradicionalmente empregada como potente antioxidante na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar, e também na prevenção aos danos causados pela radiação ultravioleta (BRUNETON 1991; GUARDIA *et al.*, 2001). Essa substância foi descoberta em 1936 pelo bioquímico Szent-Gyorgi e seus colaboradores (BENTSATH *et al.*, 1936).

A rutina aumenta a resistência dos capilares, consequentemente reduzindo a permeabilidade às células sanguíneas vermelhas (TOMASSINI e MORS, 1966; SOUSA *et al.*, 1991; ALONSO, 1998). Apresenta-se sob a forma de um pó de cor amarelo- esverdeado e também tem ação benéfica ao diminuir a concentração do colesterol LDL (RODRIGUES *et al.*, 2003). Essa substância, por estimular a circulação, é também usada em mesoterapia ou intradermoterapia nos tratamentos contra celulite. É empregada ainda para o preparo de cirurgias em pacientes afetados com icterícia. A rutina exerce uma influência benéfica sobre as

hemorragias produzidas no tratamento profilático de trombose (SILVA, 2007).

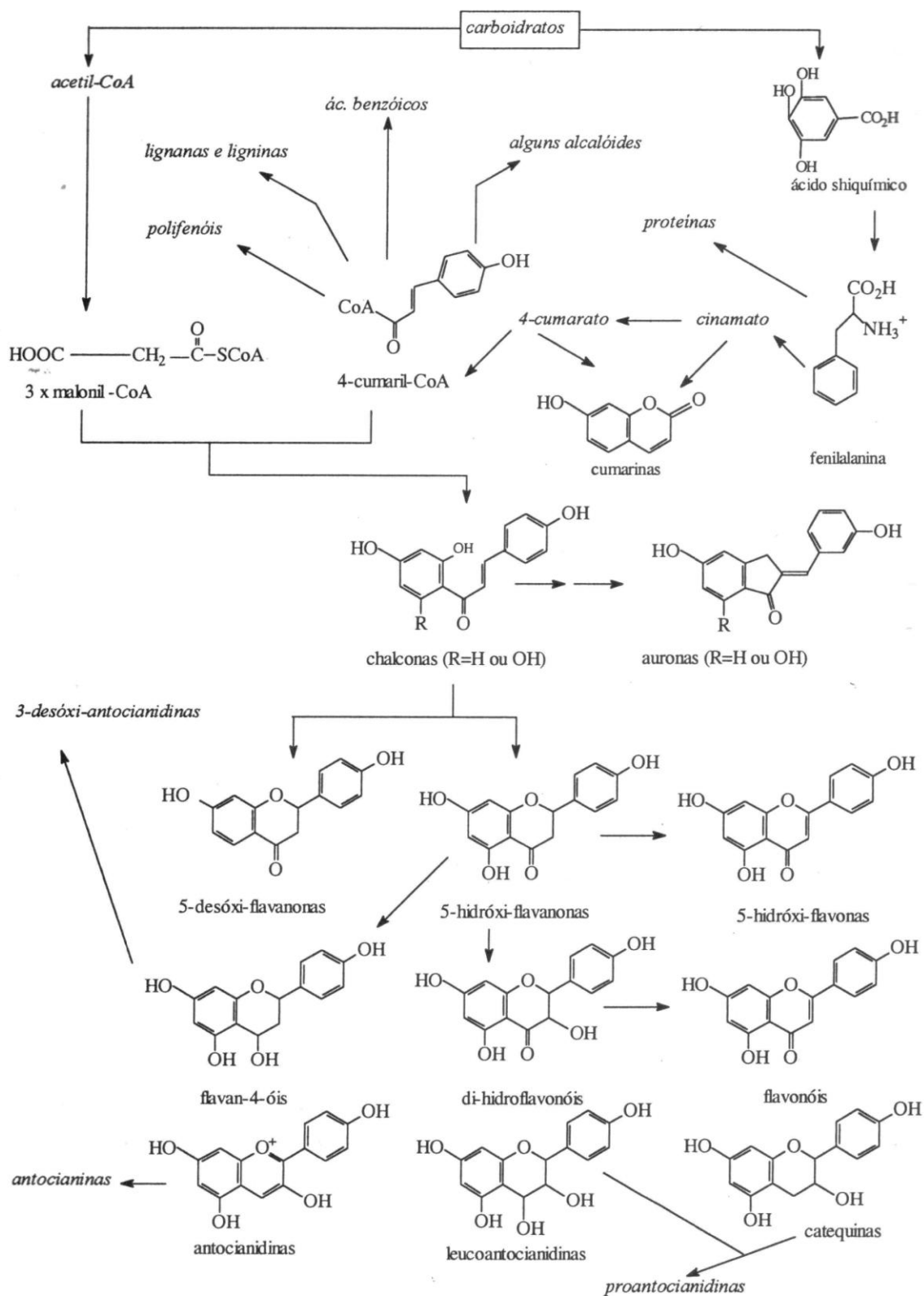
A rutina aumenta o tônus venoso, e acredita-se que tenha associada uma ação “impermeabilizante capilar”, semelhante à vitamina P, devido à inibição da hialuronidase. Tal ação impediria a passagem de proteínas que contribuiriam para a formação do edema (ARAÚJO, 2003).

A quercetina é o flavonóide polifenólico mais abundante na subclasse dos flavonóis e apresenta a propriedade de formar quelatos, sendo, portanto, um potente agente antioxidante no combate de espécies reativas de oxigênio. Além disso, esse composto tem sido extensivamente estudado quanto aos seus efeitos farmacológicos, tais como hepatoprotetor, antiinflamatório, antitumoral e antiasmático (INAL e KAHRAMAN, 2000; LEE *et al.*, 2003; COMALADA *et al.*, 2005; ROGERIO *et al.*, 2009).

Apresenta ainda atividade cardiovascular, reduzindo o risco de morte por doenças coronarianas e diminuindo a incidência de infarto do miocárdio. Enfim, há inúmeras aplicações na medicina, principalmente nos tratamentos de problemas circulatórios e capilares (SILVA, 2007).

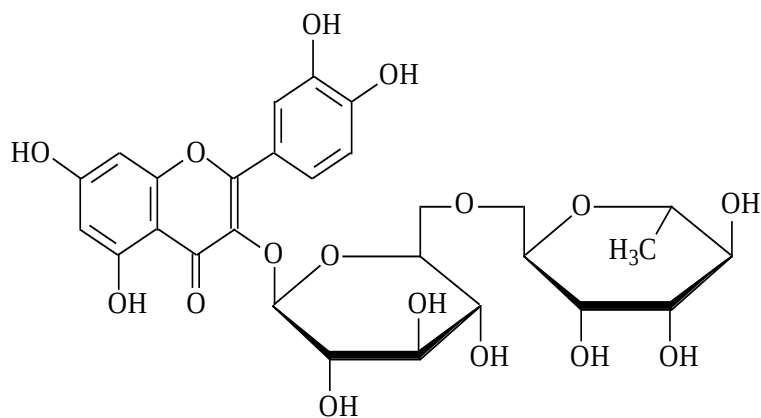
Outra substância que pode ser encontrada no gênero *Dimorphandra* é a isoquercetina (Figura 5, p. 34). Essa substância tem demonstrado efeitos de proteção contra a peroxidação lipídica e o *stress* oxidativo (SILVA *et al.*, 2008).

Figura 4 – Representação esquemática simplificada da biossíntese de flavonóides

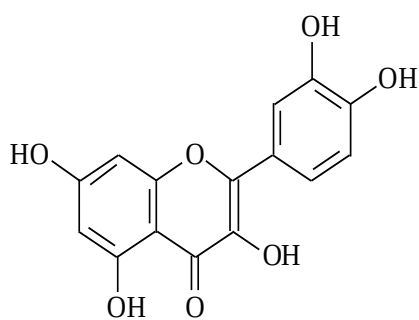


(Fonte: SIMÕES *et al.*, 2000)

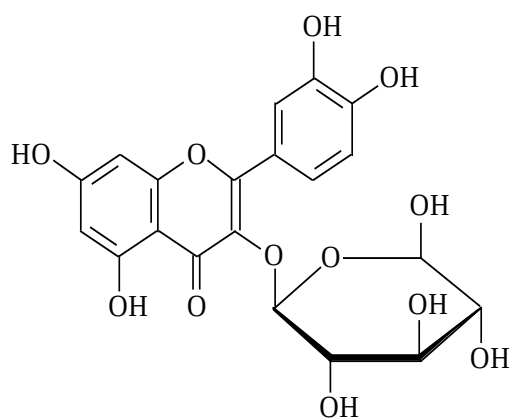
Figura 5 - Estruturas químicas dos flavonóides rutina, isoquercetina e quercetina.



Rutina



Quercetina



Isoquercetina

3.2 Controle de qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos

Plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas (alcalóides, taninos, flavonóides, saponinas, entre outros) e o fazem em diferentes proporções, dependendo do habitat, da pluviosidade, do oferecimento de luz às plantas, das características dos solos, enfim, das características edafo-climáticas, além do seu potencial genético. Algumas substâncias químicas são características de uma determinada espécie vegetal, servindo como parâmetros para a sua caracterização e identificação (MIGLIATO *et al.*, 2007; GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Marcadores químicos podem ser utilizados para ajudar na identificação de materiais vegetais, definir especificações para matérias-primas, padronizar preparações botânicas durante todos os aspectos do processo de fabricação e obter perfis de estabilidade (LAZAROWYCH e PEKOS, 1998).

Os diferentes métodos existentes para a padronização físico-química de fitoterápicos e extratos vegetais incluem, entre outros, técnicas cromatográficas, como a cromatografia em camada delgada (CCD), que permitem a quantificação de componentes de interesse diretamente ou indiretamente, após separação e extração dos compostos, seguida de determinação química ou físico-química (SONAGLIO *et al.*, 1986). No entanto, esta metodologia é considerada obsoleta, principalmente pelo advento das técnicas mais sensíveis como cromatografia líquida e gasosa acopladas a espectrômetro de massas ou ressonância magnética nuclear, entre outras. A técnica acoplada CCD-densitometria, empregando placas de alta eficiência (HPTLC), tem sido utilizada em análise de ativos de drogas vegetais e seus extrativos, tanto qualitativa quanto quantitativamente (KLEIN *et al.*, 2009).

3.2.1 Fitoterápicos

Em 1978, por meio da declaração de Alma-Ata, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais e seus derivados fitoterápicos no âmbito sanitário, tendo em vista que 80% da população mundial utilizam essas plantas ou

preparações destas no que se refere à atenção primária a saúde (OMS, 1978) .

O mercado mundial de fitoterápicos envolve hoje cerca de US\$ 44 bilhões, segundo a consultoria *Analyze and Realize*, que atende algumas das maiores indústrias farmacêuticas do mundo. O valor está crescendo. Segundo a Associação Brasileira de Empresas do Setor Fitoterápico, não existem dados oficiais sobre o tamanho desse mercado no Brasil. As estimativas variam entre US\$ 350 milhões e US\$ 550 milhões. Os pesquisadores acreditam que o país, por ser dono da maior biodiversidade do planeta, deveria ter um papel de liderança na área (ABIFISA, 2010).

O desenvolvimento de um fitoterápico padronizado agrega um valor tecnológico no desenvolvimento da forma farmacêutica contendo plantas medicinais, fugindo daquelas formas farmacêuticas que contém apenas o material vegetal moído, além de garantir a qualidade e eficácia do medicamento (KLEIN *et al.*, 2009).

Em 2006, o Ministério da Saúde do Brasil aprovou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Esta medida tinha como objetivo beneficiar diversos setores da cadeia produtiva, desde o cultivo das plantas até a produção do fitoterápico, com intuito de gerar emprego e renda, de desenvolvimento local e de estruturação dos setores envolvidos na produção. Além de incentivar à pesquisa, desenvolvimento de tecnologia e inovações nas diversas etapas da cadeia produtiva de fitoterápicos (ANVISA, 2006).

Existem no mercado muitos fitoterápicos que possuem flavonóides, combinados ou isolados, em sua constituição. De acordo com a lista de medicamentos similares únicos do mercado (ANVISA, 2012b), esta agência tem, até o momento, concedido registro a dois medicamentos fitoterápicos que possuem em sua composição o flavonóide rutina. Esses medicamentos são o Venoruton® e o Venocur Triplex®.

O Venoruton®, cujo detentor do registro é o laboratório Novartis, não representa uma associação medicamentosa, ou seja, o único princípio ativo é a rutina, em três diferentes concentrações e formas farmacêuticas: comprimido de 500 mg, cápsula de 300 mg e gel de 20mg/g. Em todas as suas apresentações, o medicamento possui a indicação como antivaricoso.

O medicamento Venocur Triplex® do laboratório Knoll, como o próprio nome sugere, apresenta uma associação de extrato seco de castanha da índia (100

mg por drágea), de rutina (300 mg por drágea) e de miroton concentrado (150 mg por drágea). Assim como o anterior, este medicamento é também indicado no tratamento de varizes.

3.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

No caso da extração de flavonóides em geral, a CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) possibilita ao pesquisador um método quantitativo de análise de componentes flavonóides de uma mistura em um nível elevado de definição e sensibilidade (SIMÕES *et al.*, 2000; MARKHAM, 1982; VILEGAS, 1997). Embora possa separar uma ou mais classes de flavonóides, tal técnica é mais utilizada na separação de substâncias de uma mesma classe estrutural e, através do tempo de retenção relativo, pode ser utilizada também na caracterização desses compostos (SIMÕES *et al.*, 2000).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) utiliza instrumentos muito sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados, e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de promover separações dos constituintes e análises qualitativas e quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS *et al.*, 1997).

A CLAE é considerada um método rápido e preciso, permitindo a separação e doseamento de quantidades relativamente pequenas de material (SIMÕES *et al.*, 2000).

A mais importante das vantagens da CLAE é sua versatilidade. Ela pode ser aplicada tanto para compostos orgânicos como para inorgânicos. As amostras podem ser líquidas ou sólidas, iônicas ou covalentes; os gases são as únicas amostras não determinadas pela CLAE. As amostras típicas analisadas pela CLAE são: aminoácidos, explosivos, lipídeos polares, metabólitos de animais e plantas, pigmentos de plantas, polímeros sintéticos polissacarídeos, produtos farmacêuticos, proteínas e tintas (COLLINS *et al.*, 1997).

Para a maioria das análises, a separação é alcançada por partição dos componentes, presentes na solução a ser analisada, entre as fases móvel e estacionária. Sistemas que consistem de fases estacionárias polares e fases móveis apolares são definidos como *cromatografia em fase normal*, enquanto o oposto, fases móveis polares e fases estacionárias apolares, são denominados *cromatografia em fase reversa*. A afinidade de uma substância pela fase estacionária e, conseqüentemente, seu tempo de retenção na coluna, é controlado pela polaridade da fase móvel (BRASIL, 2010).

As análises quantitativas são de fácil execução e grande precisão na CLAE, sendo comum na maioria dos seus métodos apresentarem desvios relativos inferiores a 0,5% (COLLINS *et al.*, 1997).

Uma separação bem sucedida requer um equilíbrio adequado de forças intermoleculares entre os três participantes ativos do processo de separação: soluto, fase móvel e estacionária. Em cromatografia por partição, a polaridade da fase estacionária é combinada aproximadamente com a do analito. A fase móvel, de polaridade consideravelmente diferente, é usada para eluição. Feitas as escolhas, a obtenção de uma separação satisfatória pode ser alcançada através de uma série de experimentos de tentativa e erro ou através da utilização de programas computacionais, como o método simplex (GUILLAUME e GUINCHARD, 1995).

Entre os suportes mais comumente usados, encontram-se substâncias inorgânicas como gel de sílica e alumina (óxido de alumínio), que são geralmente utilizadas para separar compostos lipofílicos. Materiais orgânicos como celulose, poliamida e géis de dextrano são aplicados na separação de substâncias hidrofílicas, como aminoácidos e açúcares. Outras alternativas utilizadas são os materiais modificados quimicamente, como a celulose acetilada ou gel de sílica substituído por cadeias orgânicas alifáticas de C₈ a C₁₈ (FALKENBERG *et al.*, 2000).

A CLAE pode utilizar diferentes tipos de detectores específicos. Os detectores mais frequentemente utilizados em cromatografia líquida de alta eficiência são os espectrofotométricos (UV/Vis). Eles são utilizados para detectar compostos com grupamentos cromóforos e podem apresentar comprimento de onda fixo, variável ou múltiplo. Os detectores de comprimento de onda fixo operam em um único valor, geralmente, 254 nm. Os detectores de comprimento de onda variáveis contêm uma fonte contínua de emissão, como uma lâmpada de deutério ou xenônio e geram radiação monocromática a um valor selecionado pelo operador, podendo

ainda ser programados para alterar o comprimento de onda durante o desenvolvimento da análise. Já os múltiplos medem, simultaneamente, a absorbância em dois ou mais comprimentos de onda, sendo denominados detectores de arranjo de diodos (DAD). Além desses, o cromatógrafo líquido de alta eficiência pode ser acoplado a detectores de índice de refração, fluorimétricos, eletroquímicos, de espectrometria de massa e de condutividade (BRASIL, 2010).

Existem sistemas comercializados que, automaticamente, injetam uma amostra, realizam a separação, imprimem os tempos de retenção, integram as áreas dos picos e reciclam qualquer uma das frações que está sendo eluída. Esses sistemas podem regenerar suas condições iniciais de operação para, em seguida, injetar uma nova amostra. Essa automatização é conseguida com o emprego de microcomputadores conjugados ao sistema cromatográfico, o que possibilita:

- a) a identificação das espécies pela comparação dos tempos de retenção determinados com os tempos de retenção padrão armazenados em memória;
- b) o cálculo das concentrações das espécies por meio das áreas dos picos, o que se consegue com a aplicação de técnicas de calibração;
- c) o aumento da resolução na separação de duas substâncias, quando não separadas completamente, pela reciclagem automática das frações, correspondendo a eluição das substâncias juntas (COLLINS *et al.*, 1997).

3.3 Validação de Métodos Analíticos

A validação é um conjunto de procedimentos que visa estabelecer que a metodologia analítica é capaz de gerar resultados confiáveis. Os procedimentos para validação estão descritos em resoluções e guias. As resoluções são documentos com poder de lei; os guias são documentos que sugerem uma linha de trabalho a ser seguida e são, portanto, abertos para interpretação (RIBANI *et al.*, 2004).

Conforme a resolução de nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.

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, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise (ANVISA, 2003). As características de desempenho que devem ser testadas no processo de validação devem ser baseadas na intenção do uso do método (ICH, 2005; USP, 2011; ANVISA, 2003), os quais são divididos em quatro categorias: (I) testes quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matéria-prima; (II) testes quantitativos ou ensaio-limite para determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos ou matéria-prima; (III) teste de performance e (IV) testes de identificação.

A especificidade é indicada para testes de identificação do princípio ativo, excluindo-se a necessidade dos outros parâmetros. Excetuando-se o limite de detecção, os demais parâmetros devem ser avaliados para os testes de quantificação de impurezas. Para o ensaio limite de impurezas, em que não é necessária a análise quantitativa, a avaliação do limite de detecção e da especificidade é suficiente. Para os testes de determinação quantitativa, é indicado que se avaliem todos os parâmetros, exceto os limites de detecção e quantificação (ICH, 2005).

A especificidade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (USP, 2011; VESSMAN *et al.*, 2001).

A especificidade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliar é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (CODEX, 1995; ICH, 2005, SHABIR, 2003; SWARTZ e KRULL, 1998). Uma segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro (HUBER, 1998; JENKE, 1998; VESSMAN *et al.*, 2001). Essas duas maneiras são as mais utilizadas.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer

resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ICH, 2005; USP, 2011; SWARTZ e KRULL, 1988).

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie (AUGUSTO *et al.*, 2000). Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta, obtida por análise de regressão linear, chamada de curva analítica (BARROS NETO *et al.*, 2002).

Para verificar se a equação de regressão linear é estatisticamente significativa podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima (BARROS NETO *et al.*, 2001; CHUI *et al.*, 2001). A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual ou maior que 0,99.

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (ICH, 2005; INMETRO, 2003).

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade. A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 2005; INMETRO, 2003).

De acordo com o INMETRO (2003), a robustez de um método (“robustness”) mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros, como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em CG, bem como o tempo de extração, agitação, etc.

As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos

(RIBANI *et al.*, 2004).

Em CLAE, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando o conteúdo de metanol na fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI *et al.*, 2004).

3.4 Atividade Antioxidante

Os antioxidantes são compostos que protegem as células contra os efeitos nocivos causados por espécies reativas (MUSCHIETTI e MARTINO, 2007). Os flavonóides e outros derivados fenólicos são conhecidos por atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes, como o ânion superóxido, radical hidroxila ou radical peróxido (ZUANAZZI e MONTANHA, 2007). A capacidade dos flavonóides em atuar como agentes antioxidantes nos sistemas biológicos é, talvez, sua atividade mais importante e a mais estudada nos últimos anos (SAKIHAMA *et al.*, 2002; VAYA *et al.*, 2003).

Quimicamente, são três as características que conferem aos flavonóides suas importantes propriedades antioxidantes (RICE-EVANS *et al.*, 1997). São elas: substituintes doadores de hidrogênio (grupos hidroxilas fenólicos), que permitem aos flavonóides sofrer uma reação redox que os ajuda a capturar radicais livres mais facilmente e um sistema de deslocamento estável (anéis aromáticos e heterociclos e múltiplas uniões insaturadas), que ajuda a deslocar a distribuição de elétrons e a presença de certos grupos estruturais capazes de formar complexos quelantes de metais de transição que podem regular a produção de EROs.

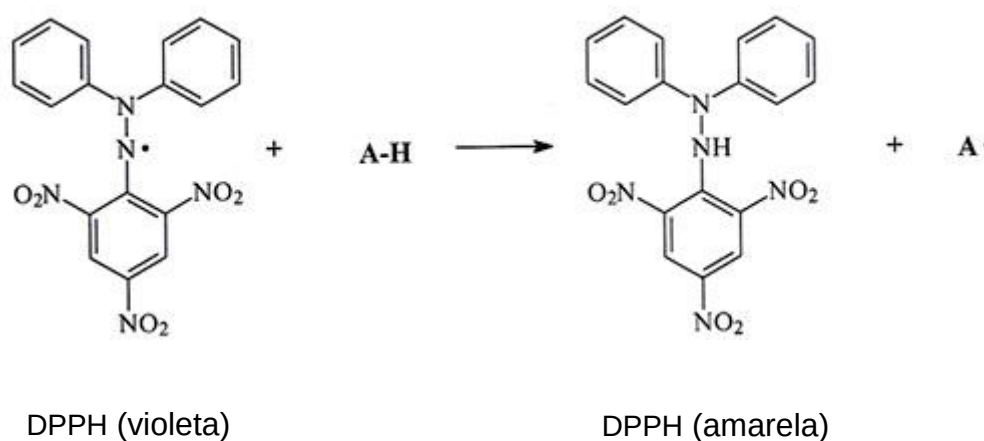
Dugas *et al.* (2000) avaliaram a atividade antioxidante de uma série de flavonóides contra radicais peroxilas gerados por hemólise térmica e estudaram a relação estrutura-atividade. O composto mais ativo foi a quercetina, seguido por seu derivado 3- glicosilado, a rutina, com atividade captadora de EROs 7 e 5 vezes maiores que o trolox (análogo da vitamina E), respectivamente.

As metodologias mais comuns para se determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível são as que envolvem um radical cromóforo,

simulando as espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) um dos mais utilizados (Figura 6, p. 43) (ARNAO *et al.*, 2000).

O DPPH é um radical cromóforo muito estável, com um pico de absorção no comprimento de onda de 531 nm, em meio etanólico, apresentando solução de coloração violeta intensa (BLOIS, 1958; ARNAO *et al.*, 2000). À medida que o DPPH sofre redução pelos componentes *scavengers* presentes na solução teste, observa-se mudança da coloração da solução original de violeta intensa para amarela, proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante presente, em conformidade com as leis de Lambert e Beer, podendo ser medida espectrometricamente a 531 nm (BLOIS, 1958).

Figura 6 – Estrutura do DPPH antes e depois da reação com antioxidante (AH).



(Fonte: HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007)

3.5 Estudos de Fotoestabilidade

Os guias estabelecidos pelo ICH preconizam testes de fotoestabilidade tanto para a substância ativa como para os produtos acabados (ICH, 2003). O teste tem como objetivo demonstrar que uma exposição à luz não resulta em alterações significantes no produto (ANVISA, 2012a).

A Anvisa (2012-A) preconiza duas opções para fontes de luz. Na primeira opção, deve-se utilizar uma fonte de luz similar ao padrão de emissão D65/ID65, como uma lâmpada fluorescente artificial combinando emissão visível e UV. D65 é o padrão internacional reconhecido para luz do dia, como definido na ISO 10977:1993. ID65 é o equivalente ao padrão de luz indireta de interiores. Para fonte de luz emitindo radiação significativa abaixo de 320nm, deve ser utilizado filtro(s) para eliminar tais radiações. Na segunda opção, a amostra deve ser exposta à uma combinação das seguintes lâmpadas: a) Lâmpada branca fluorescente fria similar à ISO 10977:1993 b) Lâmpada fluorescente UV com espectro distribuído entre 320nm e 400nm, e emissão máxima de energia entre 350nm e 370nm.

Para realização do teste de fotoestabilidade, as amostras devem ser expostas a não menos que 1,2 milhões de lux.hora, integrados a uma energia de ultra-violeta próxima de não menos que 200 watt.horas/m²(ANVISA, 2012a).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

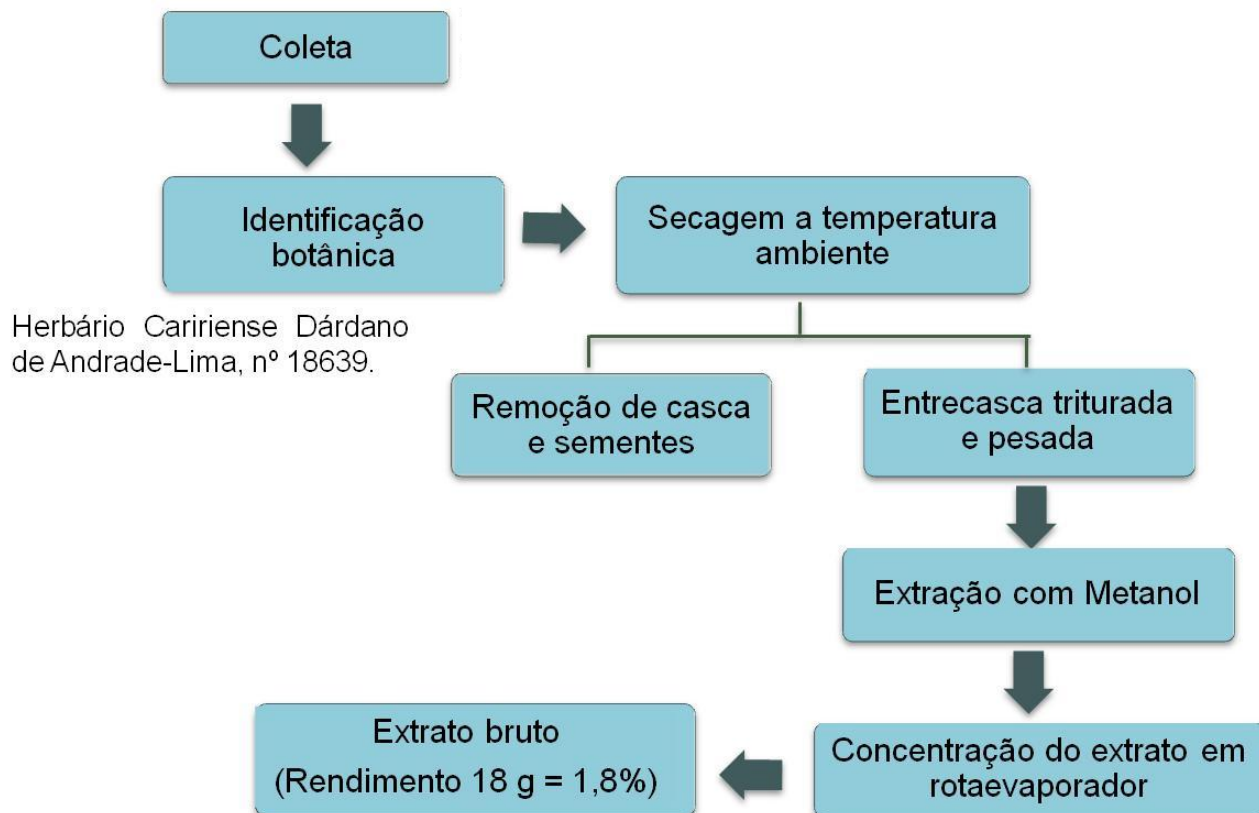
4.1 Material Vegetal

Vagens de *D. gardneriana* Tul., *Leguminosae*, foram coletadas entre Junho e Julho de 2010 na cidade de Crato, estado do Ceará, Brasil. O material foi identificado pela Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Regional do Cariri. Exsicatas da espécie, registradas sob nº 18639, foram depositadas no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima (HCDAL) na mesma instituição.

4.2 Preparação do extrato

O material vegetal foi submetido a um processo de secagem à temperatura ambiente. A casca e as sementes foram então removidas. A entrecasca foi separada e triturada. Foram pesados 1000 gramas do pó e procedeu-se a extração com 2 L de metanol, à temperatura ambiente, durante 72 h. Em seguida, o líquido foi filtrado e concentrado utilizando um evaporador rotativo sob pressão reduzida para se obter 18 g de extrato bruto, rendimento de 1,8% (Fluxograma 1, p. 47).

Fluxograma 1 – Representação esquemática simplificada da metodologia de obtenção do extrato bruto de *D. gardneriana*.



4.3 Substâncias Químicas de Referência

As substâncias rutina, quercetina e isoquercetina (Sigma, St. Louis, MO, USA) de alto grau de pureza (pureza > 98.0%) foram utilizadas como padrões externos nas análises por CLAE.

4.4 Solventes e reagentes

Todos os reagentes e solventes foram grau HPLC (Tedia, Fairfield, OH, EUA), exceto o ácido fosfórico (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e o fosfato de sódio dibásico (Caledon, Georgetown, Ont., Canadá). Água ultra-pura foi obtida através do equipamento Milli-Q Gradient® (Millipore, Bedford, MA, EUA), utilizando-se uma água com condutividade menor que 0,60 $\mu\text{S}/\text{cm}$ em todas as análises.

4.5 Desenvolvimento e validação do método analítico

4.5.1 Seleção de condições cromatográficas

Após cuidadosas buscas de artigos e literaturas que tivessem trabalhado com um ou mais flavonóides objetos do presente estudo e de ensaios preliminares com diferentes solventes, fases móveis e estacionárias, foram definidas as condições cromatográficas apresentadas adiante.

As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade da Farmace Indústria Químico-Farmacêutica Cearense Ltda., utilizando um sistema de HPLC (Shimadzu, Japão) (Figura 7, p. 49) constituído por uma bomba binária (Modelo LC-10 ADvp), um detector com comprimento de onda UV/VIS variável (Modelo SPD 10 AVP), uma válvula de injeção manual (Rheodyne®, EUA) com um *loop* de 20 µL, e um desgaseificador (DGU 14A). A coleta de dados e análises foram realizadas utilizando o *software* Shimadzu CLASS-VP™. Um gradiente de eluição foi realizada numa coluna Hypersil Thermo Scientific C₁₈ (250 mm x 4,0 mm) (Thermo Scientific, EUA), com tamanho da partícula de 5µm. A fase móvel consistiu de duas soluções diferentes, uma solução A e uma solução de B. Ambas as soluções continham tetrahidrofurano (THF) e tampão de fosfato de sódio dibásico (15,6g/L) ajustado para pH 3,0 com ácido fosfórico, em que a proporção de THF e tampão na solução A foi 5:95 e 40:60 na solução B.

Todas as soluções foram desgaseificadas e filtradas através de membrana filtrante de 0,45µm de poro (Millipore, Bedford, EUA). As separações foram realizadas através de um programa de gradiente de eluição da seguinte forma: de 0 a 10 min, a solução B seguindo uma mudança linear de 50% a 100%, a partir de 10 a 15 min, isocrática com 100% de B; 15-16 min, com a solução B alterando linearmente de 100% a 50% e de 16 a 20 min, isocrática com 50% de B (Tabela 1, p. 49). Utilizou-se fluxo da fase móvel de 0,8 mL/min e volume de injeção de 20 µL. Realizou-se a detecção por UV no comprimento de onda de 356 nm. Usando estas condições cromatográficas, pôde-se confirmar o tempo de retenção de rutina, quercetina e isoquercetina pela injeção de cada padrão separadamente.

Figura 7 – Cromatográfico líquido de alta eficiência (Shimadzu, Japão), utilizado para determinação quantitativa dos flavonóides rutina, quercetina e isoquercetina no extrato metanólico de *Dimorphandra gardneriana*.



(Fonte: do Autor)

Tabela 1 – Programa de gradiente de eluição utilizado para promover a separação dos três flavonóides (RUT, ISO e QUE)

Tempo	Solução A	Solução B
0 – 10 minutos	50% → 0%	50% → 100%
10 – 15 minutos	0%	100%
15 – 16 minutos	0% → 50%	100% → 50%
16 – 20 minutos	50%	50%

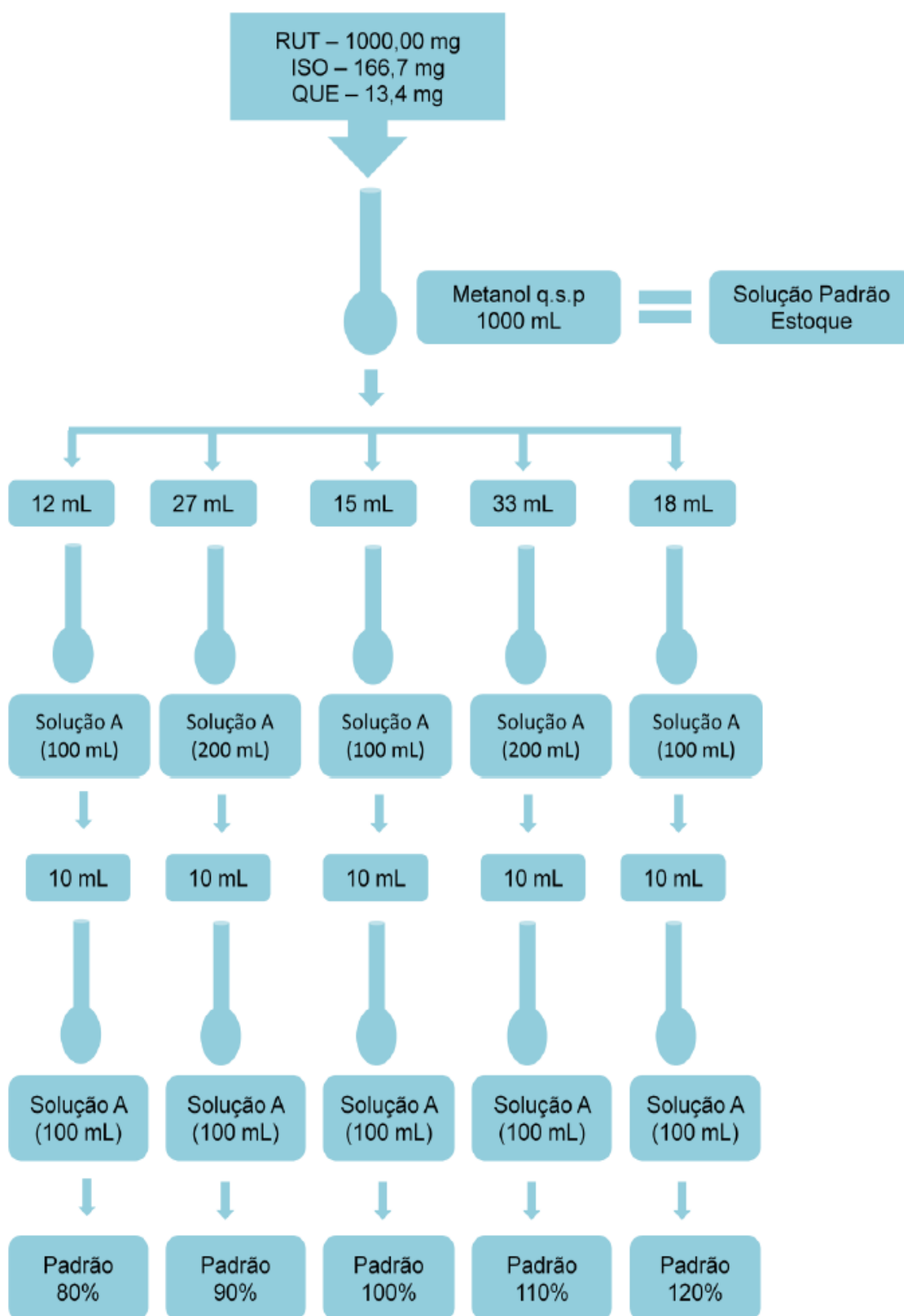
4.5.2 Preparo do padrão

Quantidades, exatamente pesadas, dos padrões de referência (rutina - RUT, quercetina - QUE; isoquercetina - ISO) foram misturadas e dissolvidas em metanol em balão volumétrico de 1000 mL, a fim de obter uma solução estoque. Esta solução resultou nas seguintes concentrações dos três compostos: 1000 µg / mL (RUT), 166,7 µg / mL (ISO) e 13,4 µg / mL (QUE). Os padrões de trabalho foram preparados por diluição gradual da solução estoque com a solução A de fase móvel (Fluxograma 2, p. 51).

4.5.3 Preparo da amostra

No presente estudo, 100 mg do extrato bruto foram dissolvidos volumetricamente em 100 mL de metanol. Essa solução foi submetida a sonicação, a fim de acelerar o processo de dissolução das partículas. Depois, 2 mL desta solução foram transferidas, com auxílio de pipeta volumétrica, para um balão volumétrico de 100 mL e diluídos para o volume com a solução A. Obteve-se uma concentração final de 0,02 mg/mL de extrato de *D. gardneriana* (EDG).

Fluxograma 2 – Metodologia de preparo das soluções padrões, contendo rutina, isoquercetina e quercetina,



4.5.4 Método de Validação

Na validação do método analítico utilizado para quantificação de rutina, quercetina e isoquercetina no extrato metanólico de *D. gardneriana*, determinou-se os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão e robustez. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o GraphPadPrism5[®] and EXCEL[®] software para obtenção dos parâmetros de desvio padrão relativo e coeficientes de correlação.

4.5.4.1 Especificidade

A especificidade é a capacidade do método distinguir o analito de outros componentes na amostra. Especificidade de um método de HPLC é demonstrado pela separação do analito de outros potenciais componentes, tais como impurezas, produtos de degradação, ou excipientes (DONG, 2006). Neste estudo, demonstrou-se a especificidade pela injeção de uma amostra do branco, onde 2 mL de metanol HPLC foram transferidos volumetricamente para um balão volumétrico e diluídos para 100 mL com solução A. Além disso, determinou-se os pratos teóricos, a assimetria e a resolução entre os picos dos principais flavonóides que poderiam ser encontrados no extrato metanólico de *D. gardneriana*, através de análises das soluções padrão e amostra. Esses parâmetros foram calculados pelo software Shimadzu CLASS-VPTM versão 6.12 SP2.

4.5.4.2 Linearidade

A linearidade entre a área do pico e a concentração foi determinada utilizando três curvas de calibração obtidas com soluções padrões a cinco níveis de concentração de cada padrão de rutina, quercetina e isoquercetina. As concentrações dos três compostos na solução considerada como 100% foram 15 µg/mL (RUT), 2,5 µg/mL (ISO) e 0,2 µg/mL (QUE). Utilizou-se também as concentrações de 80%, 90%, 110% e 120% (Fluxograma 2, p. 51) (Anvisa, 2003). Os dados de área do pico *versus* concentração da substância foram tratados por análise de regressão linear.

4.5.4.3 Sensibilidade

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram determinados das curvas de calibração dos padrões de RUT, QUE e ISO. Calculou-se LOD e LOQ, empregando-se as fórmulas abaixo, em que DP é o desvio padrão da resposta e IC é a inclinação da curva de calibração (ANVISA, 2003).

$$\text{LOD} = \frac{\text{DP} \times 3}{\text{IC}} \qquad \text{LOQ} = \frac{\text{DP} \times 10}{\text{IC}}$$

4.5.4.4 Exatidão

Avaliou-se a exatidão pela média dos valores de recuperação encontrados, através da adição de concentrações conhecidas de padrão de rutina e isoquercetina a três níveis de concentração (10%, 20% e 30%) da concentração inicial da amostra. Para avaliação da recuperação de quercetina adicionou-se padrão a amostra de forma que a concentração final teórica atingisse, respectivamente, 0,220 µg/mL, 0,240 µg/mL e 0,260 µg/mL deste composto. Cada solução foi injetada em triplicata. Calculou-se a média das recuperações pela seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(\text{concentração encontrada} - \text{concentração original}) \times 100}{\text{concentração adicionada}}$$

4.5.4.5 Precisão

A precisão do método foi investigada em relação a repetibilidade (intra-corrida) e precisão intermediária (inter-corrida) pela determinação da solução padrão a 100%. Para executar a precisão intra-corrida do método, a amostra foi injetada 6 vezes em uma sequência de corrida e a precisão inter-corrida determinada pela injeção da amostra em diferentes dias (6 injeções por dia) e por outro analista.

4.5.4.6 Robustez

A amostra foi analisada sob as condições definidas neste estudo e comparada a resposta do método diante das seguintes alterações: mudança no comprimento de onda de 356 nm para 358 nm, utilização de coluna cromatográfica de fabricante diferente (Phenomenex® - Luna C₁₈; 250 mm x 4,0 mm, tamanho da partícula 5 µm) e variação no pH da fase móvel de 3,0 para 3,1.

4.6 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato metanólico da entrecasca das vagens de *D. gardneriana* foi determinada pelo método fotolorimétrico *in vitro* por seqüestro do radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (MENSOR *et al.*, 2001). A elevada habilidade de uma amostra em retirar o radical livre estável DPPH está relacionado à atividade antioxidante da mesma (DUARTE-ALMEIDA, 2007).

As amostras para a realização do ensaio foram preparadas adicionando-se 1 mL da solução de DPPH (60 µM) em 2,5 mL de soluções dos extratos que, diluídos em metanol, estavam nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/mL do extrato bruto de *D. gardneriana*, em triplicata (Fluxograma 3, p. 55).

A solução de DPPH possui uma coloração roxa intensa e a atividade antioxidante de uma amostra pode ser visualizada pelo progressivo descoloramento da solução de DPPH, ao final do qual a mesma torna-se amarelada (NUNE *et al.*, 2008). Após o tempo de reação, sem luminosidade de 30 min das amostras preparadas, obteve-se as absorbâncias com auxílio de Espectrofotômetro de Ultravioleta UV-Vis ajustado no comprimento de onda de 531 nm.

Todas as leituras foram realizadas em triplicata e, com a média dos dados obtidos, calculou-se a diferença de absorbância entre as amostras e o controle negativo, sendo as atividades antioxidantes (AA) percentuais obtidas por regressão linear, para cada fase, obtendo-se, assim, a concentração das amostras que promovesse a diminuição para 50% da concentração inicial de DPPH, definida como Concentração Efetiva (CE₅₀) (MENSOR *et al.*, 2001).

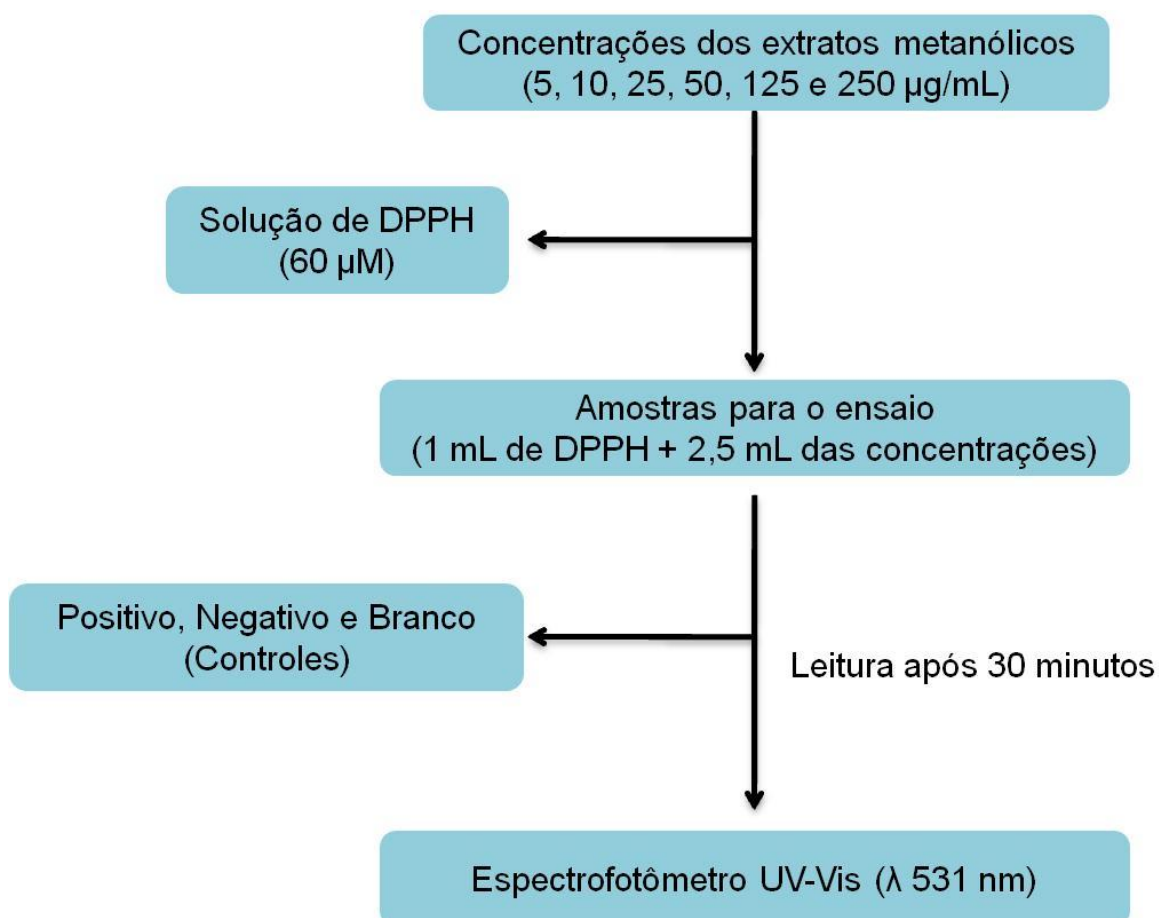
Um teste em branco foi realizado adicionando-se 1 mL de metanol a 2,5 mL das concentrações dos extratos. Como controle negativo, utilizou-se a mistura de

1 mL da solução de DPPH com 2,5 mL de metanol e como controle positivo, 2,5 mL de soluções metanólicas de BHT nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/mL e 1 mL da solução de DPPH.

A atividade antioxidante (AA) das amostras por seqüestro do DPPH foi expressa em porcentagem, de acordo com a seguinte fórmula:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[(\text{Absorbância}_{\text{amostra}} - \text{Absorbância}_{\text{branco}}) \times 100]}{\text{Absorbância}_{\text{controle negativo}}} \right\}$$

Fluxograma 3 – Representação esquemática simplificada do procedimento analítico para avaliação da atividade antioxidante de extrato metanólico de *D. gardneriana*, empregando o método do DPPH.



4.7 Doseamento de rotina em dois fitoterápicos

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade do método validado, os fitoterápicos (Venoruton® e Venocur Triplex®) foram analisados por CLAE, pela utilização das mesmas condições cromatográficas definidas neste estudo, utilizando-se a solução padrão a 100%, com concentração final de rutina em 15 µg/mL.

O Venoruton®, em cápsula com 300 mg de rutina, teve seu conteúdo dissolvido em metanol e transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL. Ao final desse processo, completou-se para o volume do recipiente com o mesmo solvente. Em seguida, pipetou-se 5 mL desta solução para um balão volumétrico de 200 mL e diluiu-se com a solução A da fase móvel, a fim de obtermos uma solução com concentração final teórica de rutina em 15 µg/mL.

O Venocur Triplex®, cuja forma farmacêutica é drágea, foi triturado, dissolvido em metanol e transferido para balão volumétrico de 500 mL, completado para o volume do recipiente com o mesmo solvente. A fim de acelerar o processo de dissolução das partículas, a solução foi submetida a banho ultrassônico por 5 minutos e após este procedimento, 5mL da solução foram transferidos, com auxílio de pipeta volumétrica, para balão volumétrico de 200 mL e diluídos em solução A. A concentração final teórica de rutina na solução, que partiu da drágea de 300 mg, é de 15 µg/mL.

4.8 Estudo de fotoestabilidade do extrato metanólico de *D. gardneriana*

Preparou-se a amostra conforme subitem 4.5.3 e realizou-se a divisão em três grupos (Fluxograma 4, p. 57), sendo o primeiro utilizado como controle, ou seja, não exposto a qualquer condição de estresse, o segundo protegido com papel alumínio e exposto à câmara de fotoestabilidade e o último grupo também submetido à exposição da câmara UV, mas sem qualquer proteção.

As amostras foram expostas a câmara de fotoestabilidade (Figura 8, p. 57), marca Zem, que apresenta as seguintes dimensões: 156 x 47,5 x 34 cm (comprimento, altura e profundidade). Para determinação da intensidade da luz, empregou-se um luxímetro Minipa®. Este estudo foi realizado no laboratório de Controle de Qualidade da Farmace Indústria Químico-Farmacêutica Cearense Ltda.

A exposição ocorreu por um período de 54 horas, tempo definido pela

razão entre a quantidade de exposição preconizada pelo órgão de vigilância sanitária nacional (1,2 milhões de lux.hora) e a intensidade da luz, medidas em lux, com o auxílio de luxímetro calibrado (ANVISA, 2012a).

Após o tempo de exposição das amostras, as mesmas foram submetidas a análises frente ao padrão 100 % (RUT – 15 µg/mL; ISO – 2,5 µg/mL; QUE – 0,2 µg/mL), conforme condições cromatográficas definidas no presente estudo.

Fluxograma 4– Representação esquemática simplificada da metodologia realizada para o estudo de fotoestabilidade.

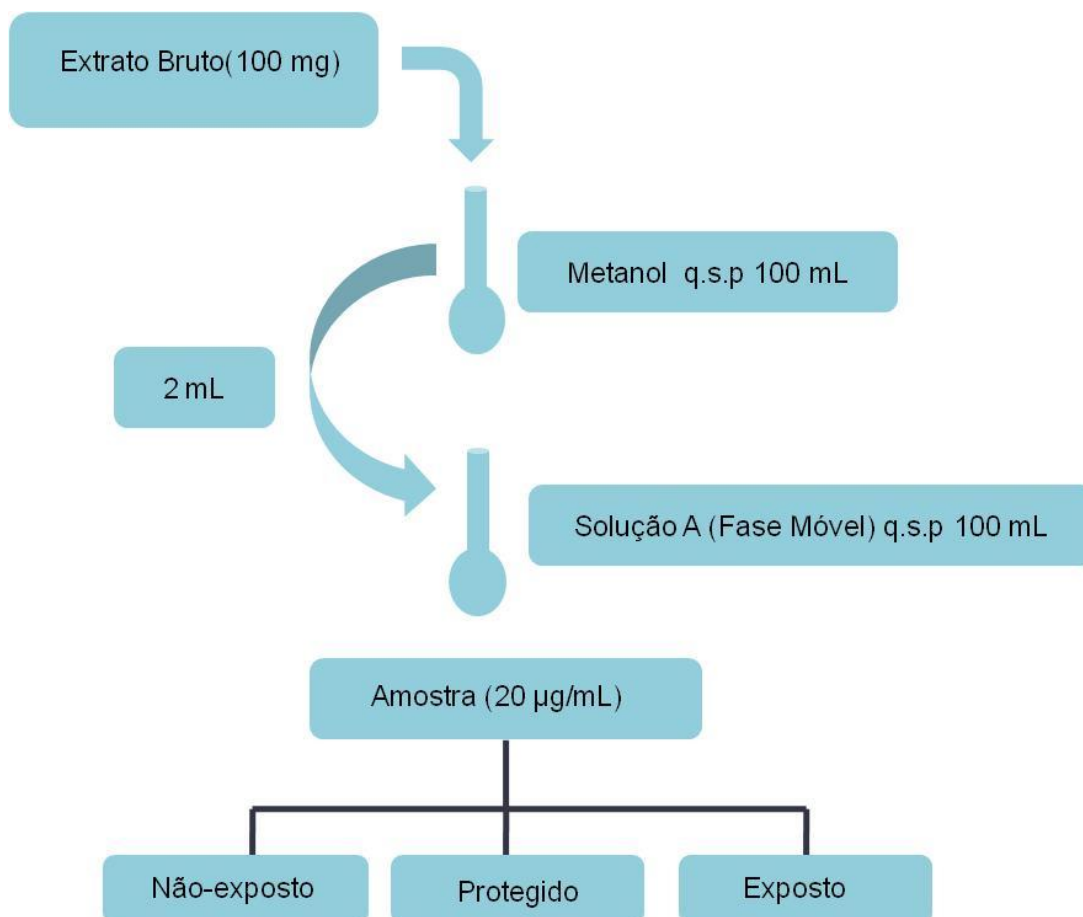


Figura 8 – Câmara de Fotoestabilidade Zem®, utilizada para exposição das amostras de *D. gardneriana* na realização dos estudos de fotoestabilidade.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e validação de método por CLAE

5.1.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico e Especificidade

O método por CLAE conduzido neste estudo objetivou o desenvolvimento de um sistema cromatográfico capaz de eluir e apresentar boa resolução na separação dos flavonóides de interesse presentes no extrato bruto de *D. gardneriana*.

As investigações preliminares foram direcionadas avaliando o efeito de diversos fatores no sistema, como comprimento de onda de detecção, características da coluna cromatográfica e composição da fase móvel. Para determinação do comprimento de onda, realizou-se uma varredura com padrão de rotina em espectrofotômetro UV-Vis entre 220 e 360 nm, verificando-se máximo de absorção em 254 nm e 356 nm. Posteriormente, procederam-se testes preliminares em CLAE com padrão (RUT, QUE e ISO) e amostra do extrato. De posse dos cromatogramas nas duas condições, o comprimento de onda 356 nm resultou em melhor perfil cromatográfico, uma vez que no comprimento de 254 nm outros picos foram evidenciados.

Na fase inicial, também definiu-se as concentrações dos três flavonóides na solução padrão, de forma que as concentrações dos mesmos estivessem próximas a valores estimados para amostra. Para quercetina, excepcionalmente, sua concentração foi reduzida até a nível em que os parâmetros de validação não fossem comprometidos e possibilitasse sua quantificação.

Os parâmetros de conformidade do sistema para métodos analíticos por CLAE e os limites recomendados são fator de cauda ou assimetria menor igual a 2,0 e número de pratos teóricos, geralmente, > 2000 por coluna (FDA, 2000; SNYDER *et al.*, 1997).

A adequabilidade do sistema ficou comprovada através da análise dos parâmetros acima, que apresentou valor médio de 11267 pratos teóricos para rotina, 17787 para isoquercetina e 53827 pratos teóricos para quercetina, valor este obtido somente pela corrida do padrão. Os fatores caudais (assimetria) para os três compostos apresentaram valores entre 1,2 e 1,35, ou seja, dentro dos limites

especificados na literatura citada no parágrafo anterior. Além disso, o tempo de corrida de 20 minutos é favorável para agilidade da análise. Os valores para os parâmetros avaliados foram calculados automaticamente pelo *software* do cromatógrafo.

Após definição e verificação das condições cromatográficas, a metodologia foi validada.

A especificidade pode ser observada no cromatograma apresentado na Figura 9 (p. 61), na qual não há pico referente à substância analisada. Dessa forma, o solvente e/ou fase móvel não apresentam interferência nos constituintes do extrato, sendo específico para determinação de rutina, quercetina e isoquercetina nas condições estudadas. Além disso, a resolução observada entre os picos foi maior que 5,00 para os compostos RUT e ISO e maior que 29,00 para RUT e QUE, conforme resultados obtidos com a injeção do padrão e da amostra (Figura 10 e 11, p. 62) .

Figura 9 – Cromatograma do ensaio da especificidade com a injeção de um branco

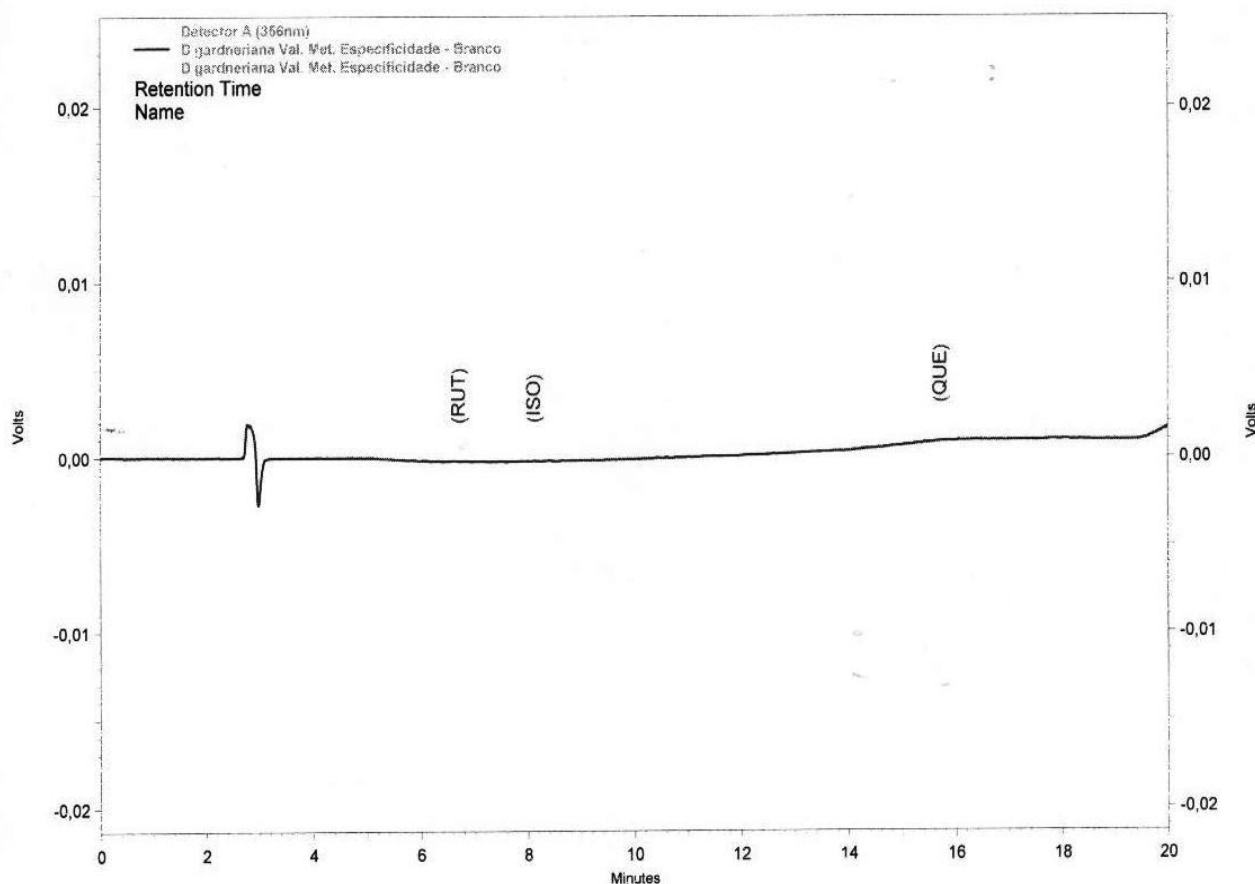


Figura 10 – Cromatograma do ensaio da especificidade com a injeção do padrão

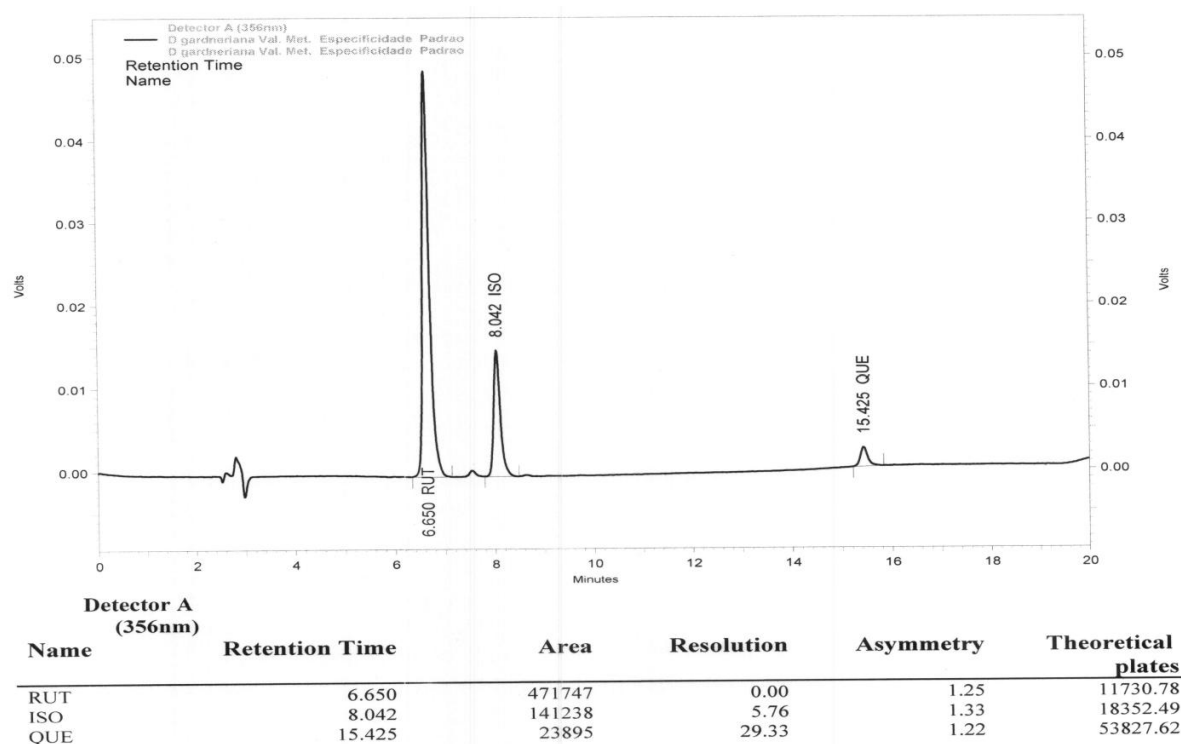
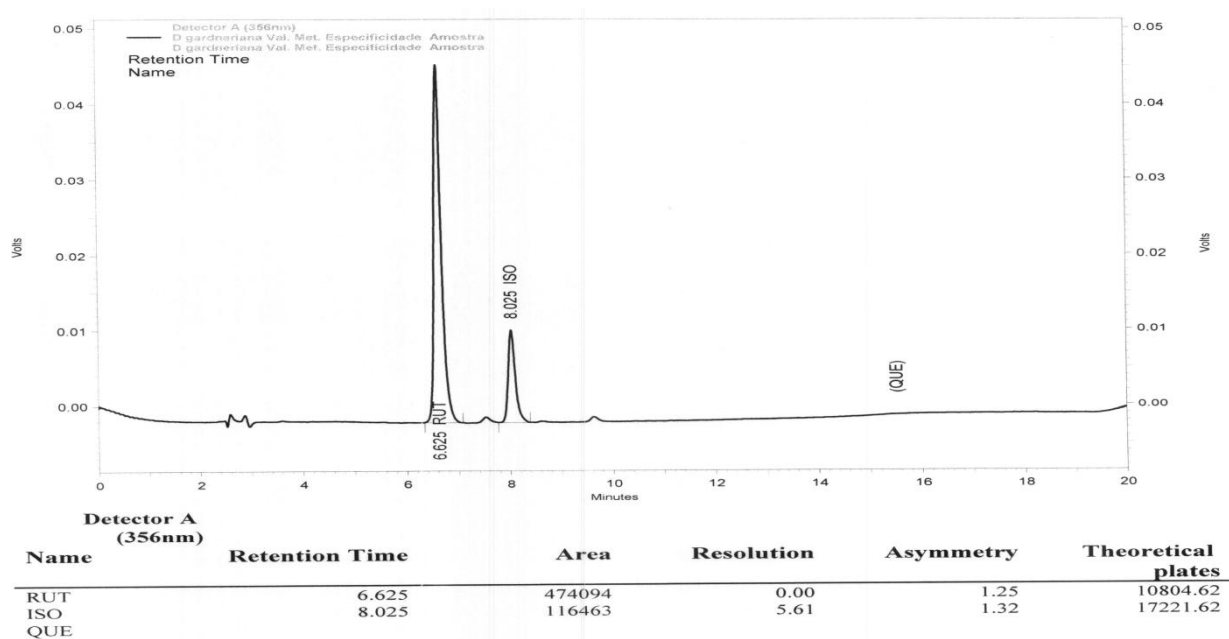


Figura 11 – Cromatograma do ensaio da especificidade com a injeção da amostra



5.1.2 Linearidade

A linearidade do método foi determinada pela construção de curvas de calibração dos padrões de rotina (intervalo de 12,00 a 18,00 µg/mL), isoquercetina (2 a 3 µg/mL) e quercetina (0,16 a 0,24 µg/mL) que correspondem à faixa de 80 a 120% da concentração de trabalho.

Nas Tabelas 2, 3 e 4 (p. 63 e 64) estão apresentados os valores de concentração, suas respectivas áreas e os fatores de resposta para avaliação da linearidade.

Tabela 2 – Resultados obtidos no ensaio da linearidade para o flavonóide rutina e os valores de coeficiente de correlação (r) e desvio padrão relativo (DPR)

%	Concentração (µg/mL)	Area	FR
80	12,00	381430,33	31785,86
90	13,50	423611,67	31378,64
100	15,00	471575,67	31438,38
110	16,50	526485,33	31908,20
120	18,00	578356,67	32019,81
Critério de Aceitação			Resultado
R	> 0,99		0,9990
DPR	< 5,0%		0,8984

Tabela 3- Resultados obtidos no ensaio da linearidade para o flavonóide isoquercetina e os valores de coeficiente de correlação (r) e desvio padrão relativo (DPR)

%	Concentração (µg/mL)	Area	FR
80	2,00	114464,00	57232,00
90	2,25	127987,67	56883,41
100	2,50	141333,67	56533,47
110	2,75	157820,67	57389,33
120	3,00	172865,00	57621,67
Critério de Aceitação			Resultado
r	> 0,99		0,9991
DPR	< 5,0%		0,7508

Tabela 4 – Resultados obtidos no ensaio da linearidade para o flavonóide quercetina e os valores de coeficiente de correlação (r) e desvio padrão relativo (DPR)

%	Concentração (µg/mL)	Area	FR
80	0,16	17824,00	111400,00
90	0,18	20004,00	111133,33
100	0,20	22431,67	112158,33
110	0,22	24704,33	112292,42
120	0,24	26730,67	111377,78
Critério de Aceitação			Resultado
r	> 0,99		0,9996
DPR	< 5,0%		0,4636

O Fator de relação (FR) expressa a relação existente entre os resultados obtidos e a concentração, pela razão entre os mesmos. Em uma curva analítica, os FR devem ser semelhantes entre si e próximos do valor da inclinação da reta. Calcularam-se os FR e o DPR entre eles. Recomenda-se que o DPR seja inferior a 5% (AEFI, 2001).

Nas Figuras 12, 13 e 14 (p. 65 e 66) estão representadas as curvas analíticas de RUT, ISO e QUE por CLAE e a equação da reta, calculados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

Figura 12 – Curva de calibração construída a partir dos resultados do ensaio de linearidade do flavonóide rutina

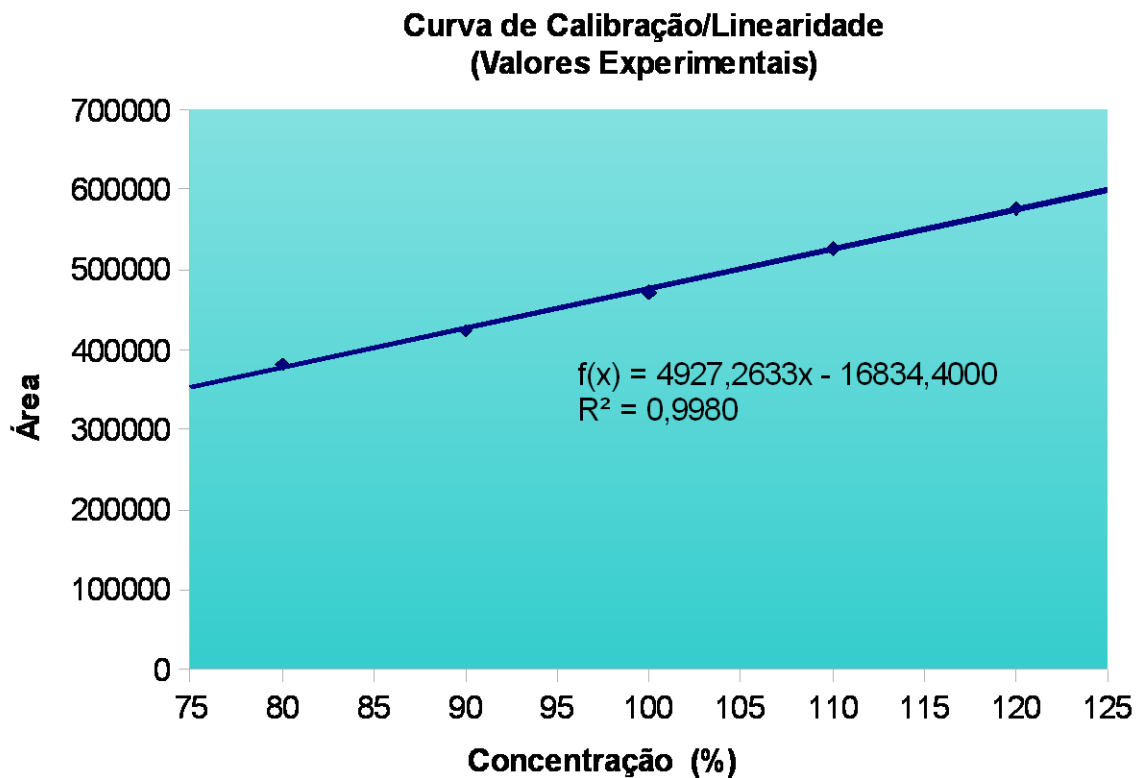


Figura 13 – Curva de calibração construída a partir dos resultados do ensaio de linearidade do flavonóide isoquercetina

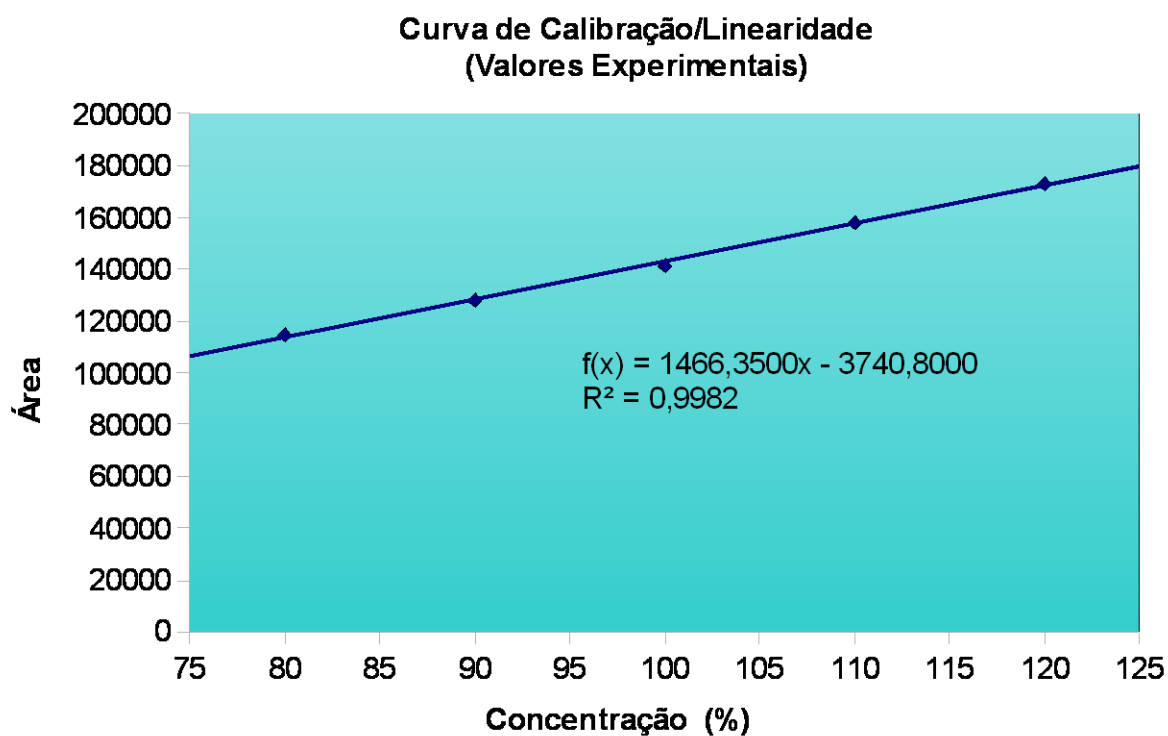
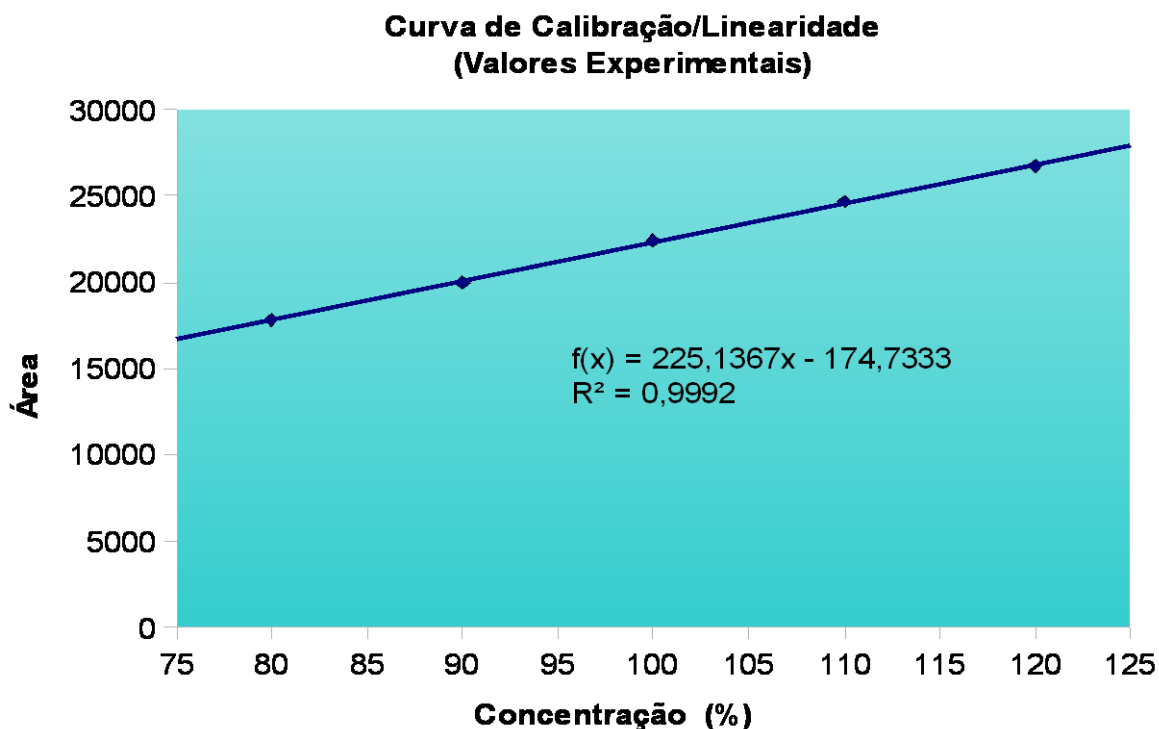


Figura 14 – Curva de calibração construída a partir dos resultados do ensaio de linearidade do flavonóide quercetina



O coeficiente de correlação revelou ser superior a 0,99 para todos os padrões, indicando correlação linear entre suas concentrações e as áreas nas faixas 80 a 120% da concentração de trabalho.

5.1.3 Sensibilidade

O LOD, definido como a menor concentração absoluta do analito em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado sob as condições deste estudo, foi 0,914 µg/mL para rutina, 0,129 µg/mL para isoquercetina e 0,014 µg/mL para quercetina.

O LOQ, definido como a menor concentração de analito que pode ser quantificado e determinado com aceitável precisão e exatidão, resultou 3,045 µg/mL para rutina, 0,429 µg/mL para isoquercetina e 0,048 µg/mL para quercetina.

5.1.4 Recuperação

A exatidão foi estimada pela análise da amostra de concentração conhecida, comparando o valor medido com o valor real e utilizando o método de adição de padrão.

Os resultados de exatidão evidenciaram uma concordância entre os resultados encontrados na análise do extrato metanólico, comprovando que o método é exato. O percentual recuperado pode ser visualizado nas Tabelas 5, 6 e 7 (p. 68-70).

O valor de porcentagem de recuperação para rutina foi de 101,87%, para isoquercetina 100,38% e para quercetina 101,61% e os desvios padrões relativos foram 1,33%, 0,35% e 1,13%, respectivamente. Portanto, os valores médios de recuperação estão entre os 98% e 102% recomendados pela legislação brasileira vigente de validação de métodos e os valores de DPR abaixo de 2,0%.

Apesar dos resultados estarem dentro das especificações recomendadas, os valores de recuperação maiores que 100 % poderiam estar relacionados a erros analíticos ou a efeitos da matriz, valendo ressaltar que foi utilizada a mesma coluna cromatográfica para execução de todos os ensaios.

Tabela 5 - Resultados obtidos no ensaio de exatidão para o flavonóide rutina e os valores médios de recuperação e DPR

Conc. %	Conc. (µg/mL)	Resultado Encontrado(%)	Concentração Recuperada(%)	Concentração Recup. (µg/mL)	Média Recup.(%)	DPR
110%	16,5	110,77	100,70	16,62		
110%	16,5	112,81	102,56	16,92	102,21	1,33
110%	16,5	113,70	103,36	17,05		
120%	18	120,63	100,52	18,09		
120%	18	123,46	102,88	18,52	102,30	1,54
120%	18	124,20	103,50	18,63		
130%	19,5	129,74	99,80	19,46		
130%	19,5	132,24	101,73	19,84	101,09	1,11
130%	19,5	132,28	101,75	19,84		
Médias					101,87	1,33

Tabela 6 - Resultados obtidos no ensaio de exatidão para o flavonóide isoquercetina e os valores médios de recuperação e DPR

Conc. %	Conc. (µg/mL)	Resultado Encontrado (%)	Concentração Recuperada(%)	Concentração Recup. (µg/mL)	Média Recup.(%)	DPR
92%	2,3	92,13	100,14	2,303	100,52	0,35
92%	2,3	92,55	100,59	2,314		
92%	2,3	92,76	100,82	2,319		
102%	2,55	101,89	99,89	2,547	100,07	0,42
102%	2,55	101,77	99,77	2,544		
102%	2,55	102,57	100,56	2,564		
112%	2,8	112,99	100,88	2,825	100,56	0,29
112%	2,8	112,55	100,49	2,814		
112%	2,8	112,34	100,31	2,809		
Médias					100,38	0,35

Tabela 7 - Resultados obtidos no ensaio de exatidão para o flavonóide quercetina e os valores médios de recuperação e DPR

Conc. %	Conc. (µg/mL)	Resultado Encontrado(%)	Concentração Recuperada(%)	Concentração Recup. (µg/mL)	Média Recup.(%)	DPR
110%	0,22	113,43	103,12	0,227	102,08	1,71
110%	0,22	110,06	100,06	0,220		
110%	0,22	113,36	103,05	0,227		
120%	0,24	122,68	102,23	0,245	101,45	0,67
120%	0,24	121,34	101,12	0,243		
120%	0,24	121,20	101,00	0,242		
130%	0,26	130,20	100,15	0,260	101,30	0,99
130%	0,26	132,29	101,76	0,265		
130%	0,26	132,59	101,99	0,265		
Médias					101,61	1,13

5.1.5 Precisão

A precisão do método foi determinada em dois dias consecutivos de análise por analistas diferentes, porém com o mesmo equipamento, obtendo-se os valores de repetibilidade (intra-corrida) e precisão intermediária (inter-corridas). Os valores dos teores de rutina, quercetina e isoquercetina e os valores de DPR para avaliar as precisões estão representados nas Tabelas 8, 9 e 10 (p. 72-74).

Tabela 8 - Resultados obtidos no ensaio de precisão para o flavonóide rutina e os valores DPR (intra-corrida e inter-corrida)

1ª corrida (Analista A)			
Amostra	Concentração (µg/mL)	Area	FR
1	15,00	474089,00	31605,93
2	15,00	478589,00	31905,93
3	15,00	479157,00	31943,80
4	15,00	479004,00	31933,60
5	15,00	483854,00	32256,93
6	15,00	486366,00	32424,40
Repetibilidade 1ª Corrida (Intra-corrida)			
Critério de Aceitação		Resultado Obtido	
DPR 1	< 5,0%	0,902	
2ª corrida (Analista B)			
Amostra	Concentração (µg/mL)	Area	FR
1	15,00	503279,00	33551,93
2	15,00	509878,00	33991,87
3	15,00	516742,00	34449,47
4	15,00	519603,00	34640,20
5	15,00	520065,00	34671,00
6	15,00	511254,00	34083,60
Repetibilidade 2ª Corrida (Intra-corrida)			
Critério de Aceitação		Resultado Obtido	
DPR 2	< 5,0%	1,273	
Precisão Intermediária (Inter-corrida)			
DPR (n=12)			
3,658			

Tabela 9 - Resultados obtidos no ensaio de precisão para o flavonóide isoquercetina e os valores DPR (intra-corrida e inter-corrida)

1ª corrida (Analista A)			
Amostra	Concentração (µg/mL)	Area	FR
1	2,50	142381,00	56952,40
2	2,50	143942,00	57576,80
3	2,50	143052,00	57220,80
4	2,50	144411,00	57764,40
5	2,50	144431,00	57772,40
6	2,50	145629,00	58251,60
Repetibilidade 1ª Corrida (Intra-corrida)			
Critério de Aceitação		Resultado Obtido	
DPR 1	< 5,0%	0,794	
2ª corrida (Analista B)			
Amostra	Concentração (µg/mL)	Area	FR
1	2,50	152720,00	61088,00
2	2,50	149891,00	59956,40
3	2,50	155370,00	62148,00
4	2,50	154935,00	61974,00
5	2,50	153440,00	61376,00
6	2,50	149925,00	59970,00
Repetibilidade 2ª Corrida (Intra-corrida)			
Critério de Aceitação		Resultado Obtido	
DPR 2	< 5,0%	1,557	
Precisão Intermediária (Inter-corrida)			
DPR (n=12)			
3,302			

Tabela 10 - Resultados obtidos no ensaio de precisão para o flavonóide quercetina e os valores DPR (intra-corrida e inter-corrida)

1ª corrida (Analista A)			
Amostra	Concentração (µg/mL)	Area	FR
1	0,20	22898,00	114490,00
2	0,20	22598,00	112990,00
3	0,20	22406,00	112030,00
4	0,20	21745,00	108725,00
5	0,20	22914,00	114570,00
6	0,20	23086,00	115430,00
Repetibilidade 1ª Corrida (Intra-corrida)			
Critério de Aceitação		Resultado Obtido	
DPR 1	< 5,0%	2,160	
2ª corrida (Analista B)			
Amostra	Concentração (µg/mL)	Area	FR
1	0,20	24365,00	121825,00
2	0,20	24675,00	123375,00
3	0,20	24324,00	121620,00
4	0,20	24267,00	121335,00
5	0,20	24187,00	120935,00
6	0,20	24599,00	122995,00
Repetibilidade 2ª Corrida (Intra-corrida)			
Critério de Aceitação		Resultado Obtido	
DPR 2	< 5,0%	0,789	
Precisão Intermediária (Inter-corrida)			
DPR (n=12)			
4,263			

O ensaio de precisão intra-corrida de seis réplicas autênticas na concentração 100% de RUT, ISO e QUE, apresentou como resultado na 1ª corrida os desvios padrão relativos de 0,902, 0,794 e 2,160 para cada um dos compostos respectivamente e DPR de 1,273, 1,557, 0,789 para 2ª corrida, atendendo às exigências normativas (ANVISA, 2003). O aumento do DPR entre a 1ª corrida e 2ª corrida pode ser explicada pelo efeito do analista, ou seja, a forma como a amostra foi injetada, uma vez que eles utilizaram a mesma amostra.

Os valores de desvio padrão relativo para a precisão inter-corrida (n=12) foi de 3,658 para rutina, 3,302 para isoquercetina e 4,263 para quercetina, valores inferiores ao limite estabelecido pela legislação brasileira vigente de validação de método, cujo DPR deve ser menor que 5,0% (ANVISA, 2003).

5.1.6 Robustez

A variação dos parâmetros de pH da fase móvel, a utilização de diferentes fabricantes de coluna cromatográfica e a mudança no comprimento de onda não alteraram, de forma significativa, as concentrações encontradas na amostra do extrato metanólico de *D. gardneriana*. Os resultados do teor de rutina e isoquercetina que demonstram a robustez do método encontrados em cada condição testada estão representados na Tabela 11 (p. 76).

Com relação à utilização de diferentes fabricantes de coluna e pH da fase móvel, nenhuma alteração foi observada na área e tempo de retenção referente aos flavonóides analisados. Embora com a variação do comprimento de onda tenha se observado um discreto aumento na área do pico em relação ao obtido com as condições cromatográficas estabelecidas na validação da metodologia analítica deste estudo, não houve alteração significativa nos valores de teor da amostra.

Tabela 11 – Resultados do ensaio de robustez, com variações do pH da fase móvel, do comprimento de onda de absorção e dos fabricantes de coluna.

Condições Avaliadas	Descrição	Tempo de Retenção (min)	Teor (%)	Média Teor (%)	DPR
pH da fase móvel	3,0*	6,8 (RUT)	100,15 (RUT)	100,195 (RUT)	0,06 (RUT)
		8,2 (ISO)	82,29 (ISO)		
		15,6 (QUE)	0,0 (QUE)		
	3,1	6,8 (RUT)	100,24 (RUT)	82,165 (ISO)	0,215 (ISO)
		8,2 (ISO)	82,04 (ISO)		
		15,5 (QUE)	0,0 (QUE)		
Comprimento de Onda	356 nm	6,8 (RUT)	100,15 (RUT)	100,270 (RUT)	0,17 (RUT)
		8,2 (ISO)	82,29 (ISO)		
		15,6 (QUE)	0,0 (QUE)		
	358 nm	6,7 (RUT)	100,39(RUT)	82,080 (ISO)	0,36 (ISO)
		8,1 (ISO)	81,87 (ISO)		
		15,4 (QUE)	0,0 (QUE)		
Diferentes Fabricantes de coluna	Thermo Scientific	6,8 (RUT)	100,15 (RUT)	99,965 (RUT)	0,26 (RUT)
		8,2 (ISO)	82,29 (ISO)		
		15,6 (QUE)	0,0 (QUE)		
	Phenomenex	6,7 (RUT)	99,78 (RUT)	82,595 (ISO)	0,52 (ISO)
		8,1 (ISO)	82,90 (ISO)		
		15,5 (QUE)	0,0 (QUE)		
Média Geral				100,143 (RUT)	0,16 (RUT)
				82,280 (ISO)	0,34 (ISO)

5.2 Quantificação de flavonóides no extrato metanólico de *D. gardneriana*

Os resultados para quantificação de flavonóides na amostra foram de 15,02 µg/mL de rutina (aproximadamente 100% em relação ao padrão utilizado) e 2,06 µg/mL de isoquercetina (cerca de 82% da solução utilizada como referência). Esses valores representam, respectivamente, 75,1 % e 10,3 % de cada composto contido no extrato bruto metanólico de *D. gardneriana*. A quercetina não foi encontrada em níveis de concentrações possíveis de serem medidos, ou seja, conforme valores obtidos para limite de quantificação. Destacando que este é o primeiro relato de quantificação desses flavonóides em extratos brutos de *D. gardneriana*.

5.3 Determinação da atividade antioxidante

Na análise da atividade antioxidante (AA%) comparou-se os resultados obtidos do extrato metanólico das vagens de *D. gardneriana* com a CE₅₀ do controle positivo de BHT, que foi 40,66±1,75 µg/mL, devido ao fato do BHT ser bastante utilizado como parâmetro para a atividade antioxidante (MENSOR *et al.*, 2001).

Os resultados expressos na Tabela 12 (p. 78) mostram que o extrato metanólico das vagens da espécie apresentou atividade sequestradora de radical livre com CE₅₀ 15,11±1,62 µg/mL, ou seja, atividade antioxidante mais eficiente que a do BHT.

Hsu *et al.* (2012), compararam a atividade antioxidante de treze compostos fenólicos isolados de frutos de *Caesalpinia pulcherrima* (Família Leguminosae), também utilizando como padrão de antioxidante o BHT. Neste estudo, os resultados da atividade antioxidante dos compostos fenólicos isolados foram menores quando comparado ao padrão utilizado e com valores de CE₅₀ próximos ao obtido com o extrato de *D. gardneriana*.

A atividade antioxidante observada para o extrato metanólico de *D. gardneriana* possivelmente está associada à presença de compostos fenólicos, especialmente flavonóides (SAKIHAMA *et al.*, 2002; VAYA *et al.*, 2003). A propriedade antioxidante de compostos fenólicos tem sido documentada em uma série de plantas (BHAKTA e GANJEWALA, 2009).

Tabela 12 – Valores da atividade antioxidante *in vitro* do extrato metanólico das entrecasas dos frutos de *D. gardneriana* utilizando o BHT como controle positivo e a técnica do DPPH.

Concentração (µg/mL)	Atividade Antioxidante (%)	
	EDG	BHT
5	81,38±0,34	3,72±0,10
10	85,19±0,44	12,13±0,15
25	89,71±0,46	33,27±0,24
50	91,58±0,46	64,60±0,35
125	92,12±0,11	85,95±0,42
250	93,71±0,10	90,2±0,42
CE ₅₀	15,11±1,62	40,66±1,75

CE₅₀ – Concentração efetiva para se obter 50% de atividade antioxidante

EDG – Extrato metanólico de *Dimorphandra gardneriana*

BHT – 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol

5.4 Quantificação de rutina em fitoterápicos

Aplicando-se a metodologia definida neste estudo, a análise de fitoterápicos contendo rutina proveniente de dois fabricantes diferentes na mesma concentração foi possível em apenas um dos fabricantes (fabricante B), que apresentou um teor de 99,97% de rutina do valor rotulado, em conformidade ao apresentado no laudo analítico enviado pelo fabricante do medicamento.

Para análise do medicamento, nomeado como Fabricante A, obtivemos um perfil cromatográfico no qual não foi possível a integração com o padrão e a resolução dos picos também não foi adequada. O perfil cromatográfico diferente deve-se, provavelmente, a alguma substância presente no medicamento que em solução, possa estar reagindo com o ativo farmacêutico, no caso a rutina, e, assim, impossibilitando a análise através do método proposto nesta validação.

5.5. Determinação da fotoestabilidade do extrato metanólico de *D. gardneriana*

Os resultados expressos na Tabela 13 (p. 79) demonstram que os teores de RUT e ISO das amostras não exposta, exposta e protegida não apresentaram diferenças significativas, sugerindo assim que a condição luminosidade não submeteu o produto a uma queda de teor.

Através dos cromatogramas, pôde ser observado que os picos referentes aos flavonóides rutina e isoquercetina permaneceram íntegros com a exposição à luz da câmara de fotoestabilidade e que não houve variação significativa no tempo de retenção.

As variações encontradas podem ser inerentes a desvios analíticos, e não a uma possível instabilidade da amostra. Podendo ser concluído que o extrato metanólico de *D. gardneriana* é estável à exposição a luz, em relação aos flavonóides analisados, seja a condição de luminosidade visível ou radiação UV.

Tabela 13 – Resultados do estudo de fotoestabilidade com amostras de *D. gardneriana*, submetidas a diferentes condições de luminosidade.

	Amostras		
	Não Exposta	Protegida	Exposta
Teor Rutina	100,237%	100,043%	100,773%
Teor Isoquercetina	82,681%	82,336%	82,899%
Variação entre a Não Exposta e a Exposta	0,536% (Rutina) e 0,218% (Isoquercetina)		
Variação entre a Não Exposta e a Protegida	0,345% (Rutina) e 0,194% (Isoquercetina)		

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- O método analítico por CLAE para quantificação de rutina, isoquercetina e quercetina em extrato metanólico bruto de entrecasca de *D. gardneriana* foi validado demonstrando especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.
- Todos os resultados obtidos nesta validação estão dentro das especificações preconizadas pelo guia nacional de validação de método analítico (ANVISA, 2003).
- A metodologia de quantificação destes flavonóides, especialmente a rutina, pode ser aplicada a um dos fitoterápicos disponíveis no mercado que contem essa substância.
- A análise do fitoterápico do fabricante B resultou na quantificação de rutina em valores considerados satisfatórios de acordo com as especificações do fabricante do medicamento.
- As amostras utilizadas nos testes de validação do método não sofreram alterações em suas concentrações quando expostas a condições de luminosidade, ou seja, elas não apresentam fotossensibilidade.
- A atividade antioxidante do extrato metanólico de *D. gardneriana* apresentou resultados tão eficientes, ou até melhores, que aqueles observados com o padrão de BHT, cujo uso é consagrado como antioxidante.
- O extrato metanólico bruto de *D. gardneriana* evidenciou como composto majoritário a rutina, representando cerca de 75% do material, e também apresentou significativa concentração de isoquercetina, que representa cerca de 10% do extrato. A quercetina não foi encontrada no extrato por não apresentar concentração capaz de ser quantificada por este método analítico.
- A metodologia pode ser adequada para perceber possíveis desvios de qualidade em fitoterápicos contendo rutina, assim como observado com o fabricante A.
- Este trabalho ressalta a importância do desenvolvimento e validação de métodos de quantificação e de controle de qualidade de extratos vegetais e fitomedicamentos. Além disso, pretende incentivar a realização de mais estudos nessa mesma linha de pesquisa, uma vez que o aproveitamento da

rica biodiversidade brasileira implicará em grandes benefícios para sociedade, seja no extrativismo como fonte de renda, seja no surgimento de fitoterápicos, como novas possibilidades terapêuticas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABIFISA (Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde). **País deixa de gerar U\$\$ 5 bi por ano com fitoterápicos.** 2010. Disponível em: <http://www.abifito.org.br/noticias_ver.asp?news=3594>. Acesso em: 18 maio 2012

AEFI (ASOCIACIÓN ESPANÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA). **Validación de métodos analíticos.** Barcelona, 2001.

ALONSO, J.R. **Tratado de Fitomedicina.** 3. ed. Buenos Aires: Isis, 1039 p., 1998.

ANVISA 2003. **Resolução-RE no 899: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Diário Oficial da União. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=56&data=02/06/2003>> Acesso em: 05 Julho 2011.

ANVISA 2006. **Decreto no 5813: Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências.** Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm>. Acesso em: 10 Novembro 2011.

ANVISA 2010. **Resolução-RDC no 14: Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.** Diário Oficial da União. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=05/04/2010&jornal=1&pagina=85&totalArquivos=160>>. Acesso em: 10 Novembro 2011.

ANVISA 2012a. **Recomendações de Fotoestabilidade.** Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/recomenda/fotoestabilidade.pdf>> Acesso em: 23 fevereiro 2012

ANVISA 2012b. **Lista de Medicamentos Similares Únicos de Mercado**. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/85dc970048a6f845b13cb3e2d0c98834/lista_sum.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 25 fevereiro 2012

ARAÚJO, M. Farmacoterapia nas doenças vasculares periféricas. In: PITTA, G.B.B.; CASTRO, A.A.; BURIHAN, E. **Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado**. Maceió: UNCISAL/ECMAL & LAVA, 2003.

ARNAO, M.B.; CANO, A.; ACOSTA, M. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. **Redox Report**, v.5, p.365-370, 2000.

AUGUSTO, F.; ANDRADE, J. C.; CUSTÓDIO, R. Faixa linear de uma curva de calibração. **Chemkeys**, 2000.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Quimica Nova** 25, 856, 2002.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Editora da Unicamp: Campinas, 2001.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASSO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa, Imprensa Universitária, 1999.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASSO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F. ; LIMA, H.C. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. v.2. Viçosa, Imprensa Universitária, 1991.

BENTSATH, A.; BUZZNTAK, I.S.T.; SZENT-GYORGTI A. Vitamin nature of flavones. **Nature**, 138: 798, 1936

BHAKTA, D.; GANJEWALA, D. Effect of leaf positions on total phenolics, flavonoids and proanthocyanidins content and antioxidant activities in *Lantana camara* (L). **Journal of Scientific Research**, 1, 363-369, 2009.

BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, 181, p.1199-1200, 1958.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. vol. 1, 2010.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. 1ª ed., Zaragoza, Espanha: Ed. Acribia, p. 189-213, 1991.

CARVALHO, J.C.T; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos Fenólicos Simples e Heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G., MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5 ed. Editora UFRGS, Porto Alegre, p. 519-536, 2003.

CHUI, Q.S.H.; ZUCCHINI, R.R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, 24, p. 374-380, 2001.

CODEX Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling. **Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes**. CX/MAS 95/3, 1995.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. (coordenadores). **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7a ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997.

COMALADA, M. *et al.* In vivo quercetrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kB pathway. **European Journal of Immunology**, v., 35, n. 2, p. 584-592, 2005.

CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, vol. II, p. 370-375, 1984.

CUNHA, P.L.R.; VIEIRA, I.G.P.; ARRIAGA, A.M.C.; DE PAULA, R.C.M; FEITOSA, J.P.A. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.880-885, 2009.

DONG, M.W. Regulatory Aspects of HPLC Analysis: HPLC System and Method Validation. In DONG, M.W. (org.) **Modern HPLC for practicing scientists**. John Wiley & Sons, p. 230, 2006.

DORES, R.G.R. **Análise Morfológica e Fitoquímica da Fava D'anta** (*Dimorphandra mollis* Benth.). Viçosa, 374 p. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; FENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 452, 2006.

DUGAS, A.J.; CASTAÑEDA-ACOSTA, J.; BONIN, G.C.; PRICE, K.L.; FISCHER, N.H.; WINSTON, G.W. Evaluation of the Total Peroxyl Radical-Scavenging Capacity of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 327-331, 2000.

FALKENBERG, M. de B.; SANTOS, R.I. dos; SIMÕES, C.M.O. Introdução a análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G., MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, p. 163-179, 2000.

FERREIRA, R.A.; BOTELHO, A.S.; DAVIDE, A.C.; MALAVASI, MM. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de *Dimorphandra mollis* Benth. - faveira (Leguminosae- Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, 24 (3): 303-309, 2001.

FDA (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION) Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Guidance for industry, analytical procedures and methods validation**. Rockville, 2000.

FIGUEIREDO, M.A. A cobertura vegetal do Estado do Ceará (unidades fitoecológicas). In: Governo do Ceará (Org). **Atlas do Ceará**. 01. ed. Fortaleza: Edições IPLANCE, v.01, p. 28 -29, 1997.

FILHO, W.D.; SILVA, E.L.; BOVERIS, A. Flavonóides, antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In YUNES, R.A; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. São Paulo: Universitária, p.317-334, 2001.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, 30(2): 374-381, 2007.

GONÇALVES, A.C. **Estrutura genética em populações naturais de *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae).** Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Lavras, MG, 2007.

GONÇALVES, A.C.; REIS, C.A.F.; VIEIRA, F. de A.; CARVALHO, D de. Estrutura genética espacial em populações naturais de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae) na região Norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 33: 325-332, 2010.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A.E.; JUAREZ, A.O.; PELZER, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoid. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Il Farmaco** 56(9): 683-687, 2001.

GUILLAUME, Y; GUINCHARD, C. Method to study the separation of eight p-hydroxybenzoic esters by gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v.727, p. 93-96, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth Edition**; Oxford University Press; pg 268 – 340, 2007.

HARBORNE, J.B. Phytochemistry of the Leguminosae. In BISBY, F.A. *et al.* **Phytochemical Dictionary of the Leguminosae**, London: Chapman & Hall, 1994.

HEFNAWY, M.M.; SULTAN, M.A.; AL-SHEHRI, M.M. Direct enantiomeric resolution of betaxolol with application to analysis of pharmaceutical products. **Analytical Chemistry Insights**, 1: 13-20, 2006.

HSU, F.L.; HUANG, W.J.; WU, T.H.; LEE, M.H; CHEN, L.C.; LU, H.J.; HOU, W.C.; LIN, M.H. Evaluation of Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacities of Polyphenolics from Pods of *Caesalpinia pulcherrima*. **International Journal of Molecular Sciences** 13(5): 6073-88, 2012.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC-GC International**, 11: 96-105, 1998.

HUBINGER, S.Z.; SALGADO, H.R.N.; MOREIRA, R.R.D. Controles físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19(3):690-696, 2009.

HUBINGER, S.Z. **Estudo farmacognóstico e desenvolvimento de fitocosmético de ação antioxidante dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, 148 f., 2009.

ICH - International Conference on Harmonisation. **Q1AR2 - Stability Testing of New Drugs Substances and Products.** Food and Drug Administration, USA, 2003.

ICH - International Conference on Harmonization; **Q2R1- Validation of Analytical procedure: Text and Methodology**, Food and Drug Administration, USA, 2005.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003

INAL, M.E.; KAHRAMAN, A. The Protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. **Toxicology**, 154: 21-29, 2000.

JENKE, D.R. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. Part II. Guidelines for Primary Validation Parameters. **Instrumentation Science & Technology** 26:1-35, 1998.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 11^a ed. São Paulo. Ed. Nacional, 1993.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** 30(3): 241-248, 2009.

LAZAROWYCH, N.J.; PEKOS, P. Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: Strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products. **Drug Information Journal** 32: 497-512, 1998.

LEE, Y.S.; YANG, H.O.; SHIN, K.H.; CHOI, H.S.; JUNG, S.H.; KIM, Y.M.; OH, D.K.; LINHARDT, R.J.; KIM, Y.S. The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. **European Journal Pharmacology**. 465(1-2):191-198, 2003.

LEWIS, G.P. **Legumes of Bahia**. Kew, Royal Botanic Gardens, 1987.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.A.; LOCK, J.M. **Legumes of the World**. Kew, Royal Botanic Gardens, 2005.

LIMA, H.C. **Leguminosas arbóreas da mata Atlântica - uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do Estado do Rio de Janeiro**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 122p, 2000.

LIMA, H.C. *et al.* Fabaceae. In: FORZZA, R.C *et al.* **Catálogo das Plantas e Fungos do Brasil**, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v.2, p.989-1102, 2010

LUCCI, N.; MAZZAFERA, P. Rutin synthase in fava d'anta: Purification and influence of stressors. **Canadian Journal of Plant Science** 89(5): 895-902, 2009.

MABBERLEY, D.J. **The plant book**. 2 ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1997

MARKHAM, K.R. **Techniques of Flavonoid Identification**. London: Academic Press Inc.,1982.

MARTINS, E.R.; CASTRO D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 220 p, 1994.

MARTIUS, C.F.P.; EICHLER, A.G.; URBAN, I. (Ed.). **Flora brasiliensis**. *Dimorphandra gardneriana* Tulasne. Vol 15 Part 2 pag. 252, 1870.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

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

MONTANO, H.G.; SILVA, G.S.; ROCHA, R.C.; JIMENEZ, N.Z.A; PEREIRA, R.C.; BRIOSO, P.S.T. Phytoplasma in “fava d'anta” tree (*Dimorphandra gardneriana*) in Brazil. **Bulletin of Insectology** 60 (2): 147-148, 2007.

MORAIS, R.G.G. de; MACEDO, M. Os banhos medicinais entre os índios Paresi, Sapezal, Mato Grosso. In: **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Florianópolis. UFSC. p.63, 1996.

MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V.S. Atividades biológicas dos flavonóides naturais. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Univali, p. 183-207, 2007.

NUNE, X.P.; MESQUITA, R.F.; SILVA, D.A.; LIRA, D.P.; COSTA, V.C.O.; SILVA, M.V. B.; XAVIER, A.L.; DINIZ, M.F.F.M.; AGRA, M.F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18:718-723, 2008.

OMS (Organização Mundial da Saúde) 1978. **“Declaração de Alma-Ata”**. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/promocao/uploadarq/Alma-Ata.pdf>> Acesso em: 25 fevereiro 2012

POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. (eds.). **Advances in Legume Systematics**. Kew, Royal Botanic Gardens, 1981.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.F.S.; MELO, L.F.C. **Química Nova**, 27, 771, 2004.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J., PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v.2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. **Botânica Econômica Brasileira**. 2 ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995.

RODRIGUES, H.G.; DINIZ, Y.S.; FAINNE, L.A.; ALMEIDA, J.A.; FERNANDES, A.A.H.; NOVELL, E.L.B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição** 16 (3): 315-320, 2003.

ROGERIO, A.P.; ANDRADE, E.L.; LEITE, D.F.P.; FIGUEIREDO, C.P.; CALIXTO, J.B. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene α -humulene in experimental airways allergic inflammatory model. **British Journal Pharmacology**, 158(4):1074-1087, 2009.

SAKIHAMA, Y.; COHEN, M.; GRACE, S.; YMASAKI, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, 177:67-80, 2002.

SANTOS, N.K.A.; ANGÉLICO, E.C.; RODRIGUES, F.F.G.; CALDAS, G.F.; MOTA, M.L.; SILVA, M.R.; PEREIRA, C.K.B.; SOUSA, E.O.; FONSECA, A.M.; LEMOS, T.L.G.; COSTA, J.G.M. Avaliação dos constituintes químicos e atividades antioxidante e toxicidade de *Dimorphandra gardneriana* (Leguminosae). **Cadernos de Cultura e Ciência**, Universidade Regional do Cariri, vol. 1, nº1, 2006.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, 987: 57-66, 2003.

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

SHINDE, V.M.; DHALWAL, K.; POTDAR, M.; MAHADIK, K.R. Application of quality control principles to herbal drugs. **International Journal of Phytomedicine** 1: 4-8, 2009.

SILVA, B.A.; MALVA, O.; DIAS, A.C. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts and isolated phenolic compounds are effective antioxidants in several in vitro models of oxidative stress. **Food Chemistry** 110:611-619, 2008.

SILVA, S.R. **Ecologia de População e Aspectos Etnobotânicos de *Dimorphandra gardneriana* Tullasne (Leguminosae-Mimosaceae) na Chapada do Araripe**. Tese de Doutorado. Ceará-CE. Departamento de Ecologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, 2007.

SILVA, M.F. da. *Dimorphandra* (Caeasalpiniaceae). **Flora Neotropica**, New York: The New York Botanical Garden. p. 1–128, 1986.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO de MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; ROS PETROVICK, P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2000.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SONAGLIO, D.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Padronização de extratos vegetais: extrato hidroalcoólico de *Achyrocline satureoides* (LAM.) DC., compositae (Marcela): comparação entre cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em papel/ultravioleta. **Caderno de Farmácia** 2(1):55-74, 1986.

SOUSA, M.P.; MATOS, M.E.O.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1991.

SUDRÉ, C.P.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L.S.A.; MARTINS, E.R.; PEREIRA, M.G.; SANTOS, M.H. dos. Genetic divergence among *Dimorphandra* spp. accessions using RAPD markers. **Ciência Rural**, Santa Maria, Online ISSN 0103-8478, 2011.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology** 2(3): 12-20, 1998.

TOMASSINI, E; MORS, W.B. *Dimorphandra mollis* Benth. e *Dimorphandra gardneriana* Tul., novas e excepcionais fontes de rutina. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.38, p.321-323, dez, 1966.

USP (United States Pharmacopeia Convention); 34 ed., **Validation of Compendial Methods** <1225>, Rockville, 2011.

VAYA, J.; MAHMOOD, S.; GOLDBLUM, A.; AVIRAM, M.; VOLKOVA, N.; SALAN, A.; MUSA, M.; TAMIR, S. Inhibition of LDL oxidation by flavonoids in relation to their structure and calculated enthalpy. **Phytochemistry**, v. 62, p. 89-99, 2003.

VESSMAN, J.; STEFAN, R.I.; STADEN, J.F.V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, T.; FAJGELJ, A.; MULLER, H. Selectivity in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry** 73: 1381-1386, 2001.

VIEIRA, I.G.P. **Estudo químico de *Dimorphandra* ssp (Leguminosae) e preparação de complexos flavonóides com fosfolipídios**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

VILEGAS, J.H.Y. Técnicas modernas de extração e de análise cromatográfica aplicada ao controle de qualidade de plantas medicinais brasileiras. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, III, 1997, Campinas. **Resumos**. Campinas: 272 p, p. 20-22, 1997.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO de MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; ROS PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. Universidade UFSC, p.577-611, 2007.

ANEXOS

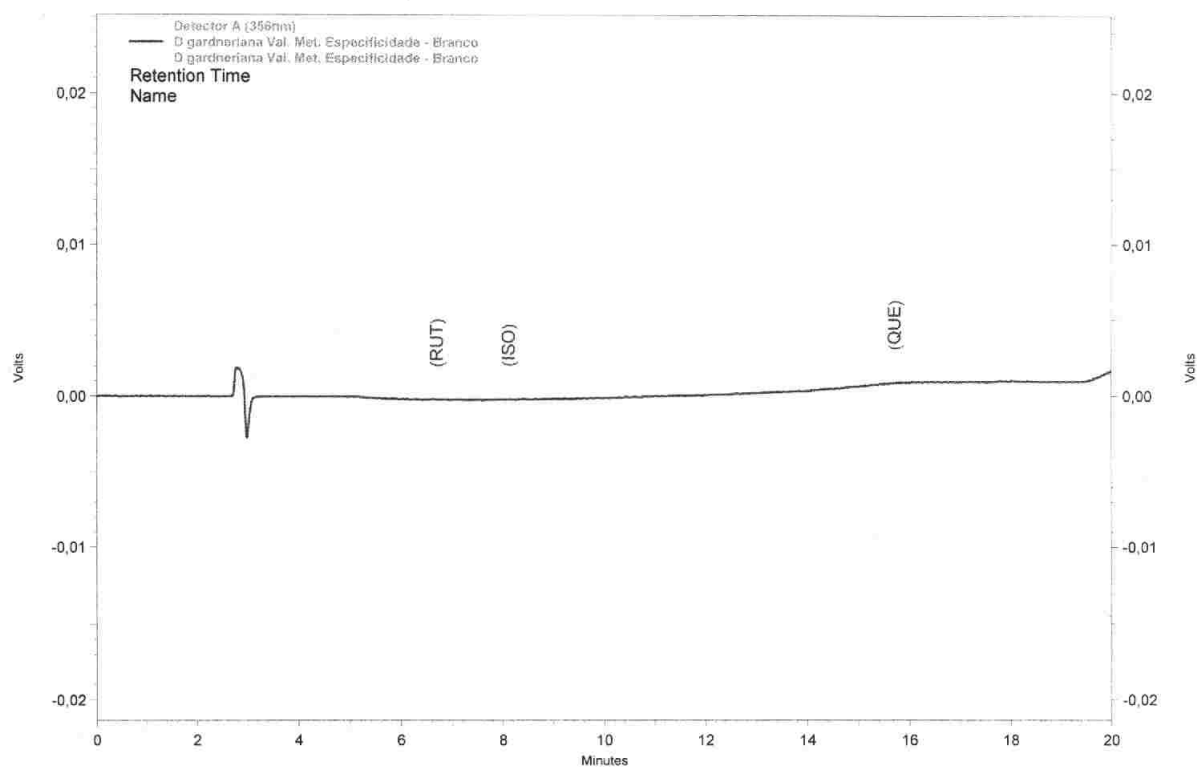
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Especificidade - Branco

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 14/4/2012 05:01:10

Data de Impressão: 16/4/2012 10:09:39



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area
RUT		
ISO		
QUE		

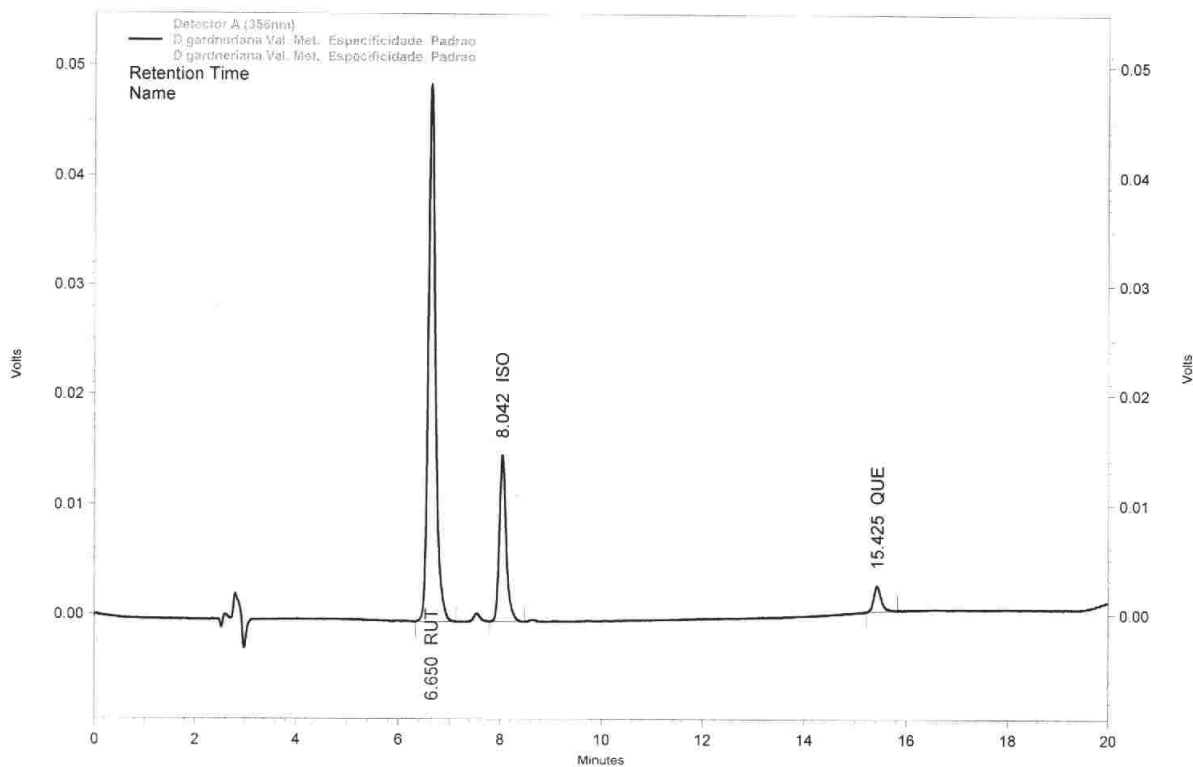
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Especificidade Padrao

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 14/4/2012 05:24:23

Data de Impressão: 16/4/2012 10:14:11



Detector A
(356nm)

Name	Retention Time	Area	Resolution	Asymmetry	Theoretical plates
RUT	6.650	471747	0.00	1.25	11730.78
ISO	8.042	141238	5.76	1.33	18352.49
QUE	15.425	23895	29.33	1.22	53827.62

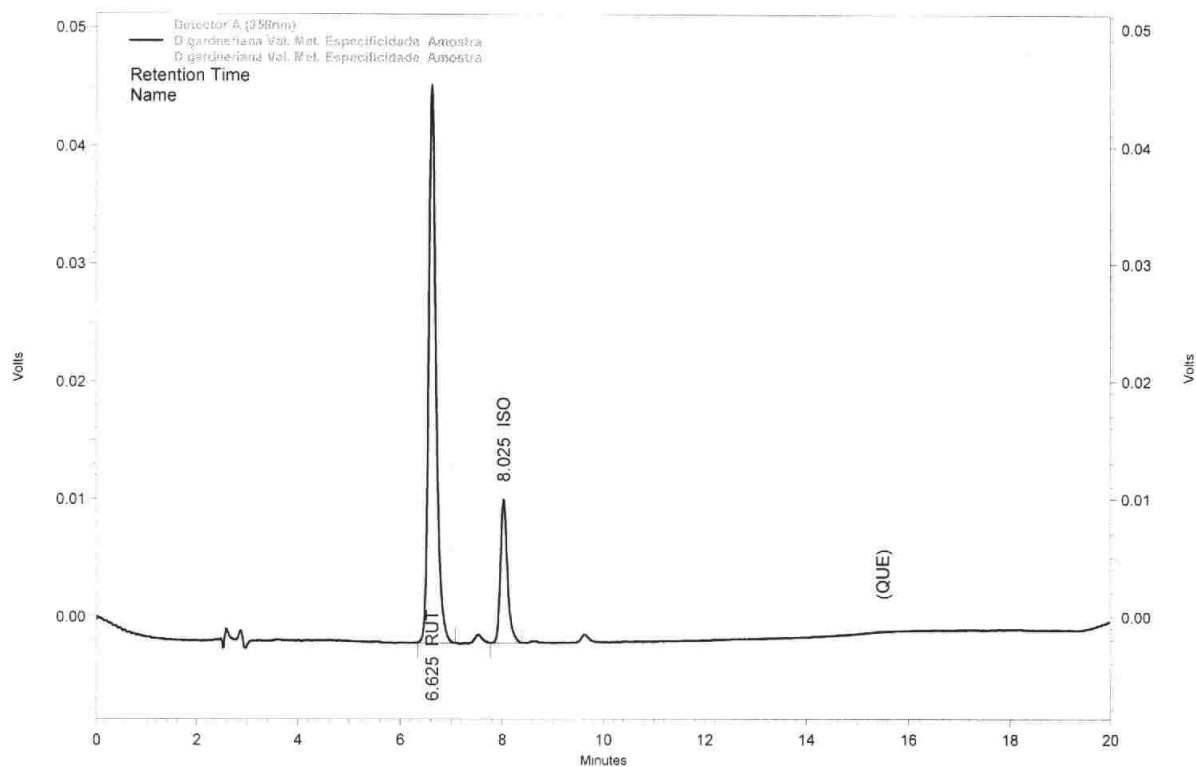
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Especificidade Amostra

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 14/4/2012 05:44:56

Data de Impressão: 16/4/2012 10:15:44



Detector A
(356nm)

Name	Retention Time	Area	Resolution	Asymmetry	Theoretical plates
RUT	6.625	474094	0.00	1.25	10804.62
ISO	8.025	116463	5.61	1.32	17221.62
QUE					

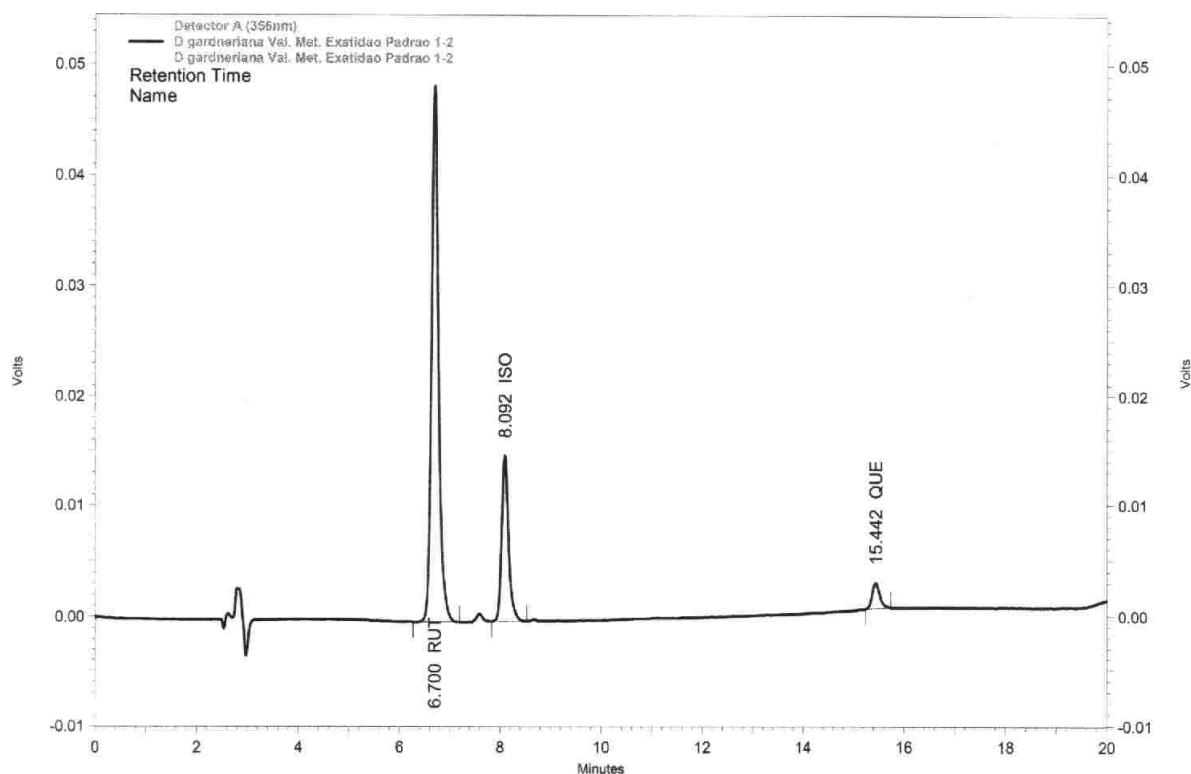
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Exatidao Padrao 1-2

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 08:50:32

Data de Impressão: 16/4/2012 18:26:40



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.700	471683	100.000 CAL
ISO	8.092	141436	100.000 CAL
QUE	15.442	23776	100.000 CAL

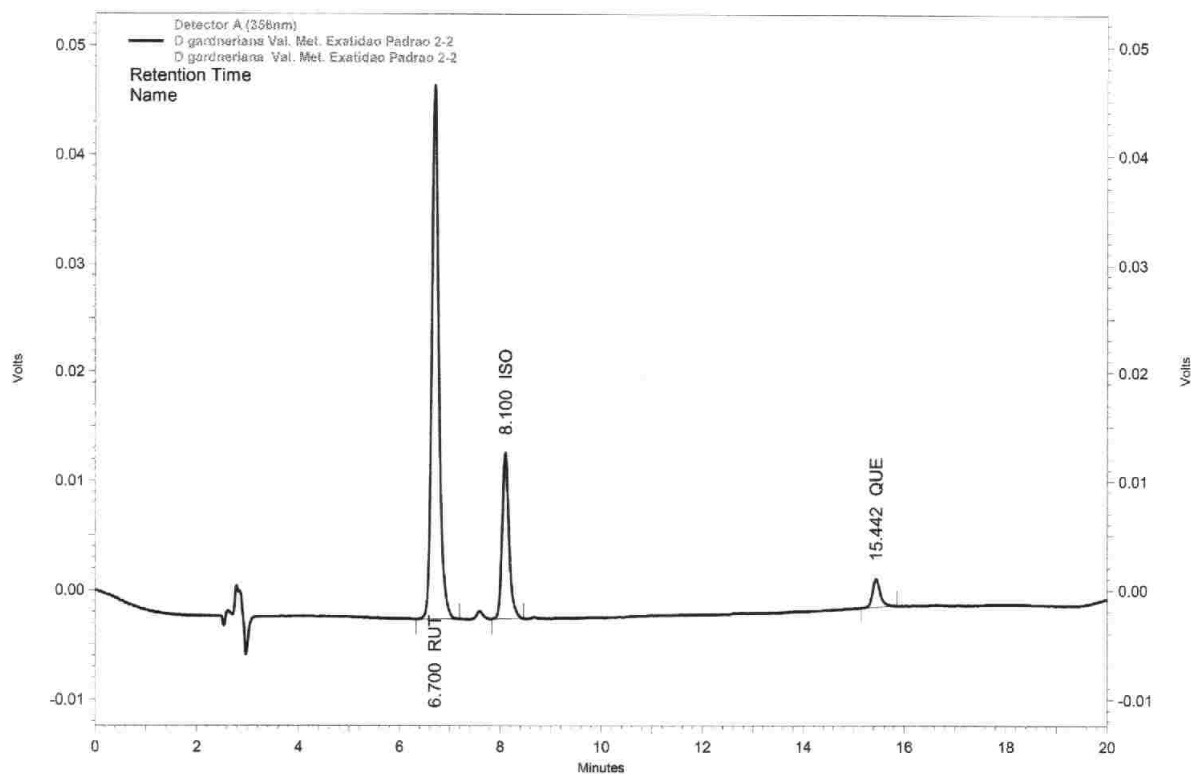
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Exatidao Padrao 2-2

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 09:12:15

Data de Impressão: 16/4/2012 18:29:50



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.700	476720	100.000 CAL
ISO	8.100	143476	100.000 CAL
QUE	15.442	23845	100.000 CAL

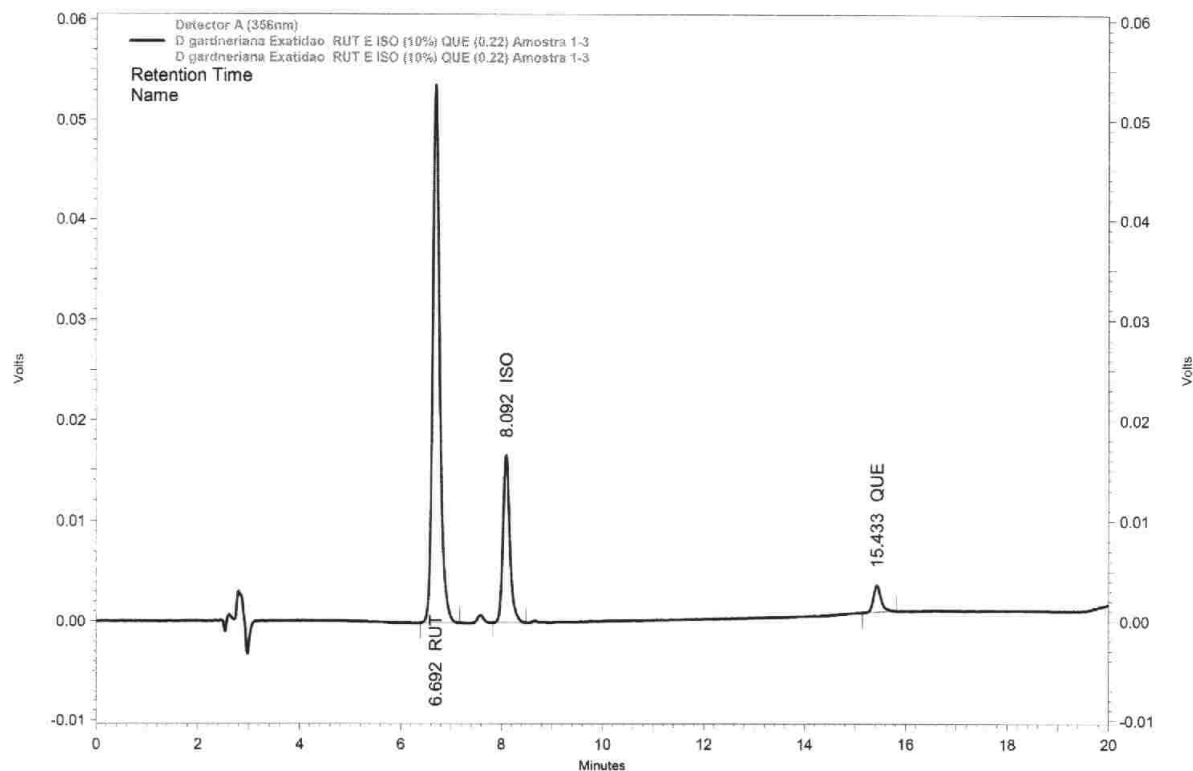
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Exatidao RUT E ISO (10%) QUE (0.22) Amostra 1-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 09:37:49

Data de Impressão: 16/4/2012 18:32:05



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.692	525280	110.771
ISO	8.092	131238	92.125
QUE	15.433	27008	113.429

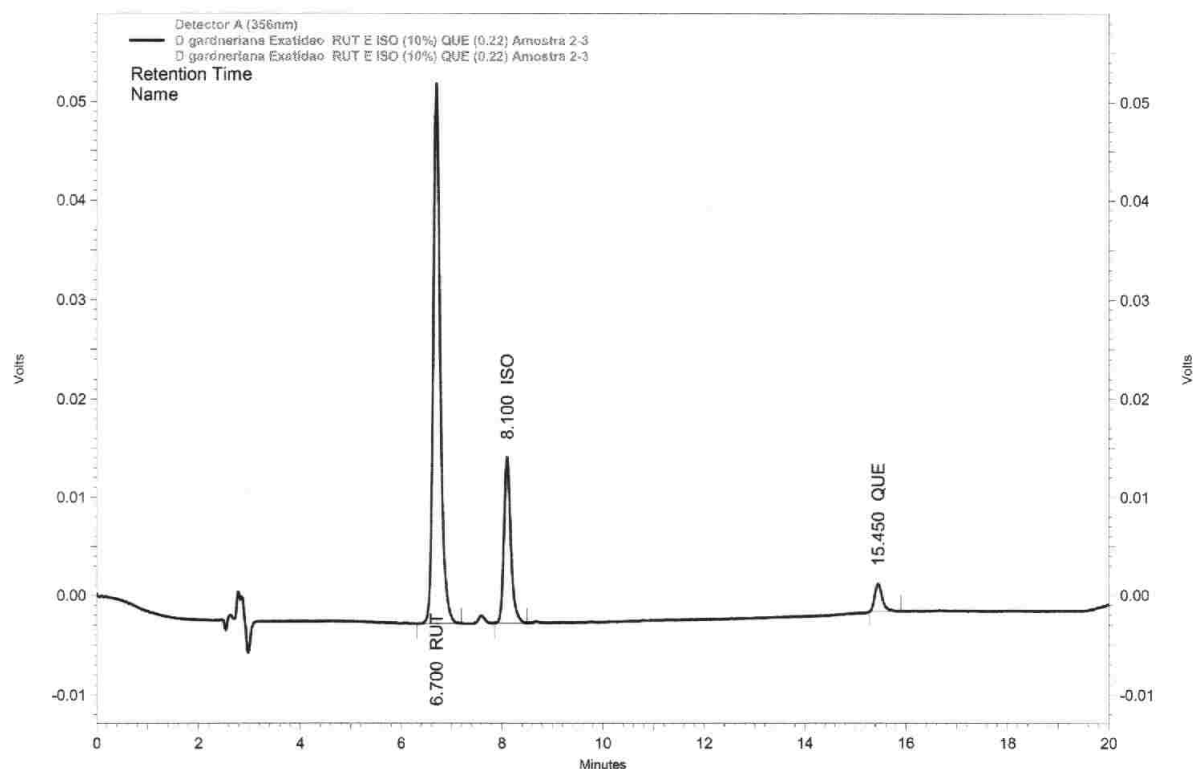
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Exatidão RUT E ISO (10%) QUE (0.22) Amostra 2-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 09:59:17

Data de Impressão: 16/4/2012 18:33:49



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.700	534961	112.813
ISO	8.100	131837	92.546
QUE	15.450	26206	110.061

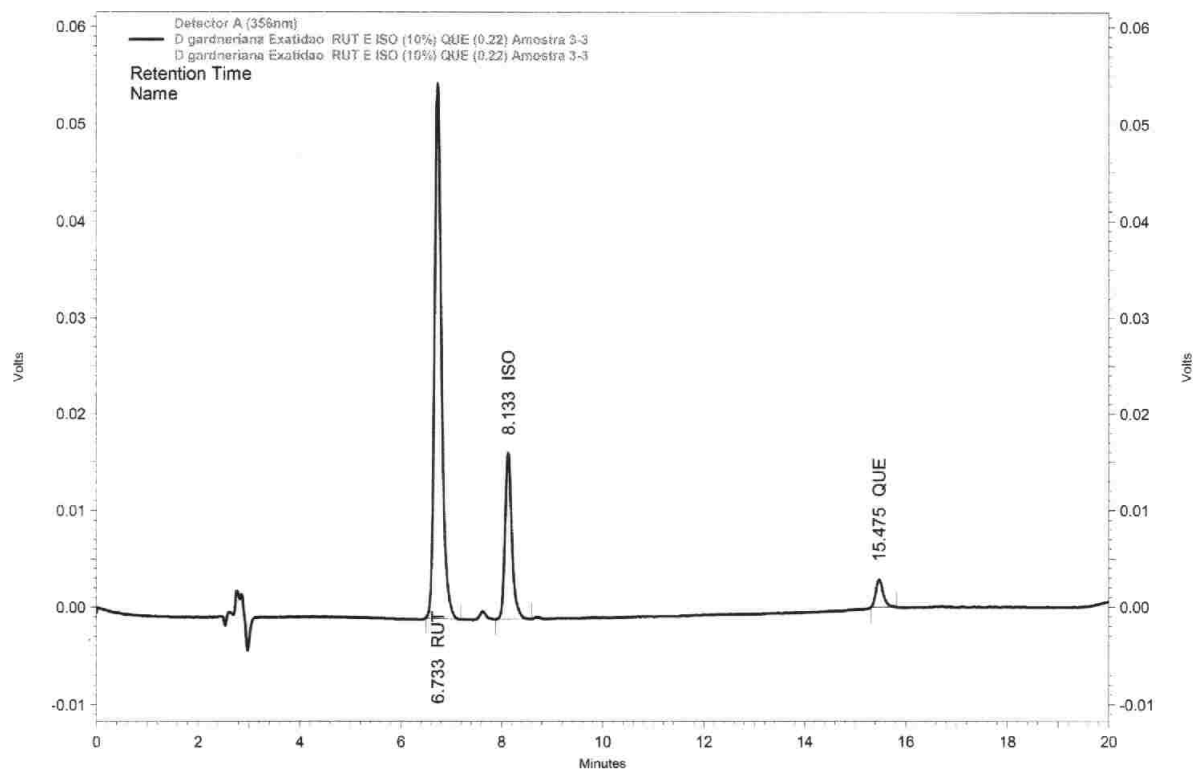
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Exatidão RUT E ISO (10%) QUE (0.22) Amostra 3-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 10:20:06

Data de Impressão: 16/4/2012 18:34:53



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.733	539153	113.697
ISO	8.133	132139	92.758
QUE	15.475	26991	113.358

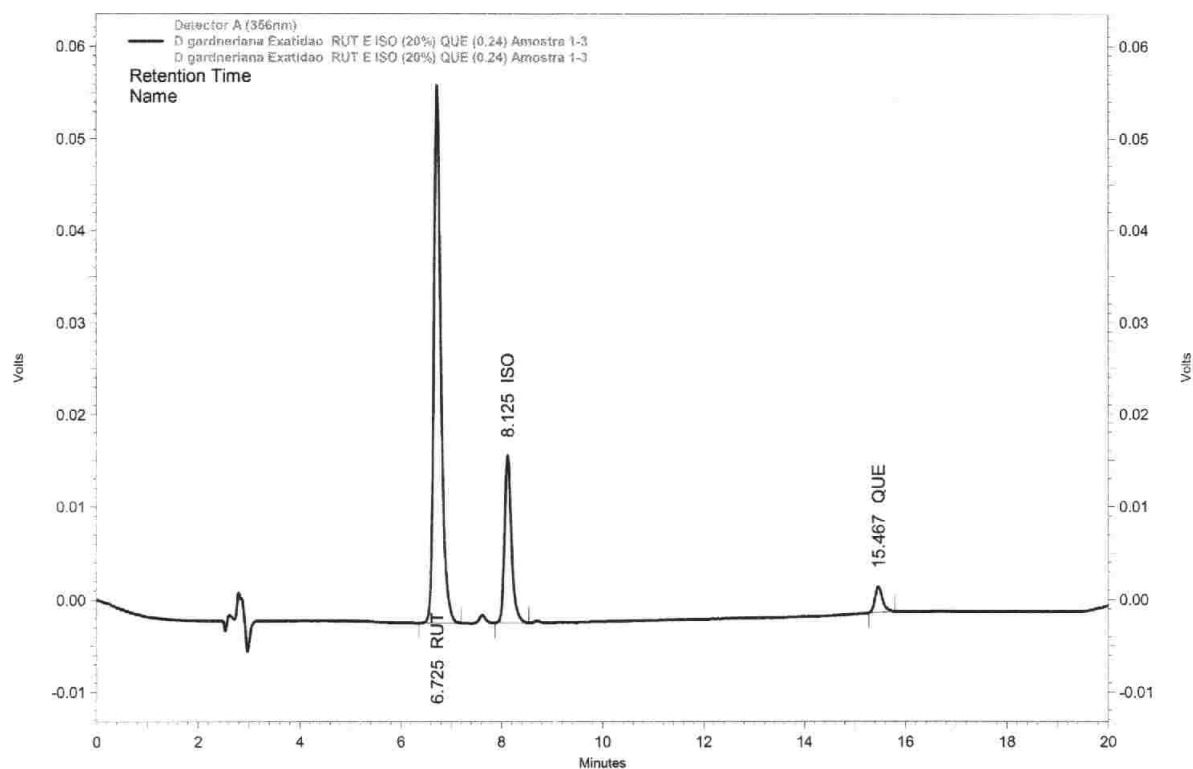
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Exatidao RUT E ISO (20%) QUE (0.24) Amostra 1-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 10:41:54

Data de Impressão: 16/4/2012 18:35:19



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.725	572006	120.625
ISO	8.125	145148	101.890
QUE	15.467	29211	122.681

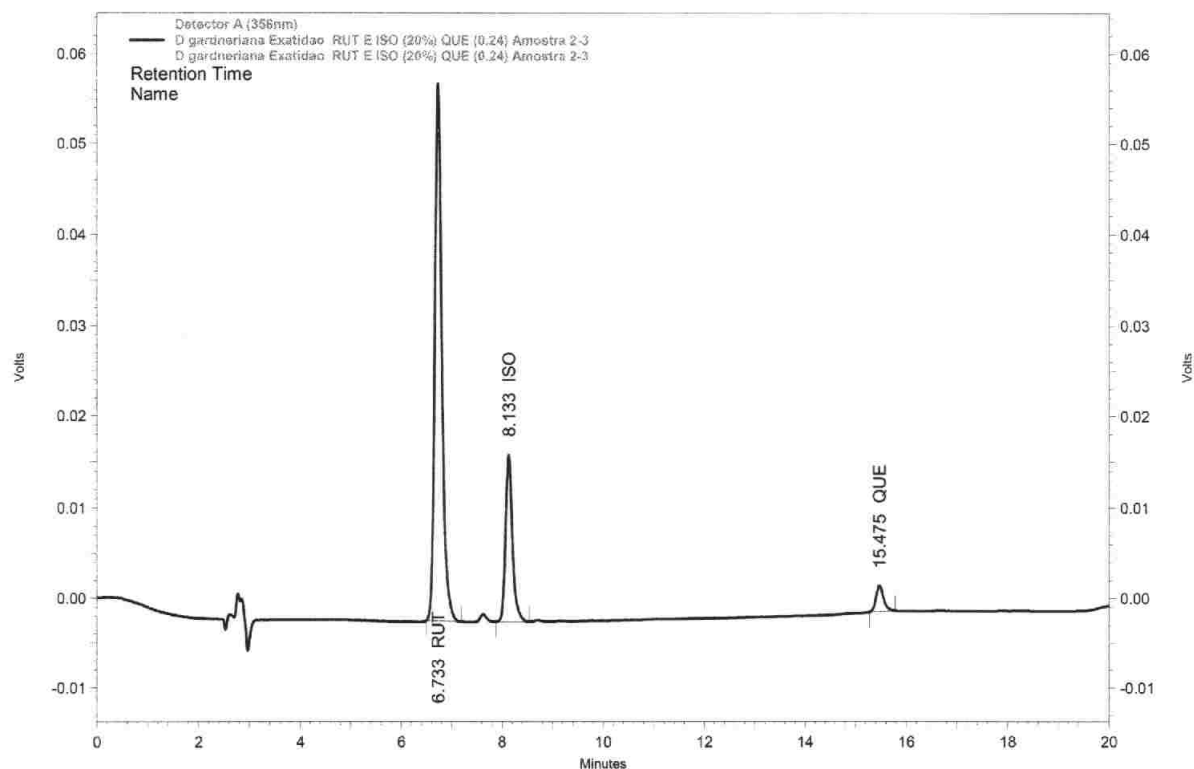
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Exatidao RUT E ISO (20%) QUE (0.24) Amostra 2-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 11:03:00

Data de Impressão: 16/4/2012 18:35:54



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.733	585428	123.456
ISO	8.133	144970	101.765
QUE	15.475	28892	121.341

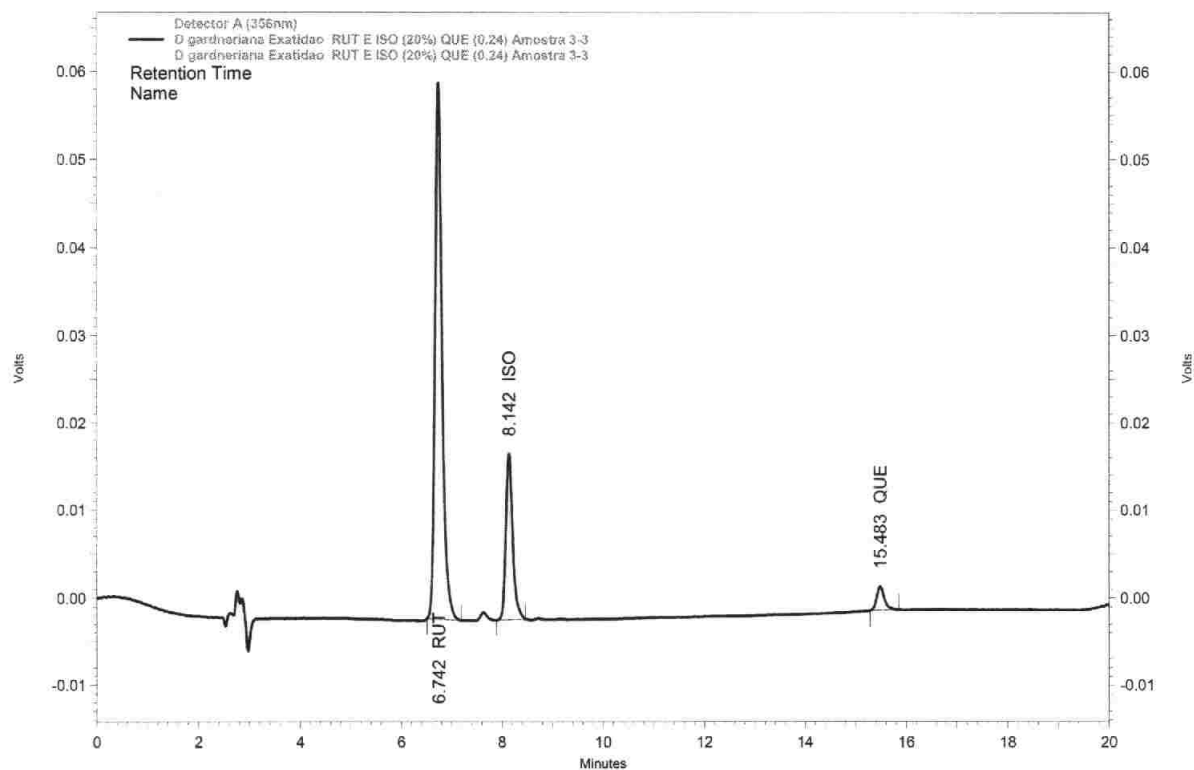
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Exatidão RUT E ISO (20%) QUE (0.24) Amostra 3-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 11:23:42

Data de Impressão: 16/4/2012 18:38:34



Detector A (356nm)				
Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	
RUT	6.742	588955	124.199	
ISO	8.142	146113	102.567	
QUE	15.483	28858	121.199	

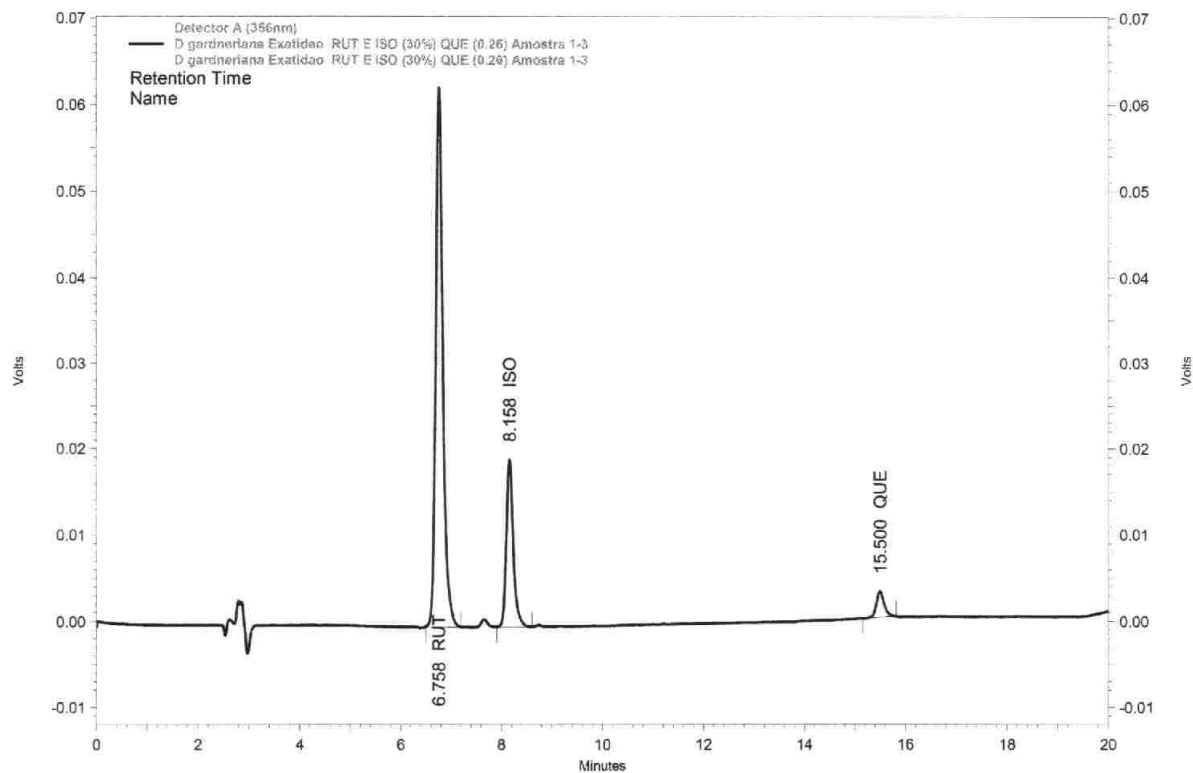
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Exatidao RUT E ISO (30%) QUE (0.26) Amostra 1-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 11:44:44

Data de Impressão: 16/4/2012 18:39:04



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.758	615203	129.735
ISO	8.158	160957	112.987
QUE	15.500	31000	130.195

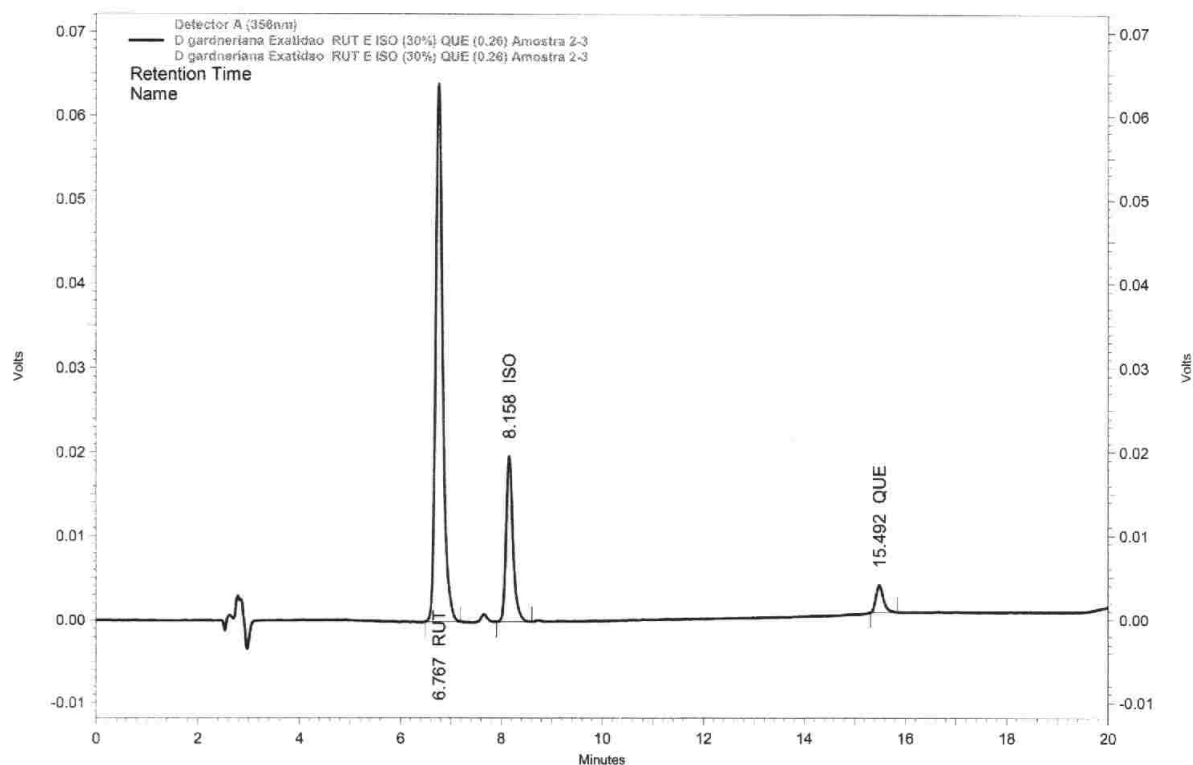
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Exatidão RUT E ISO (30%) QUE (0.26) Amostra 2-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 12:06:28

Data de Impressão: 16/4/2012 18:40:11



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.767	627097	132.243
ISO	8.158	160327	112.545
QUE	15.492	31499	132.290

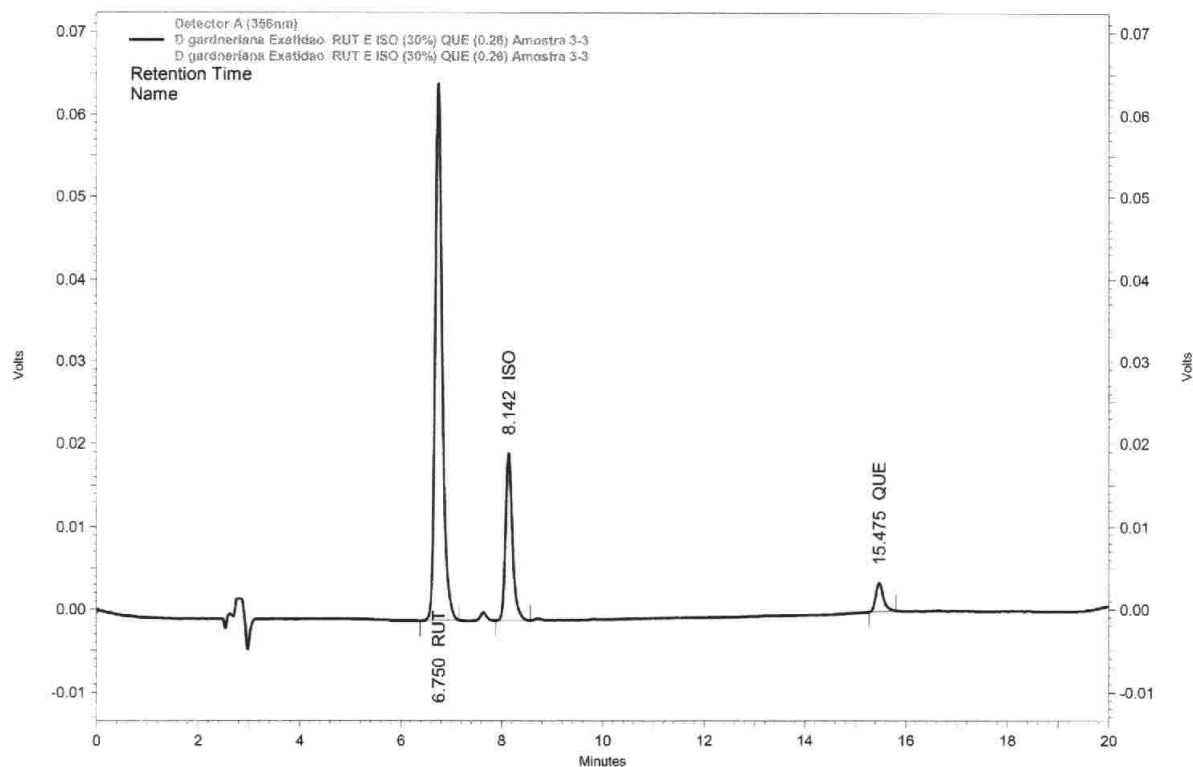
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Exatidão RUT E ISO (30%) QUE (0.26) Amostra 3-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 12:29:29

Data de Impressão: 16/4/2012 18:43:24



Detector A (356nm)				
Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	
RUT	6.750	627259	132.277	
ISO	8.142	160039	112.343	
QUE	15.475	31570	132.589	

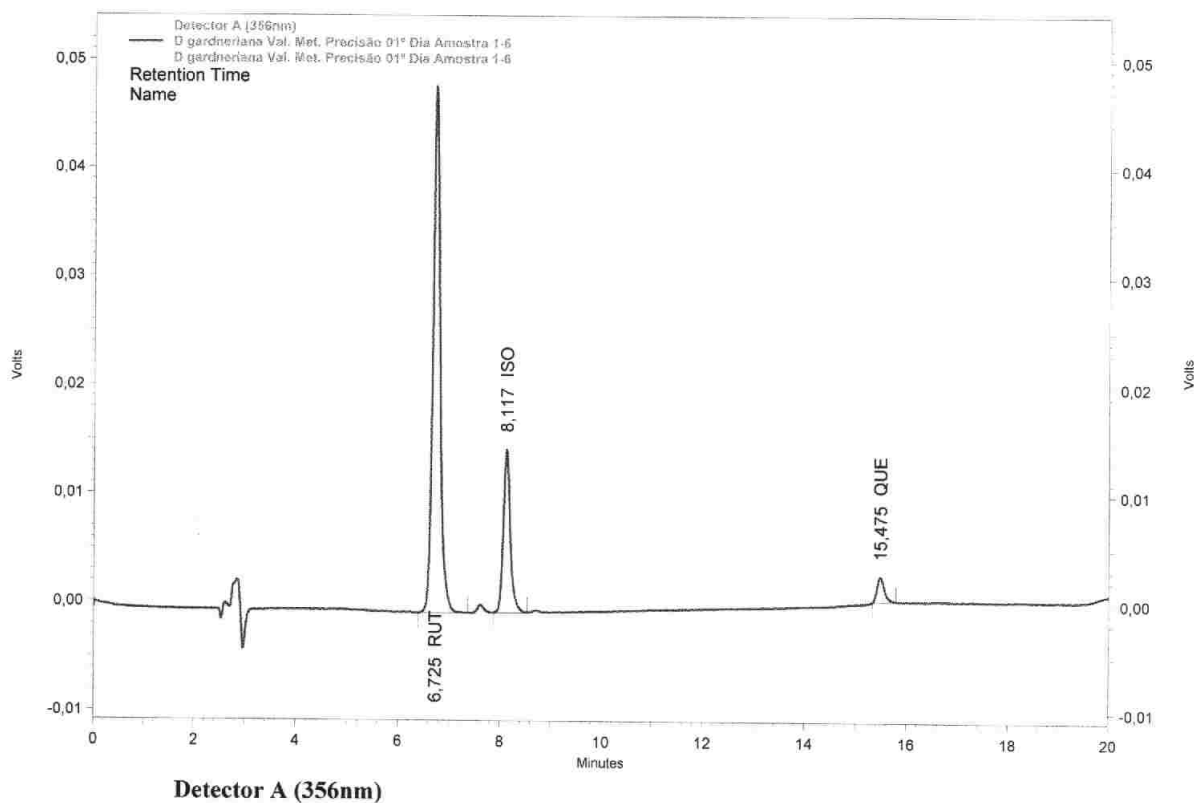
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Precisão 01º Dia Amostra 1-6

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 12:51:32

Data de Impressão: 16/4/2012 20:41:15



Name	Retention Time	Area
RUT	6,725	474089
ISO	8,117	142381
QUE	15,475	22898

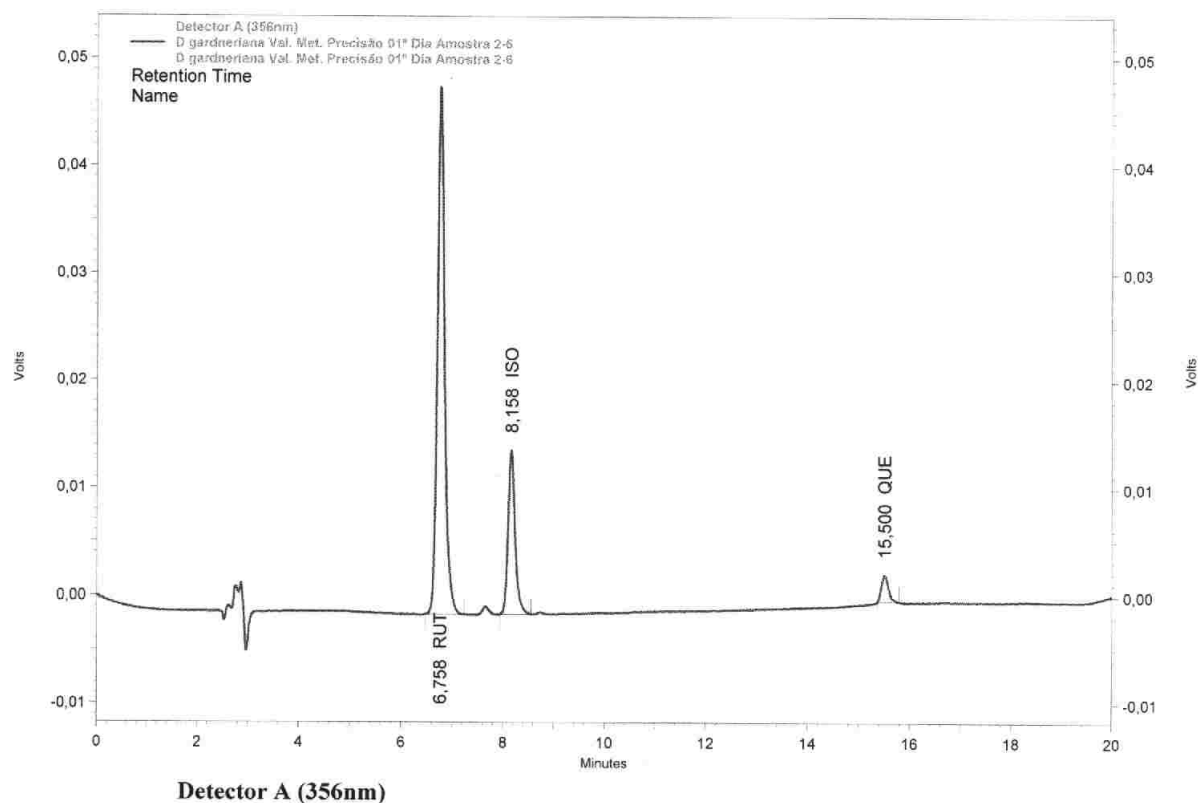
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Precisão 01º Dia Amostra 2-6

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 13:13:16

Data de Impressão: 16/4/2012 20:43:12



Name	Retention Time	Area
RUT	6,758	478589
ISO	8,158	143942
QUE	15,500	22598

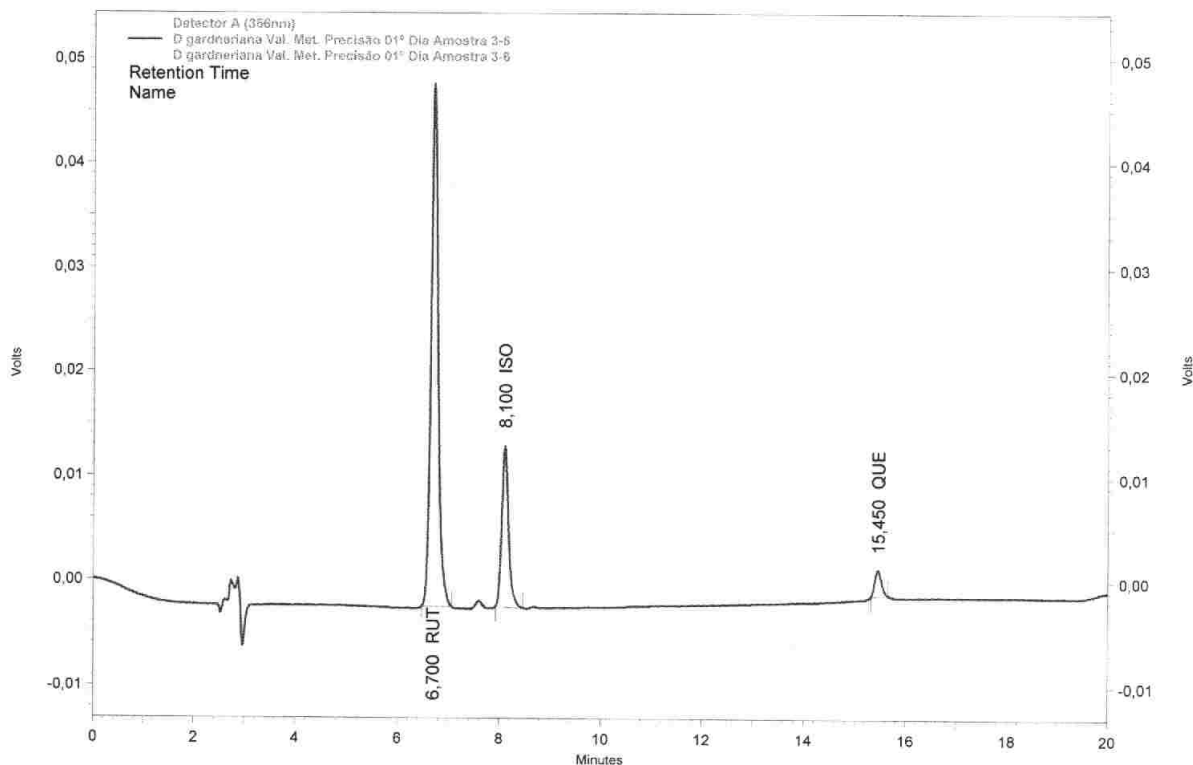
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Precisão 01º Dia Amostra 3-6

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 13:34:47

Data de Impressão: 16/4/2012 20:46:17



Detector A (356nm)		
Name	Retention Time	Area
RUT	6,700	479157
ISO	8,100	143052
QUE	15,450	22406

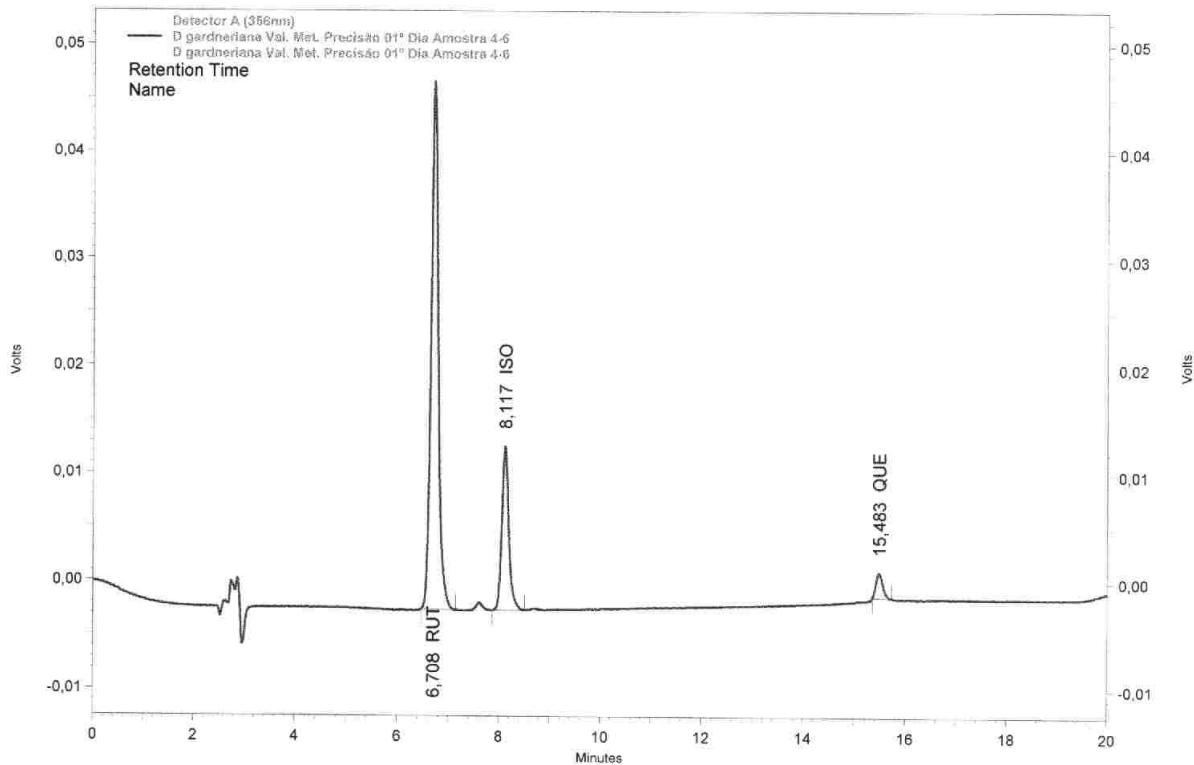
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Precisão 01º Dia Amostra 4-6

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 13:55:45

Data de Impressão: 16/4/2012 20:47:34



Detector A (356nm)		
Name	Retention Time	Area
RUT	6,708	479004
ISO	8,117	144411
QUE	15,483	21745

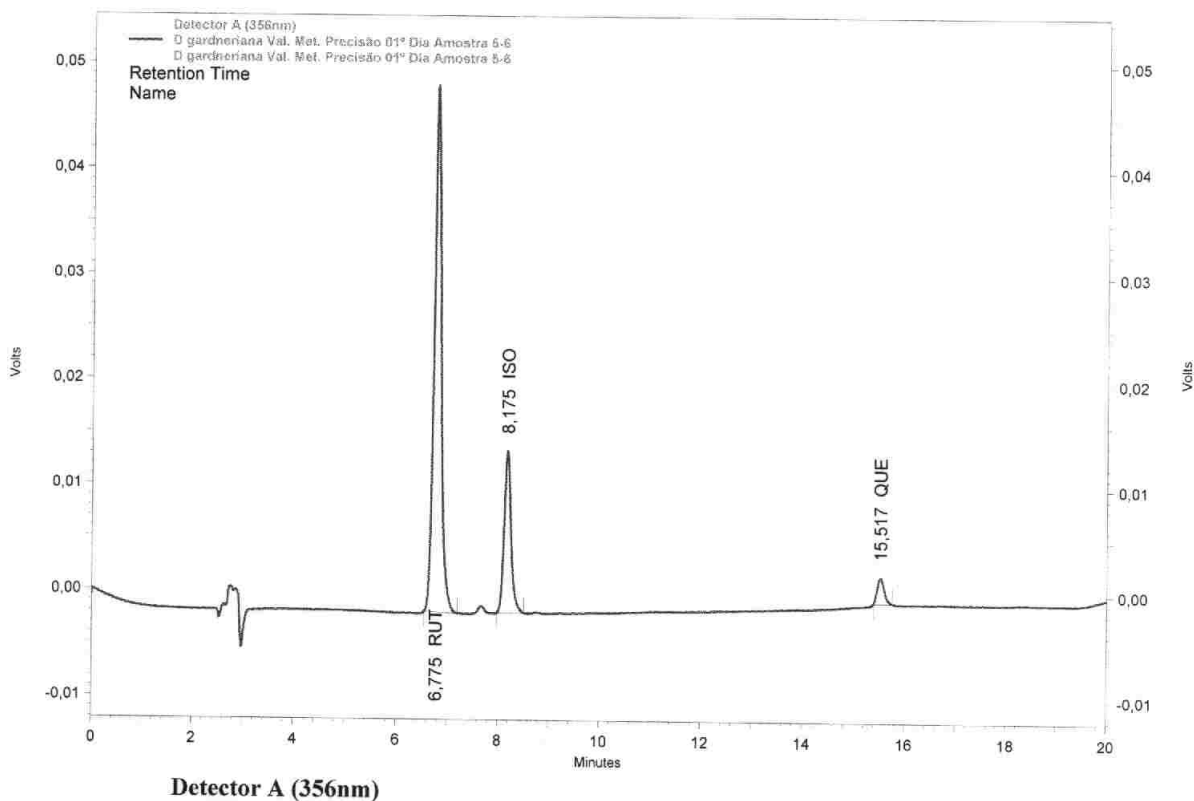
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Precisão 01º Dia Amostra 5-6

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 14:16:47

Data de Impressão: 16/4/2012 20:48:58



Name	Retention Time	Area
RUT	6,775	483854
ISO	8,175	144431
QUE	15,517	22914

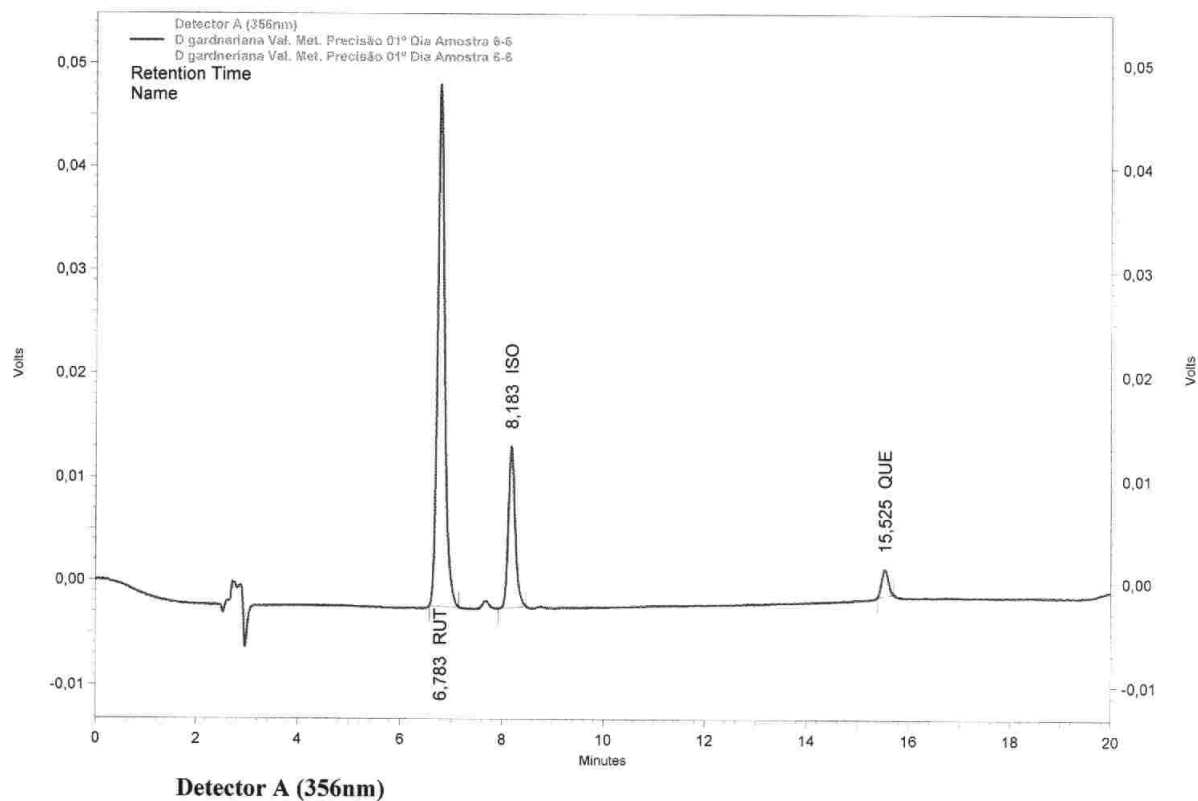
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Precisão 01º Dia Amostra 6-6

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 15/4/2012 14:38:14

Data de Impressão: 16/4/2012 20:52:12



Name	Retention Time	Area
RUT	6,783	486366
ISO	8,183	145629
QUE	15,525	23086

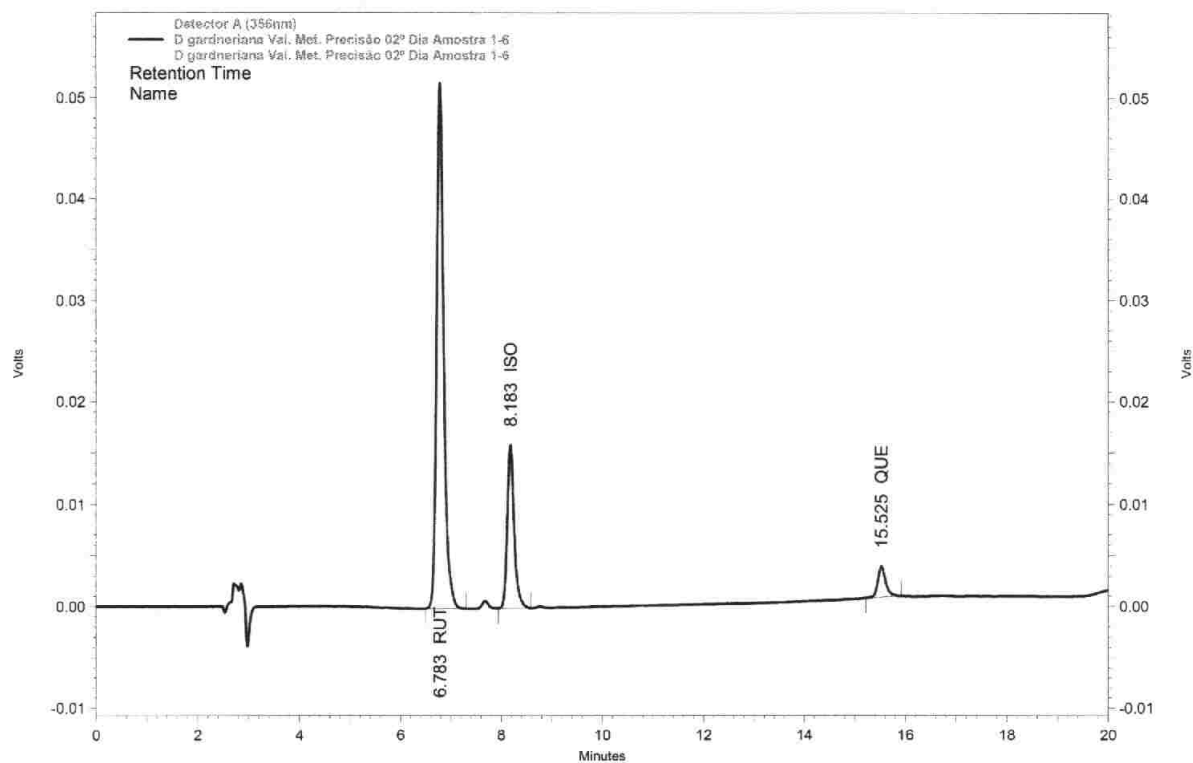
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Precisão 02º Dia Amostra 1-6

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 16/4/2012 15:04:23

Data de Impressão: 16/4/2012 20:53:30



Detector A (356nm)		
Name	Retention Time	Area
RUT	6.783	503279
ISO	8.183	152720
QUE	15.525	24365

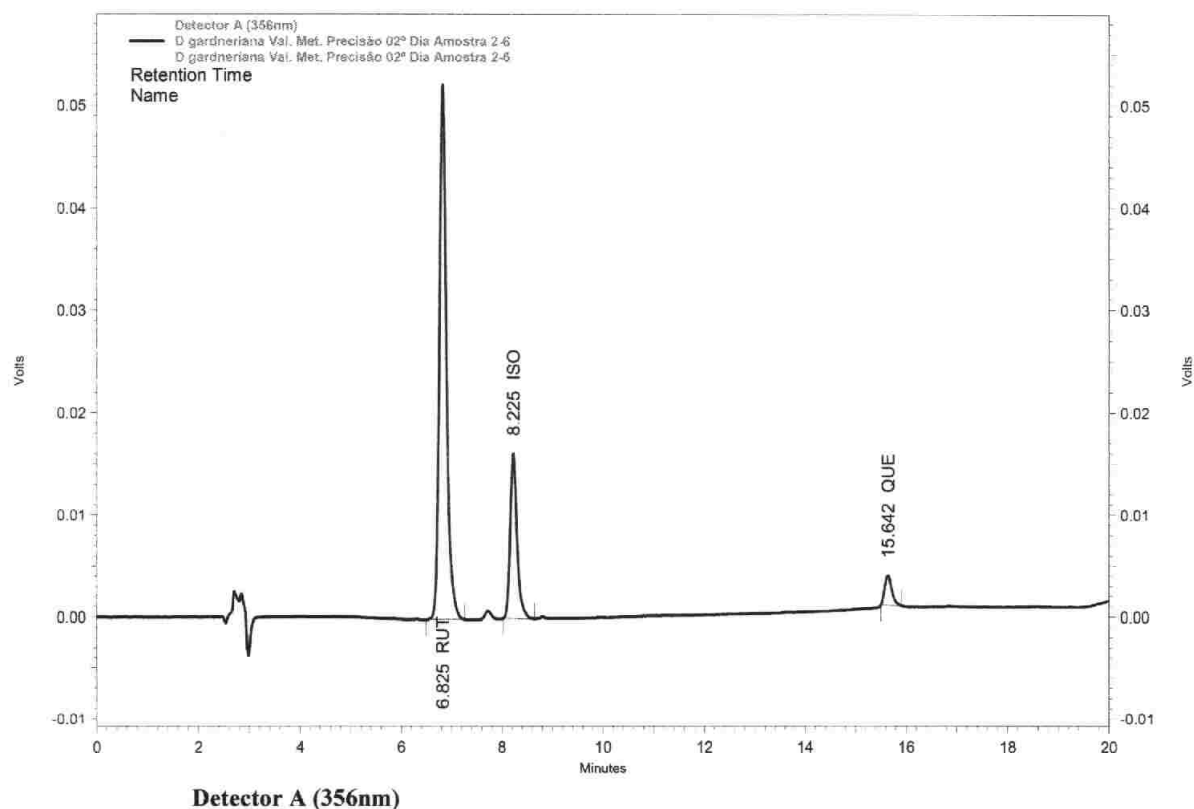
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Precisão 02º Dia Amostra 2-6

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 16/4/2012 15:25:42

Data de Impressão: 16/4/2012 20:53:55



Detector A (356nm)		
Name	Retention Time	Area
RUT	6.825	509878
ISO	8.225	149891
QUE	15.642	24675

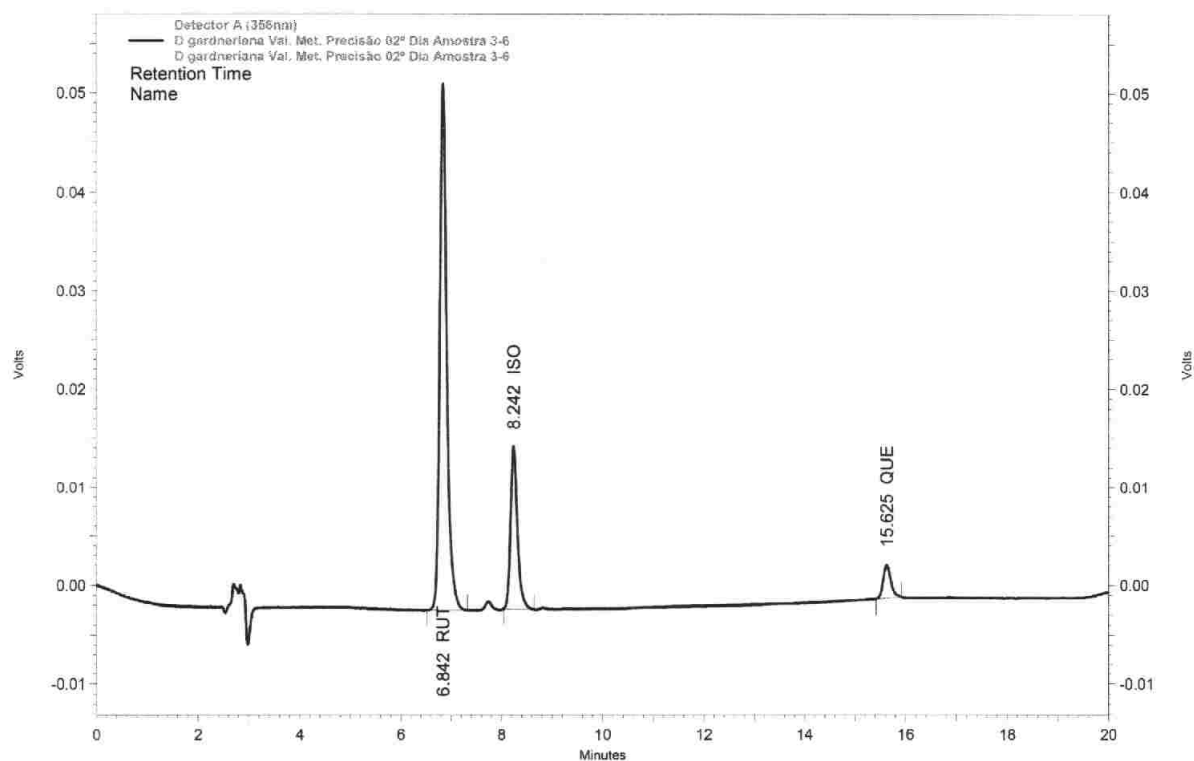
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Precisão 02º Dia Amostra 3-6

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 16/4/2012 15:49:36

Data de Impressão: 16/4/2012 20:54:16



Detector A (356nm)		
Name	Retention Time	Area
RUT	6.842	516742
ISO	8.242	155370
QUE	15.625	24324

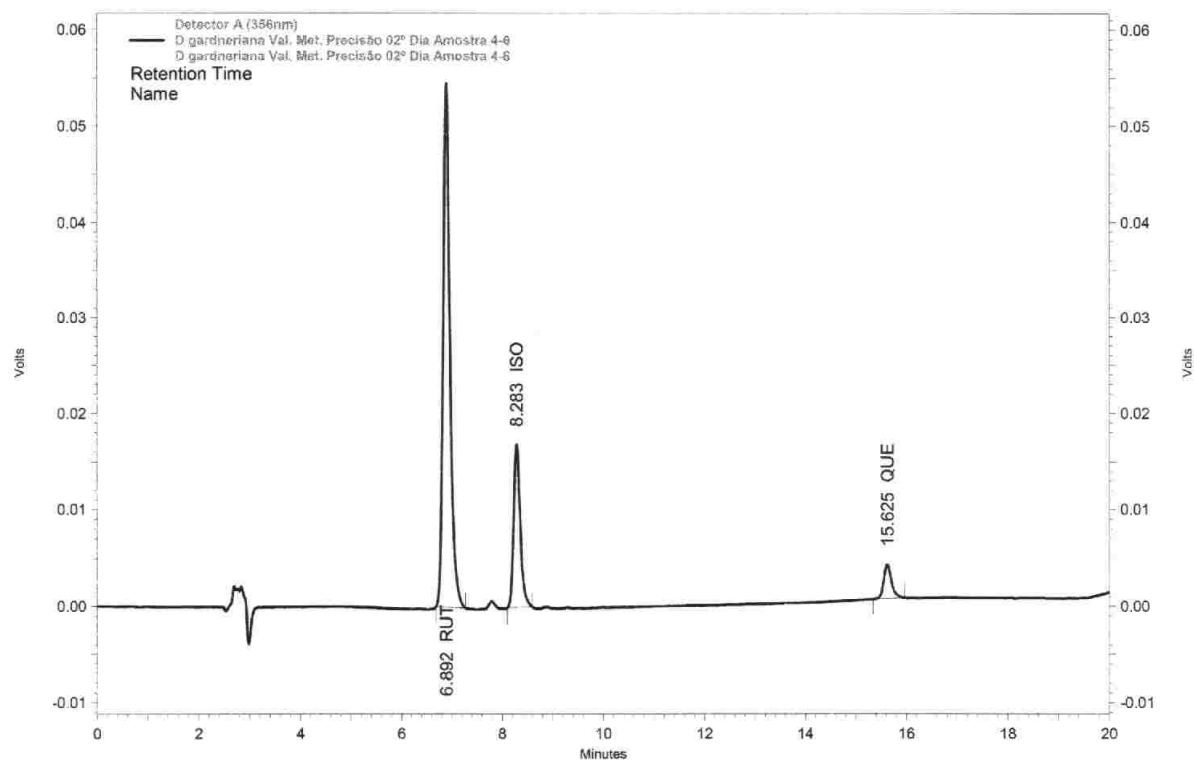
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Precisão 02º Dia Amostra 4-6

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 16/4/2012 16:10:48

Data de Impressão: 16/4/2012 20:54:43



Detector A (356nm)		
Name	Retention Time	Area
RUT	6.892	519603
ISO	8.283	154935
QUE	15.625	24267

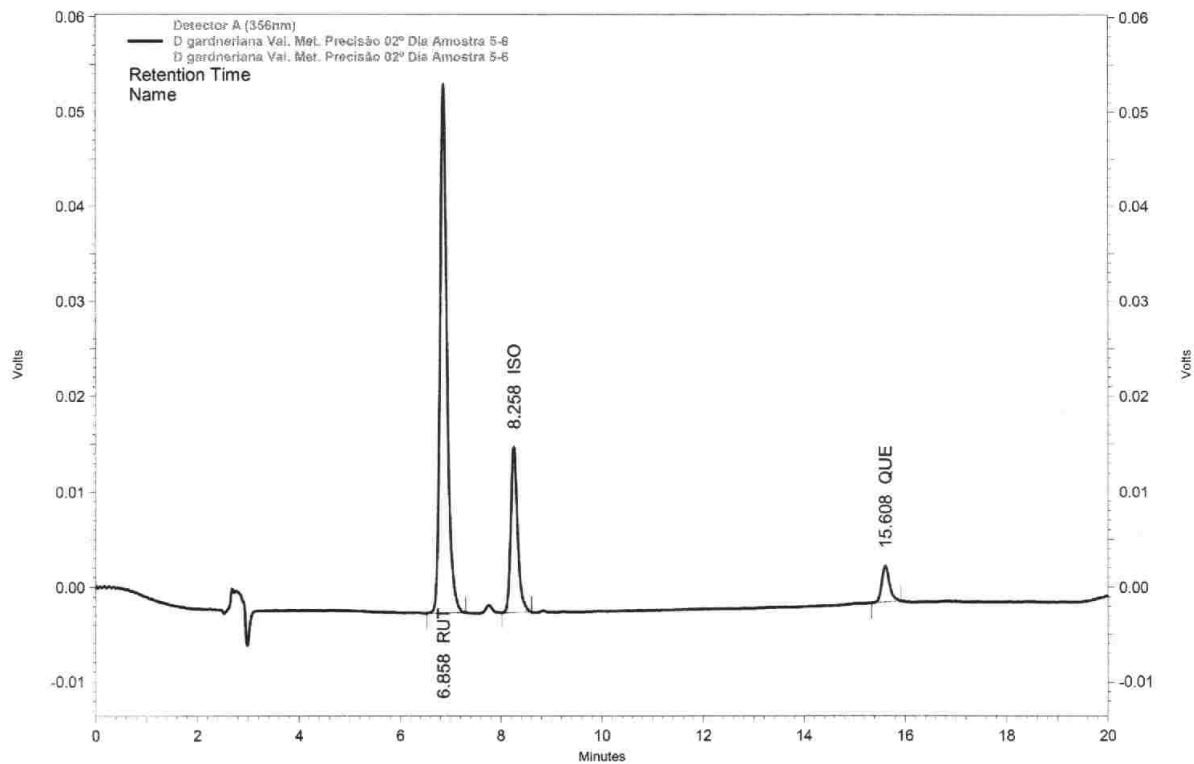
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Precisão 02º Dia Amostra 5-6

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 16/4/2012 16:33:49

Data de Impressão: 16/4/2012 20:55:34



Detector A (356nm)		
Name	Retention Time	Area
RUT	6.858	520065
ISO	8.258	153440
QUE	15.608	24187

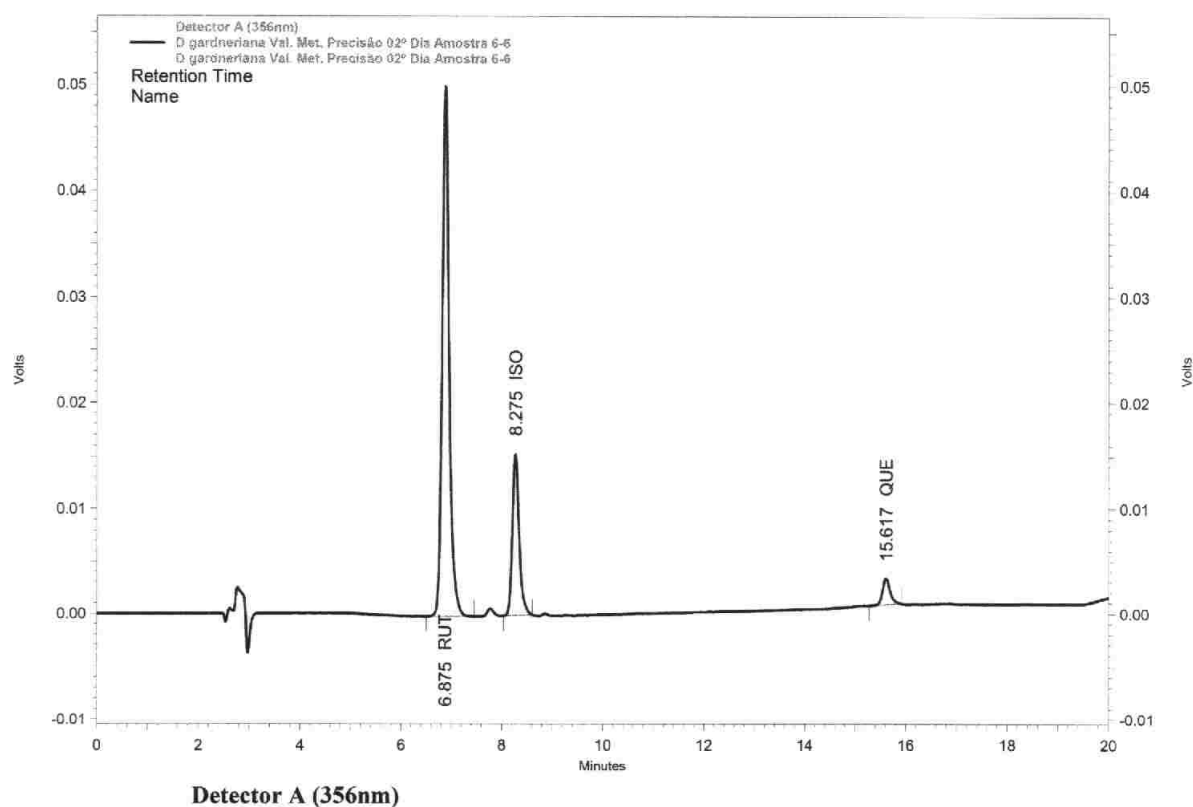
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Precisão 02º Dia Amostra 6-6

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 16/4/2012 16:54:27

Data de Impressão: 16/4/2012 20:56:09



Name	Retention Time	Area
RUT	6.875	511254
ISO	8.275	149925
QUE	15.617	24599

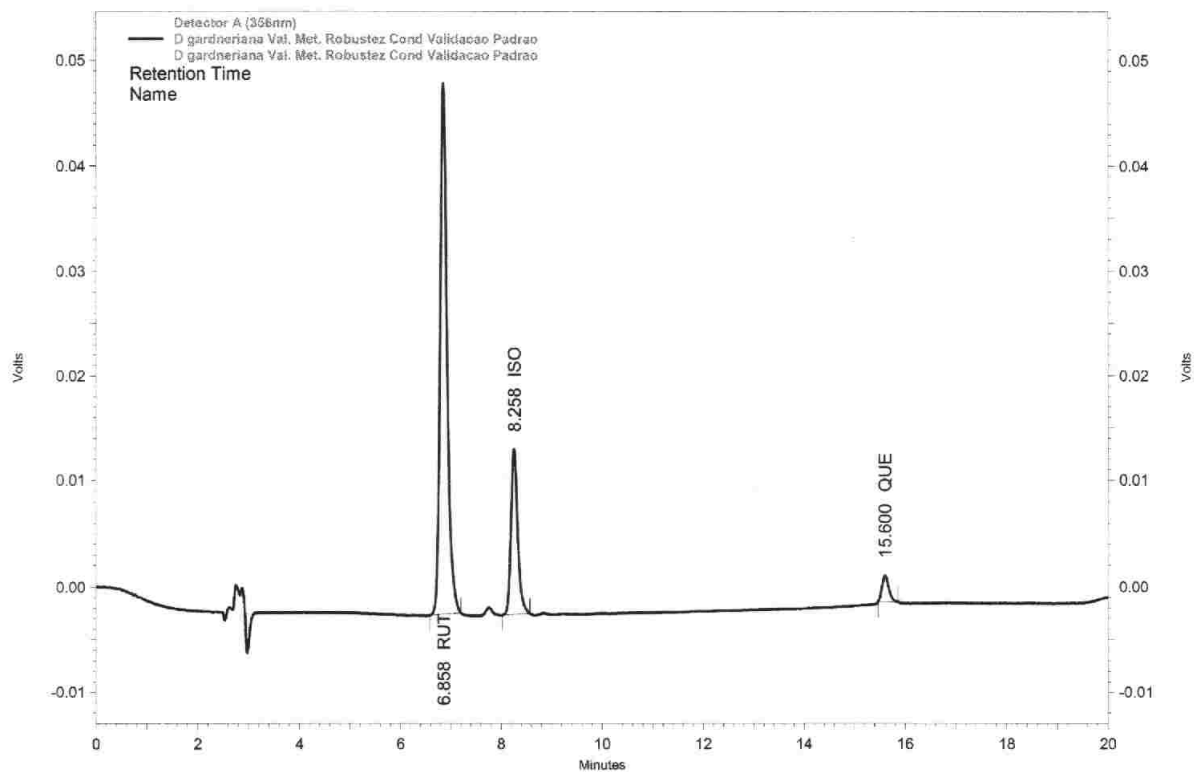
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Robustez Cond Validacao Padrao

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 16/4/2012 17:20:48

Data de Impressão: 16/4/2012 21:05:09



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.858	485864	100.000 CAL
ISO	8.258	144649	100.000 CAL
QUE	15.600	22932	100.000 CAL

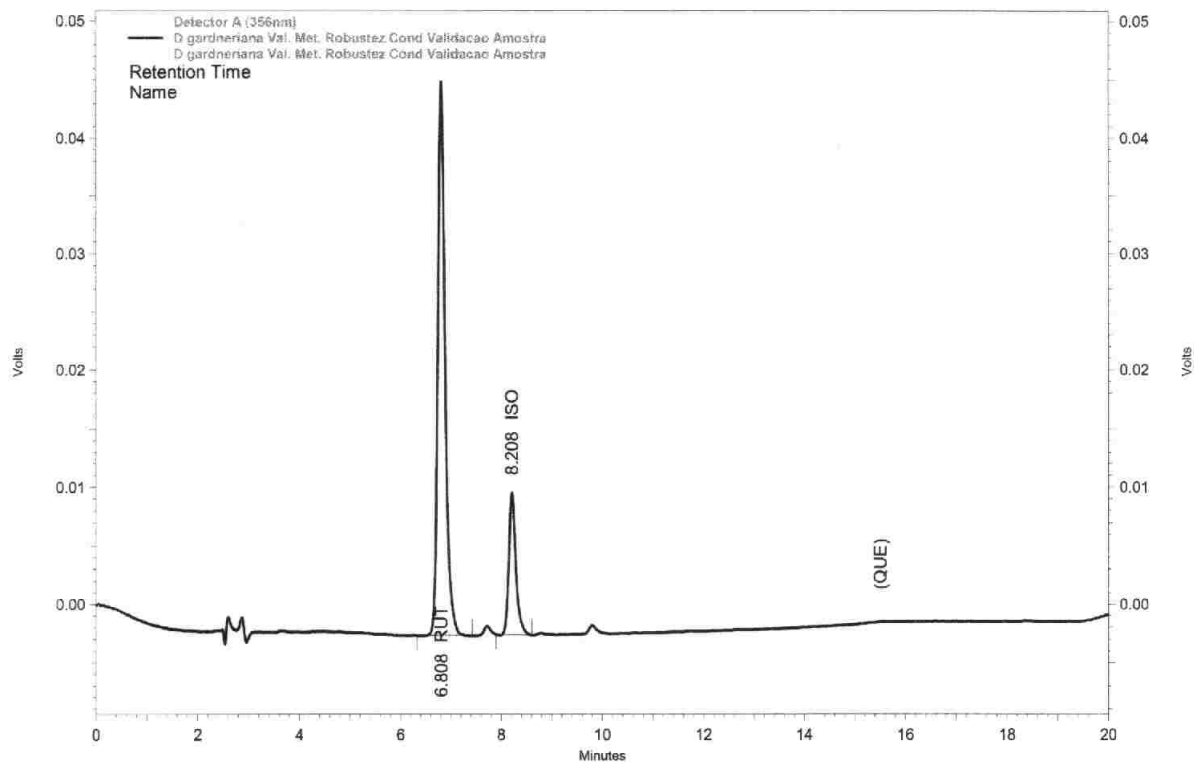
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Robustez Cond Validacao Amostra

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 16/4/2012 17:41:42

Data de Impressão: 16/4/2012 21:05:25



Detector A (356nm)			
Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.808	486412	100.150
ISO	8.208	119032	82.290
QUE			0.000 BDL

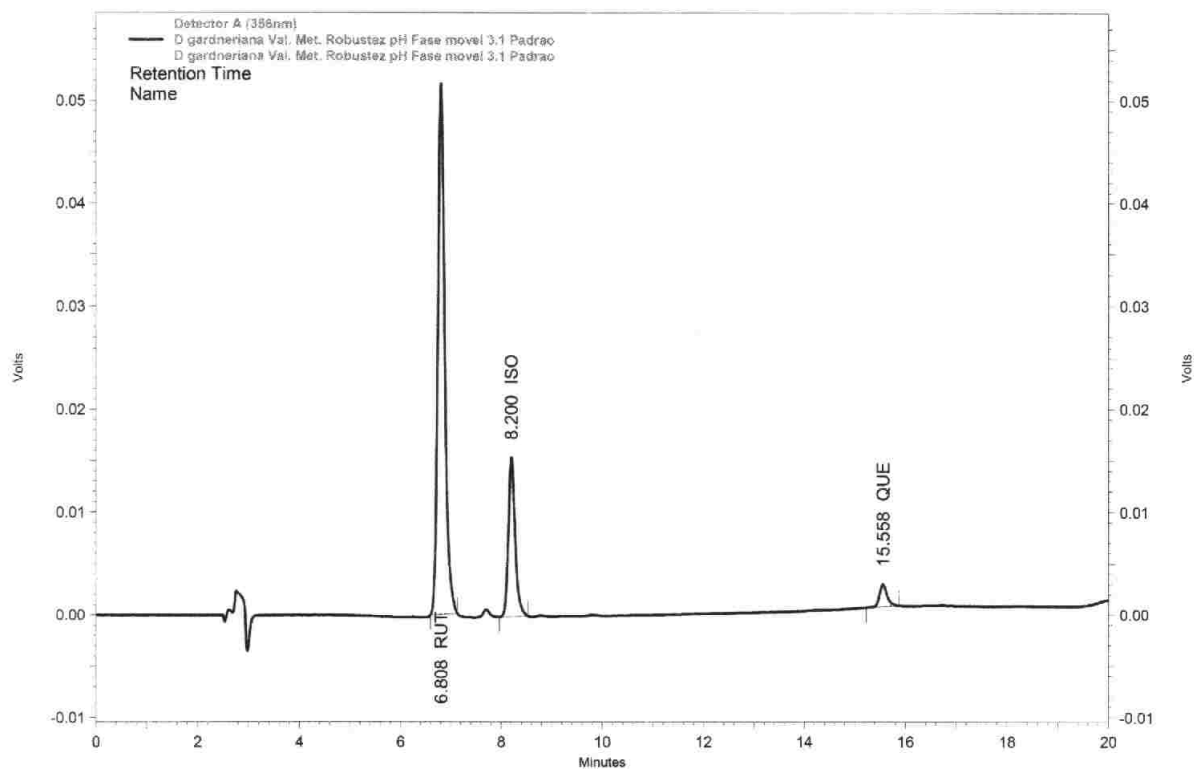
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Robustez pH Fase movel 3.1 Padrao

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 16/4/2012 19:06:21

Data de Impressão: 16/4/2012 21:11:13



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.808	492923	100.000 CAL
ISO	8.200	145804	100.000 CAL
QUE	15.558	21846	100.000 CAL

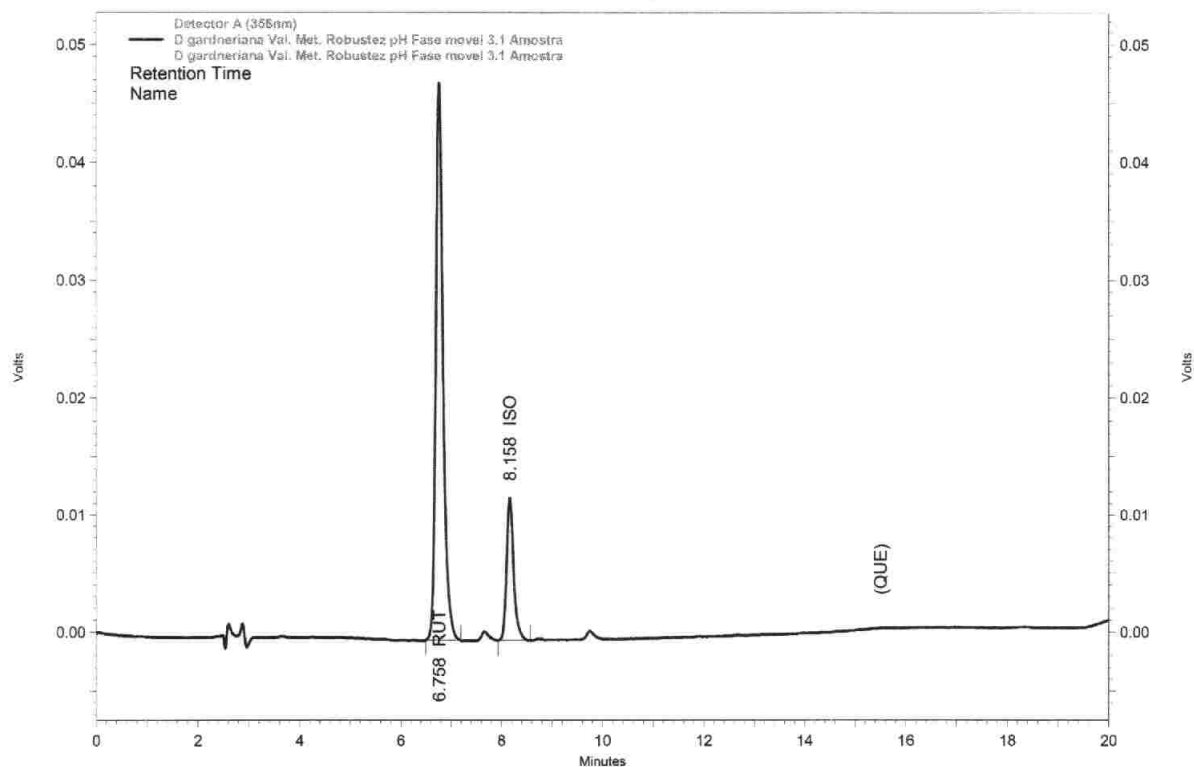
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Robustez pH Fase movel 3.1 Amostra

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 16/4/2012 19:28:26

Data de Impressão: 16/4/2012 21:11:43



Detector A (356nm)			
Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.758	494106	100.240
ISO	8.158	119618	82.040
QUE			0.000 BDL

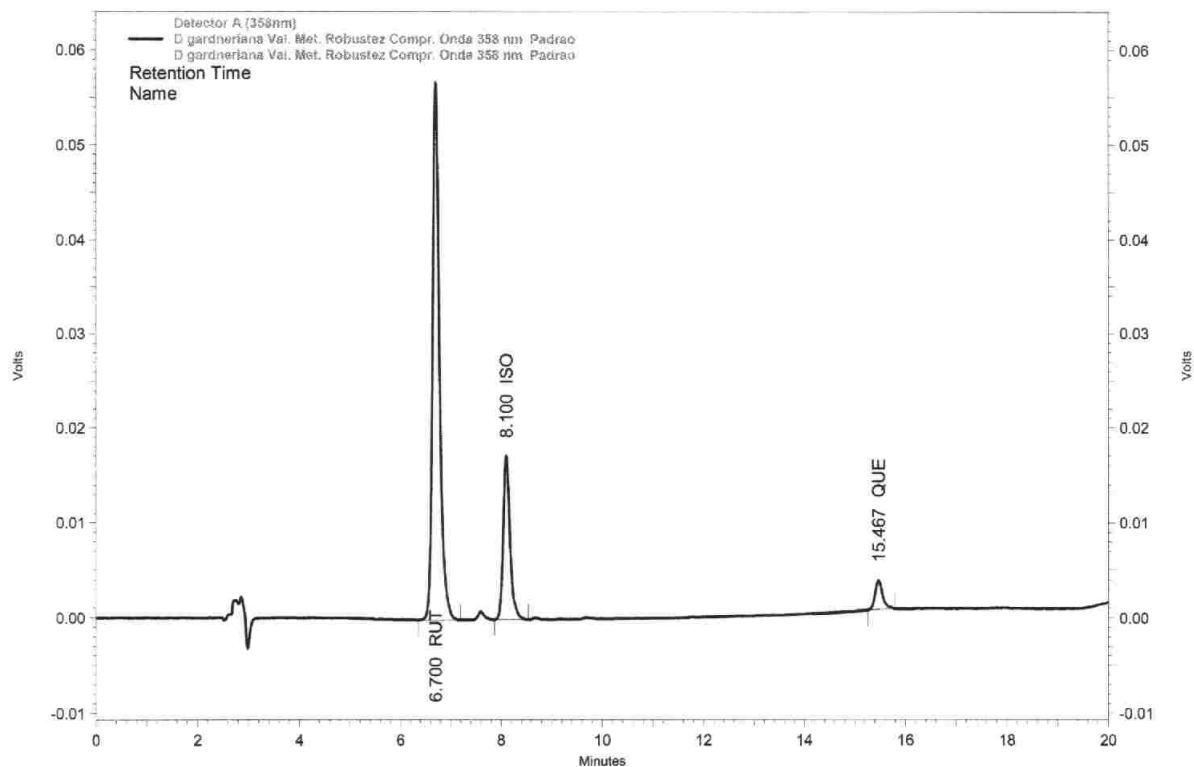
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Robustez Compr. Onda 358 nm Padrao

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 16/4/2012 20:54:07

Data de Impressão: 16/4/2012 21:14:07



Detector A (358nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.700	543505	100.000 CAL
ISO	8.100	160457	100.000 CAL
QUE	15.467	32088	100.000 CAL

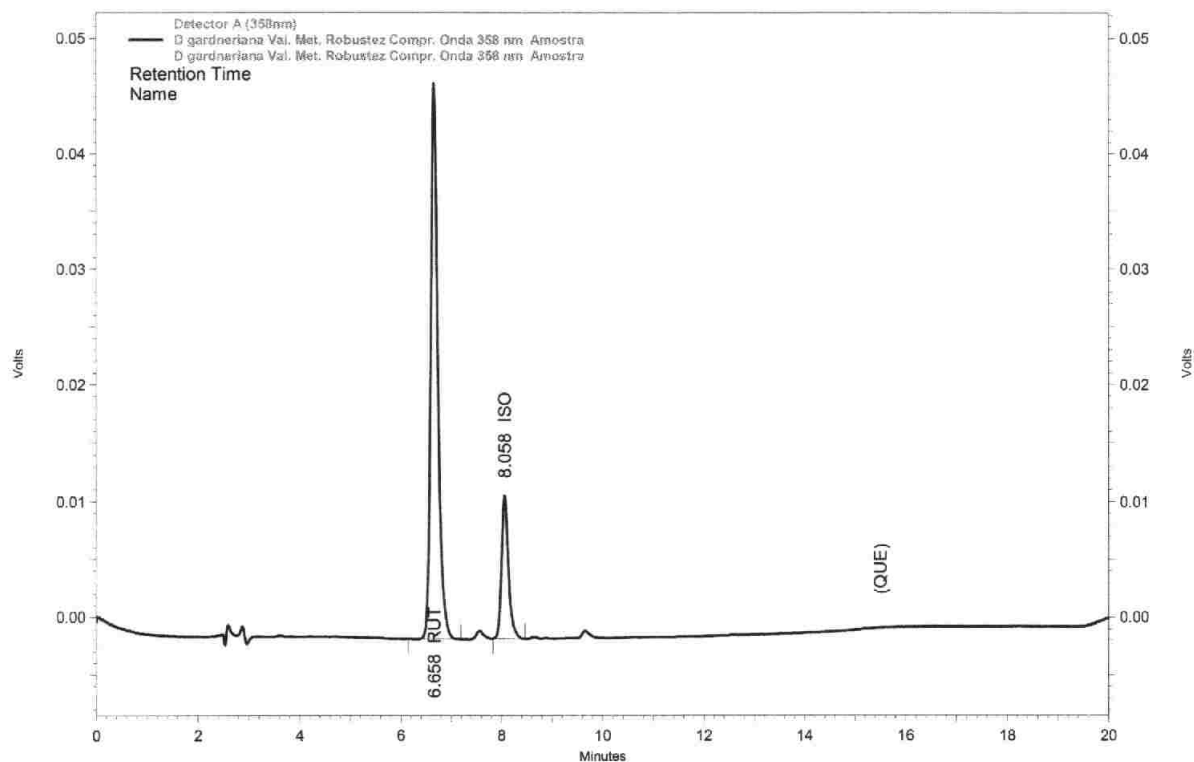
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Robustez Compr. Onda 358 nm Amostra

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 16/4/2012 21:15:28

Data de Impressão: 16/4/2012 21:14:24



Detector A (358nm)			
Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.658	545625	100.390
ISO	8,058	131366	81.870
QUE			0.000 BDL

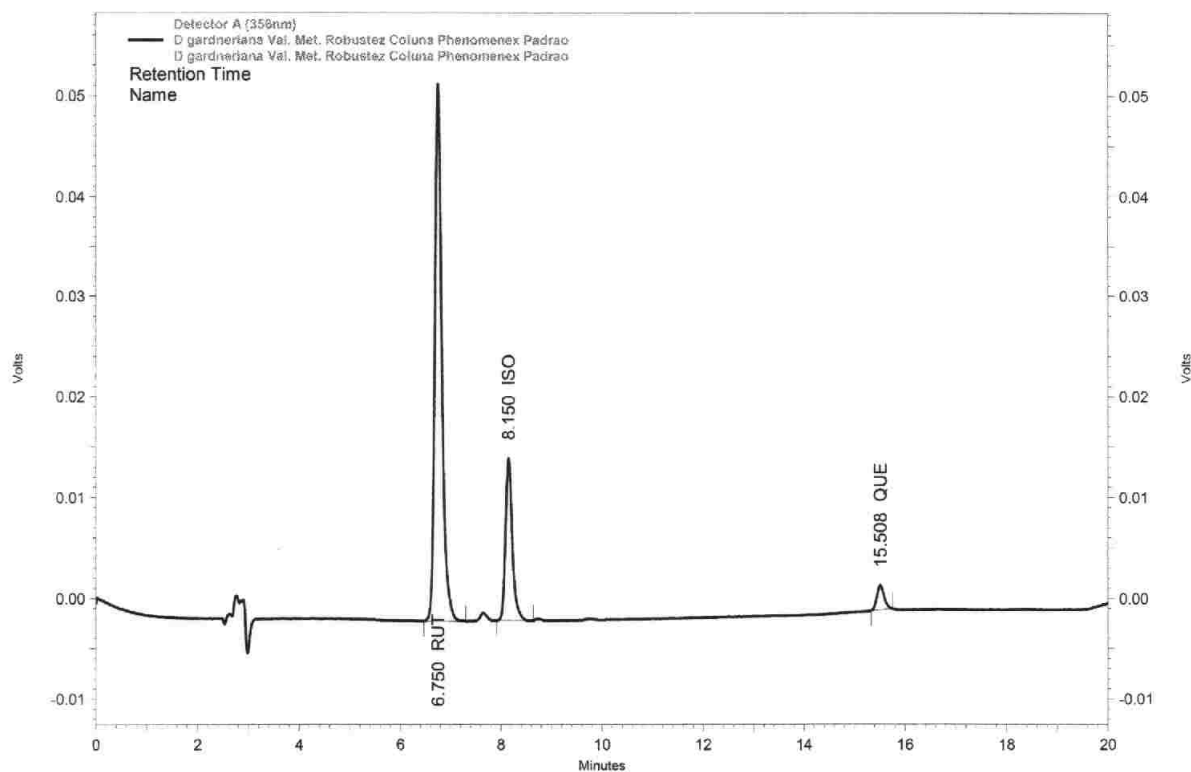
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Robustez Coluna Phenomenex Padrao

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 16/4/2012 19:49:41

Data de Impressão: 16/4/2012 21:20:02



Detector A (356nm)				
Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	
RUT	6.750	519158	100.000	CAL
ISO	8.150	151311	100.000	CAL
QUE	15.508	23881	100.000	CAL

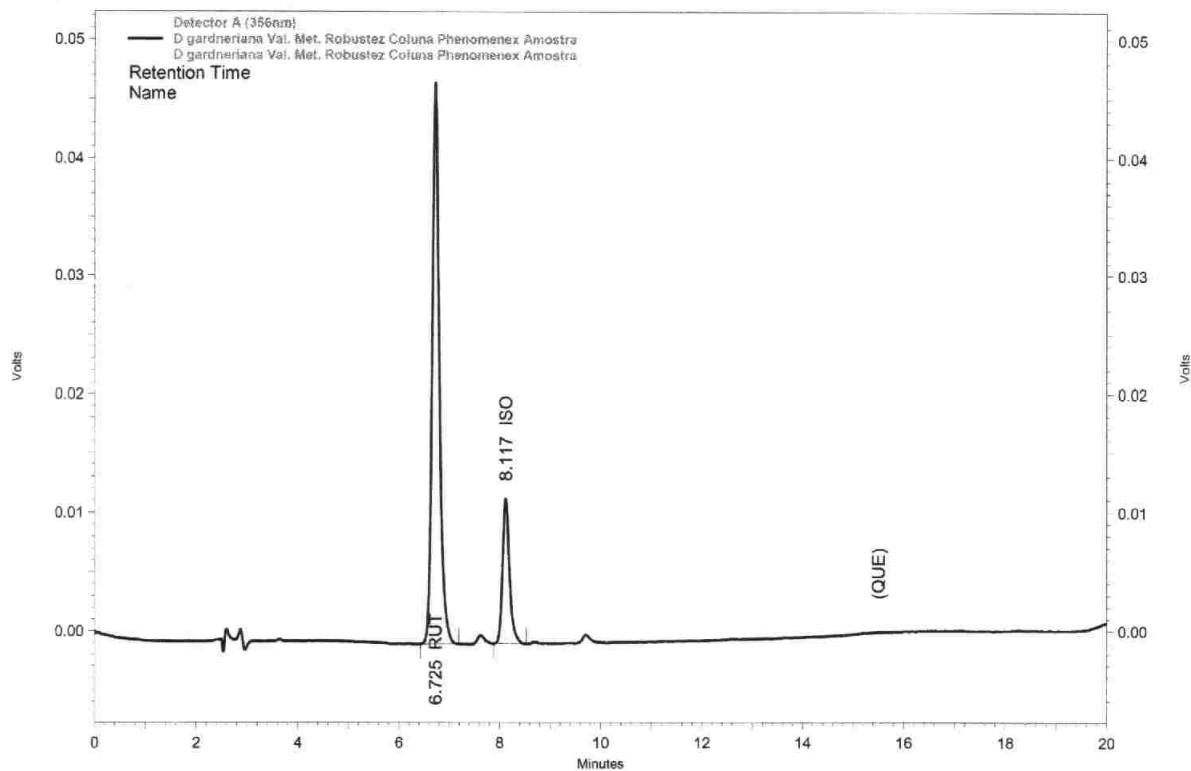
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Robustez Coluna Phenomenex Amostra

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 16/4/2012 20:11:07

Data de Impressão: 16/4/2012 21:20:25



Detector A (356nm)			
Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.725	518032	99.783
ISO	8.117	125434	82.898
QUE			0.000 BDL

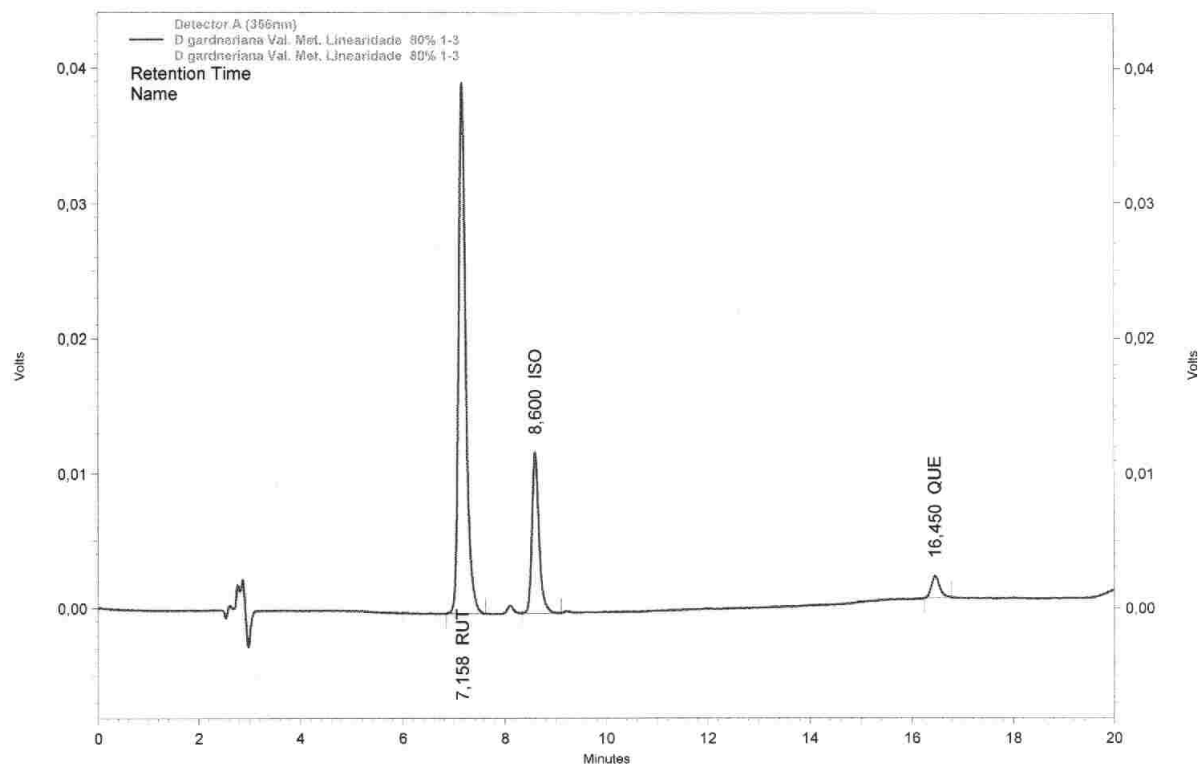
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Linearidade 80% 1-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/4/2012 09:40:24

Data de Impressão: 26/4/2012 19:24:57



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area
RUT	7,158	381384
ISO	8,600	114766
QUE	16,450	17968

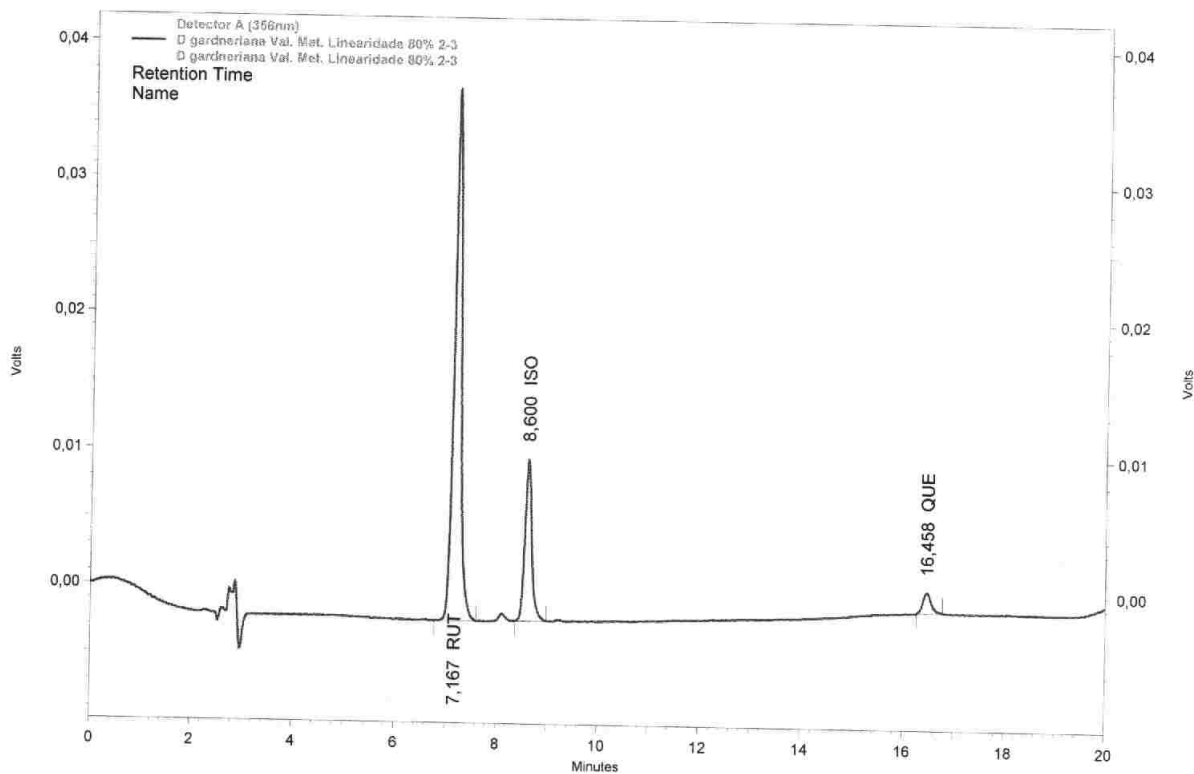
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Linearidade 80% 2-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/4/2012 10:01:15

Data de Impressão: 26/4/2012 19:27:49



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area
RUT	7,167	380804
ISO	8,600	114089
QUE	16,458	17587

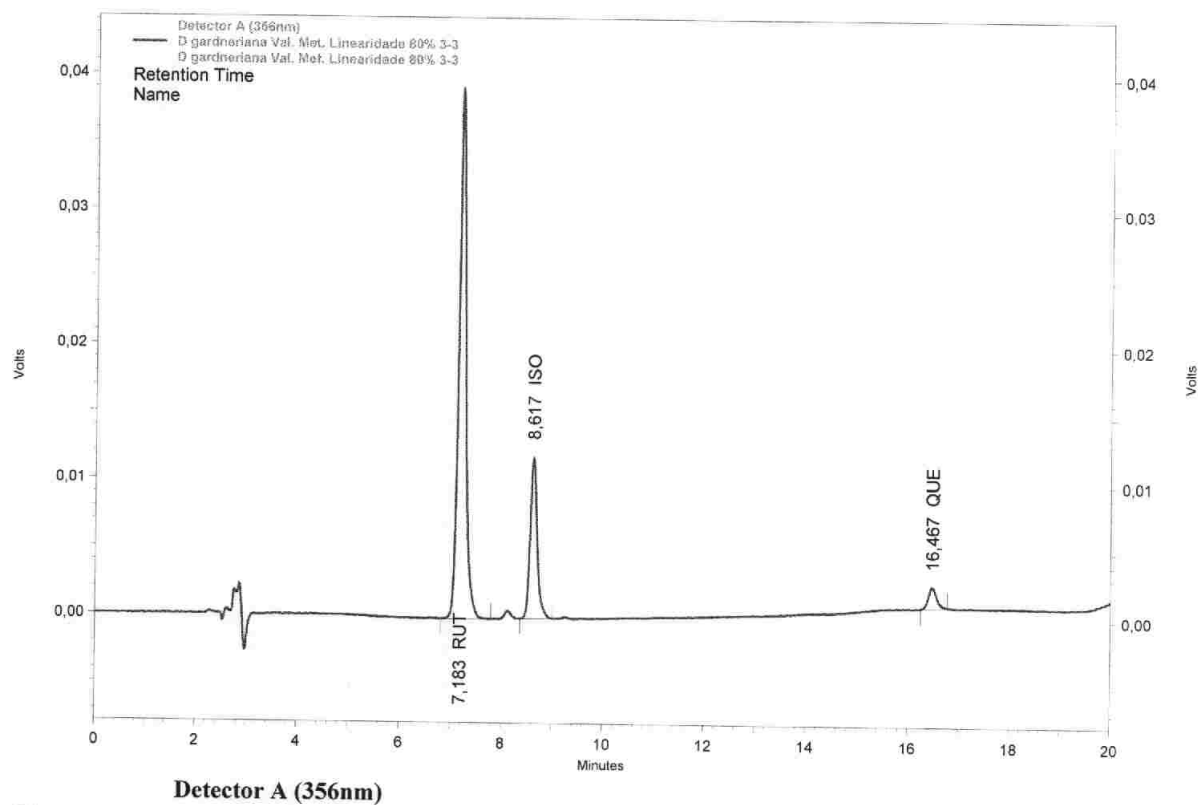
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Linearidade 80% 3-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/4/2012 10:21:41

Data de Impressão: 26/4/2012 19:28:41



Name	Retention Time	Area
RUT	7,183	382103
ISO	8,617	114537
QUE	16,467	17917

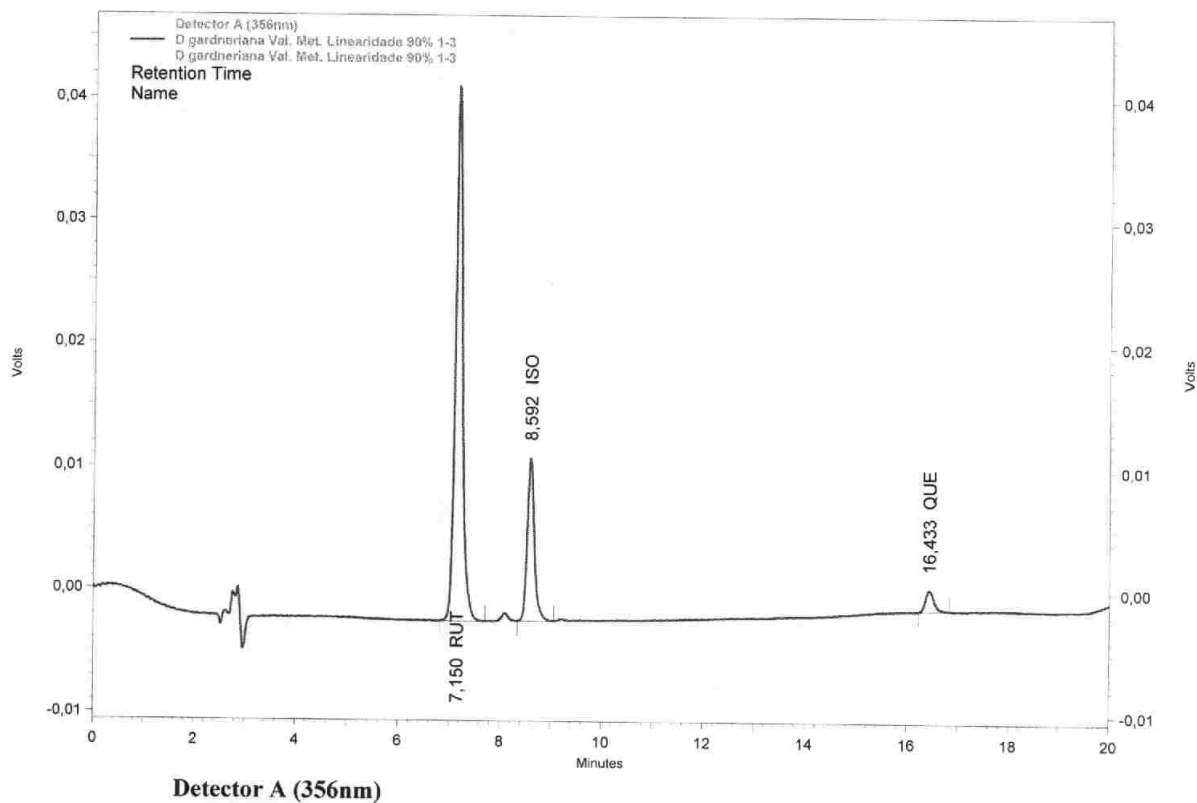
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Linearidade 90% 1-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/4/2012 10:46:26

Data de Impressão: 26/4/2012 19:29:20



Name	Retention Time	Area
RUT	7,150	423070
ISO	8,592	128365
QUE	16,433	20239

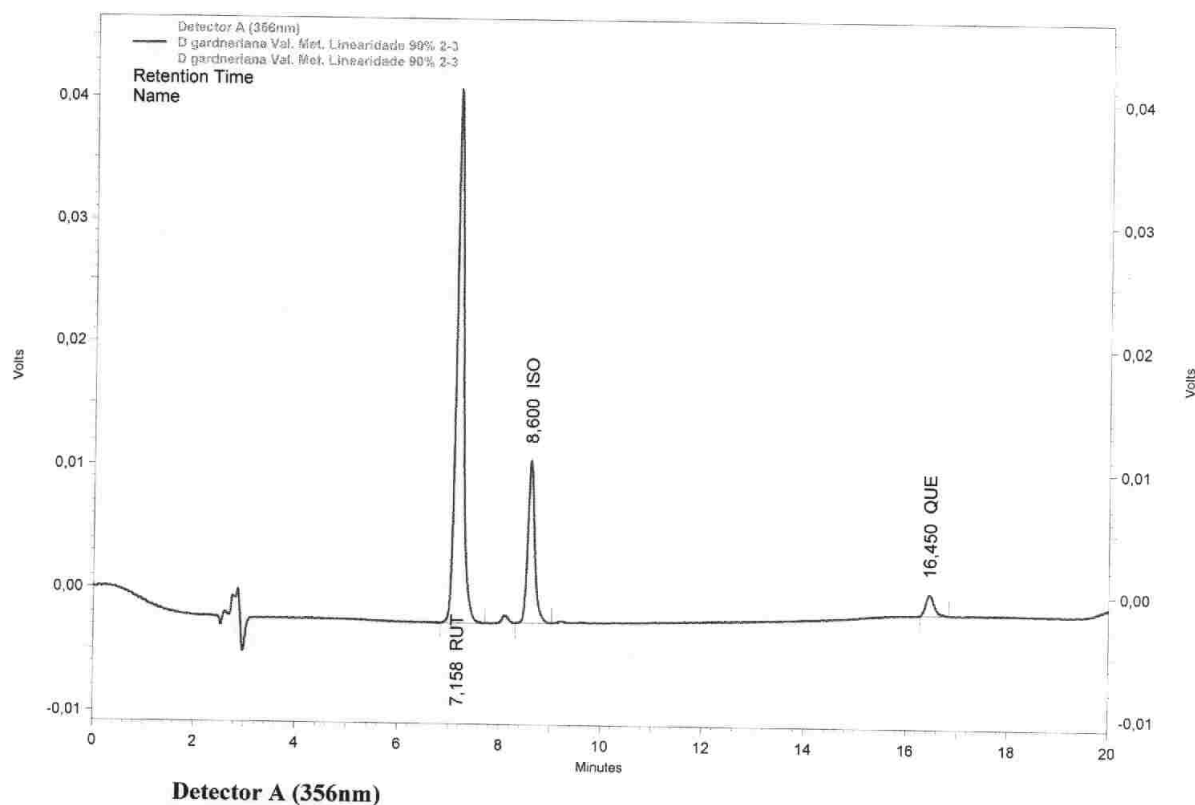
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Linearidade 90% 2-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/4/2012 11:06:54

Data de Impressão: 26/4/2012 19:30:13



Name	Retention Time	Area
RUT	7,158	424733
ISO	8,600	127343
QUE	16,450	19751

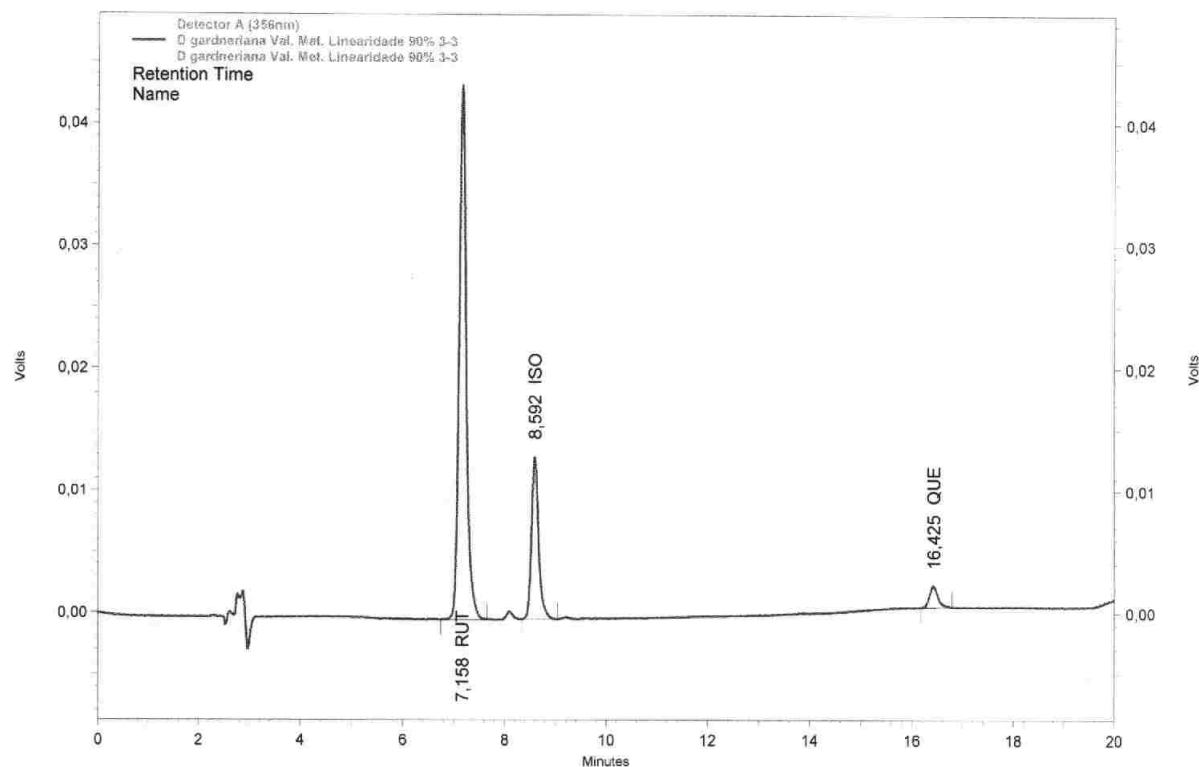
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Linearidade 90% 3-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/4/2012 11:27:29

Data de Impressão: 26/4/2012 19:30:48



Detector A (356nm)		
Name	Retention Time	Area
RUT	7,158	423032
ISO	8,592	128255
QUE	16,425	20022

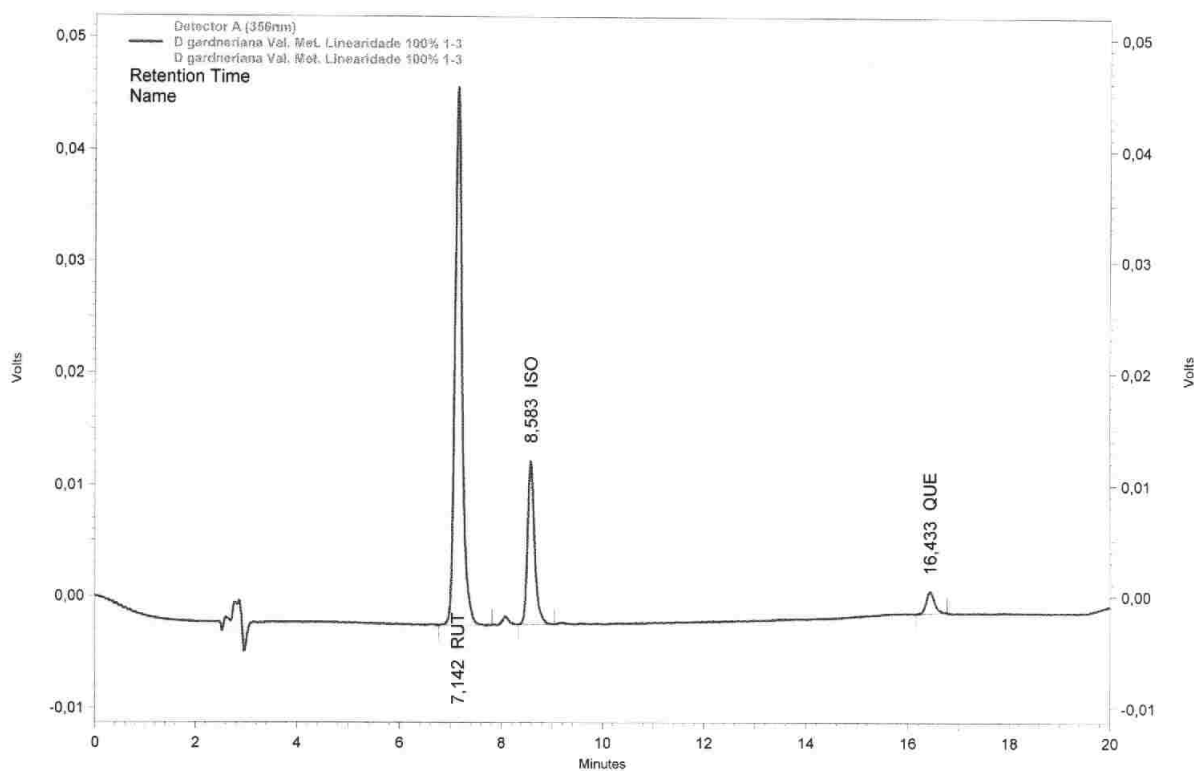
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Linearidade 100% 1-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/4/2012 11:49:42

Data de Impressão: 26/4/2012 19:32:01



Detector A (356nm)		
Name	Retention Time	Area
RUT	7,142	471475
ISO	8,583	141125
QUE	16,433	22418

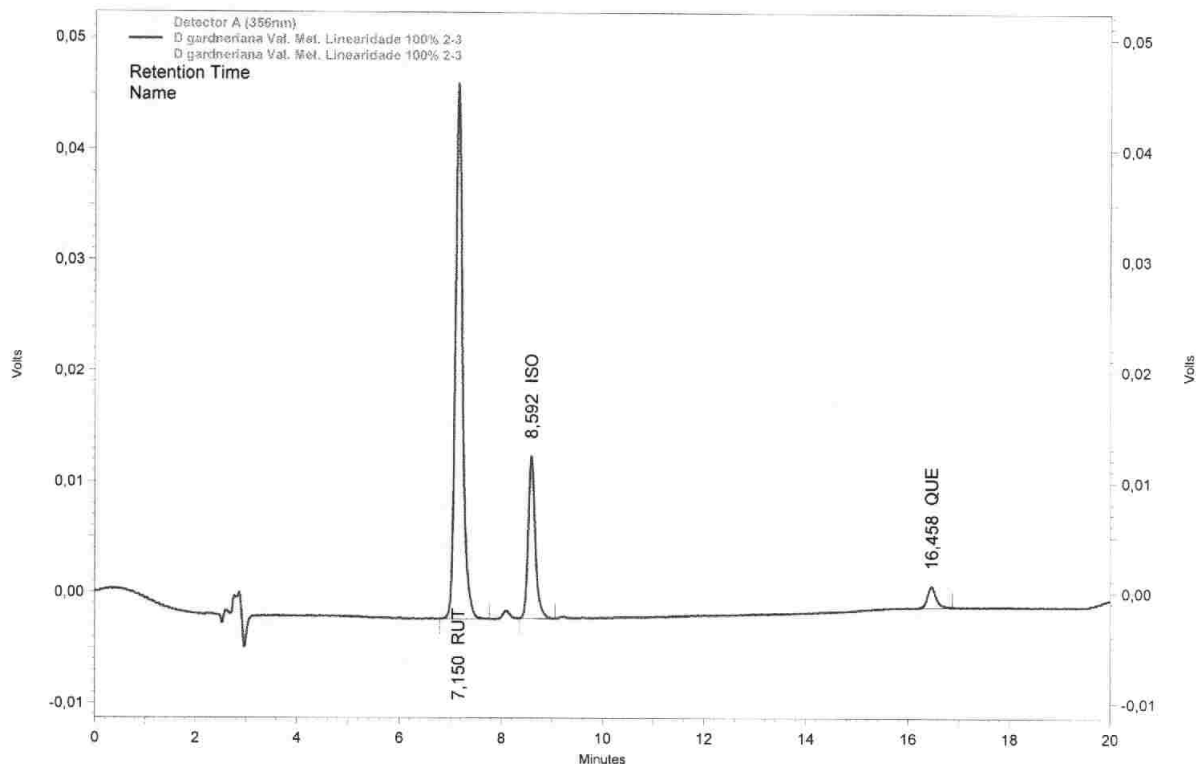
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Linearidade 100% 2-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/4/2012 12:10:45

Data de Impressão: 26/4/2012 19:32:40



Detector A (356nm)		
Name	Retention Time	Area
RUT	7,150	472672
ISO	8,592	141440
QUE	16,458	22497

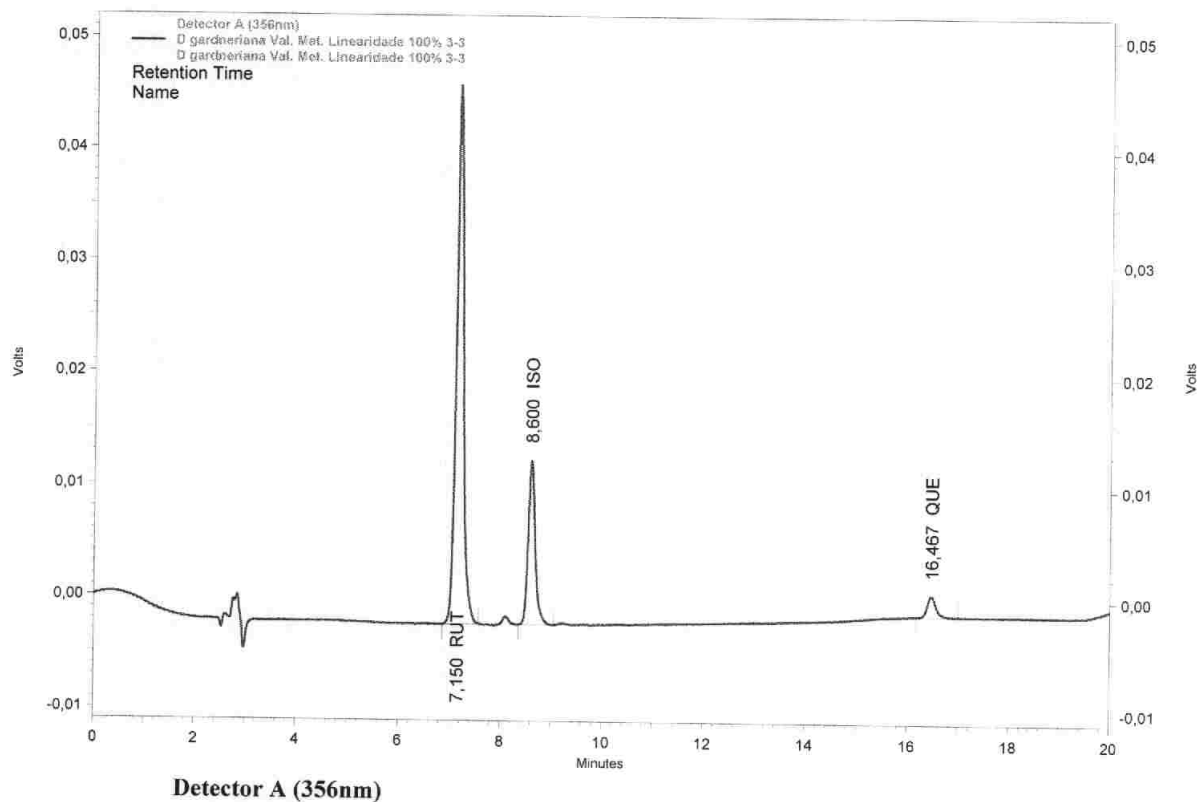
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Linearidade 100% 3-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/4/2012 12:31:05

Data de Impressão: 26/4/2012 19:33:47



Name	Retention Time	Area
RUT	7,150	470580
ISO	8,600	141436
QUE	16,467	22380

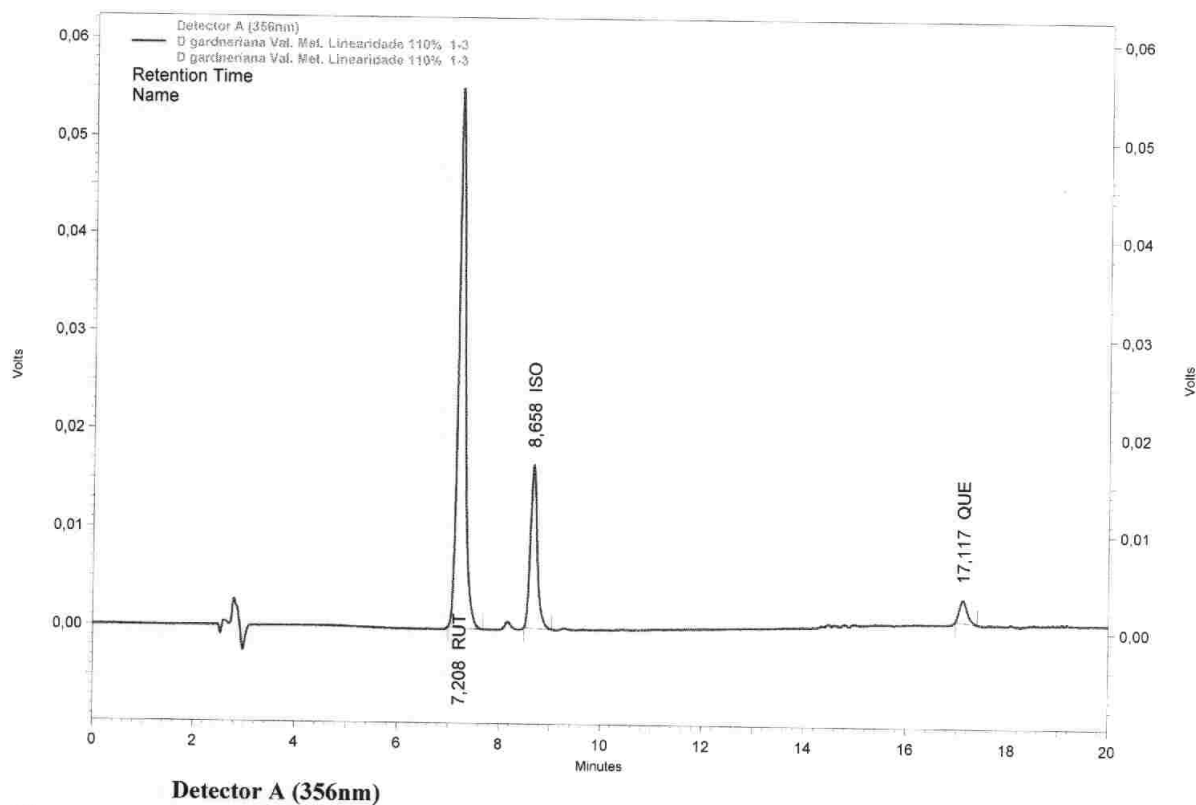
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Linearidade 110% 1-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/4/2012 15:42:49

Data de Impressão: 26/4/2012 19:35:07



Detector A (356nm)		
Name	Retention Time	Area
RUT	7,208	529300
ISO	8,658	156787
QUE	17,117	24720

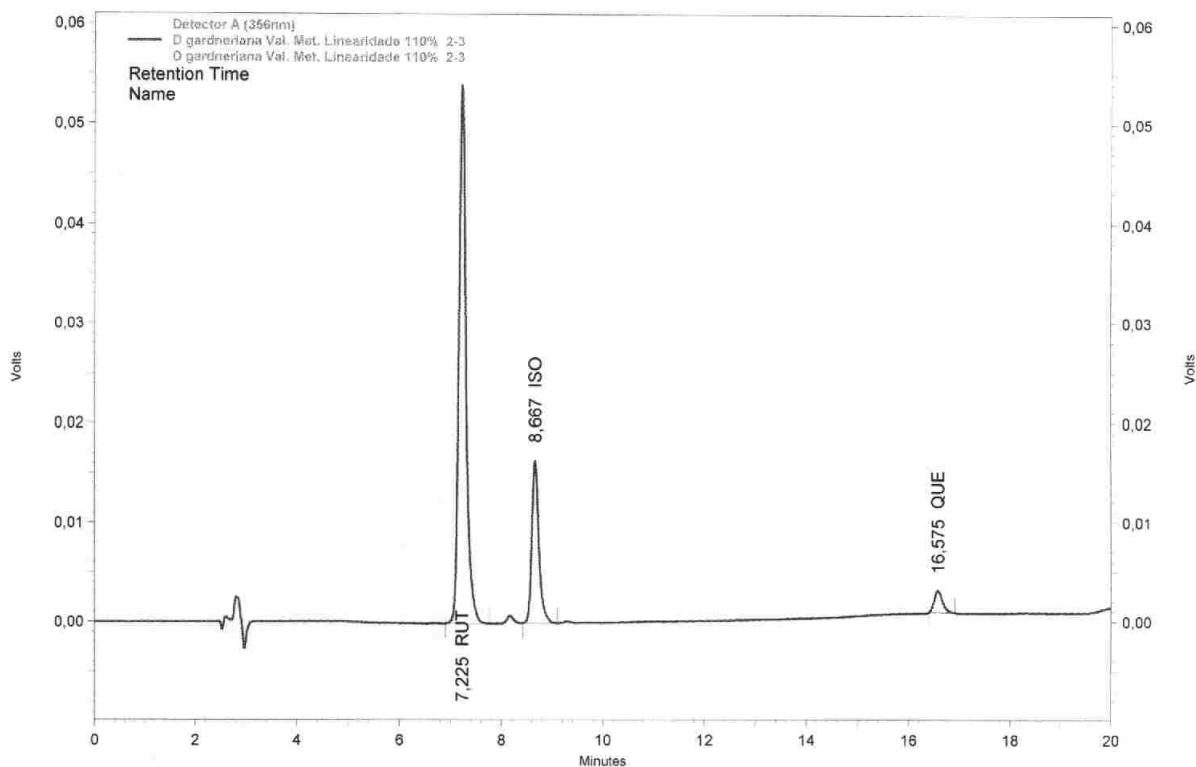
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Linearidade 110% 2-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/4/2012 15:09:00

Data de Impressão: 26/4/2012 19:35:54



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area
RUT	7,225	525044
ISO	8,667	158173
QUE	16,575	24690

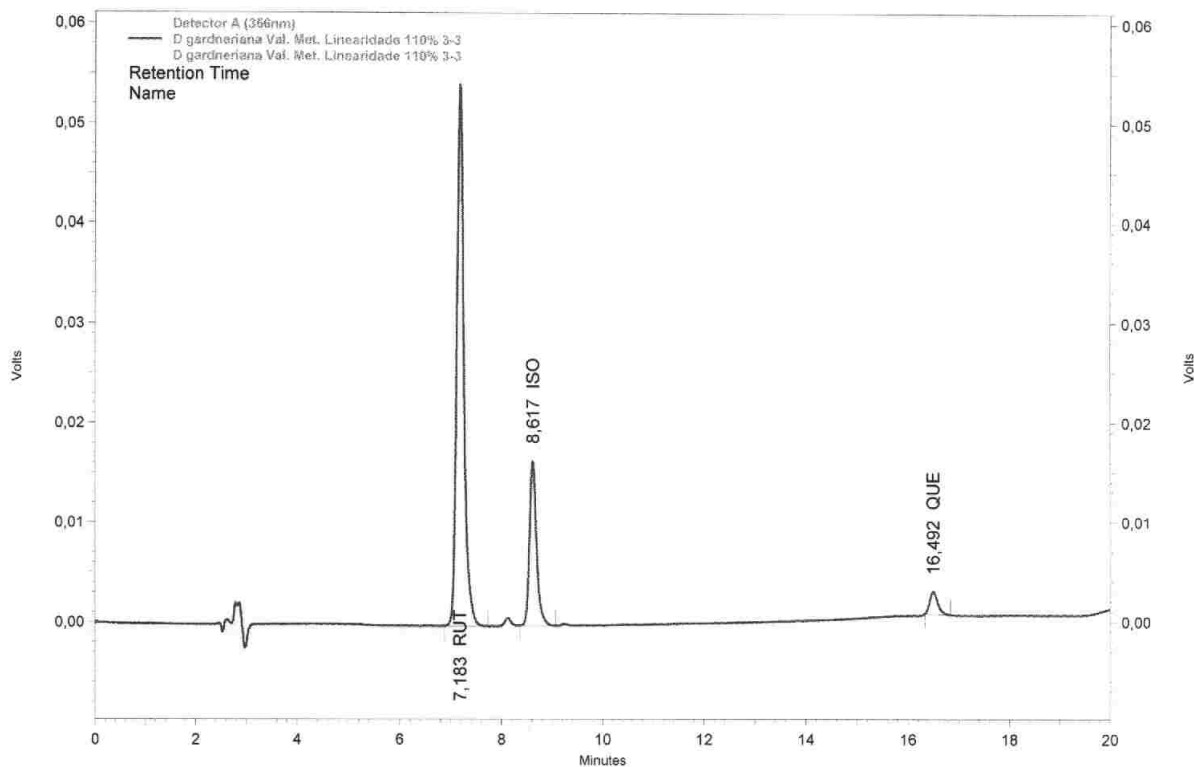
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Linearidade 110% 3-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/4/2012 13:36:42

Data de Impressão: 26/4/2012 19:36:22



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area
RUT	7,183	525112
ISO	8,617	158502
QUE	16,492	24703

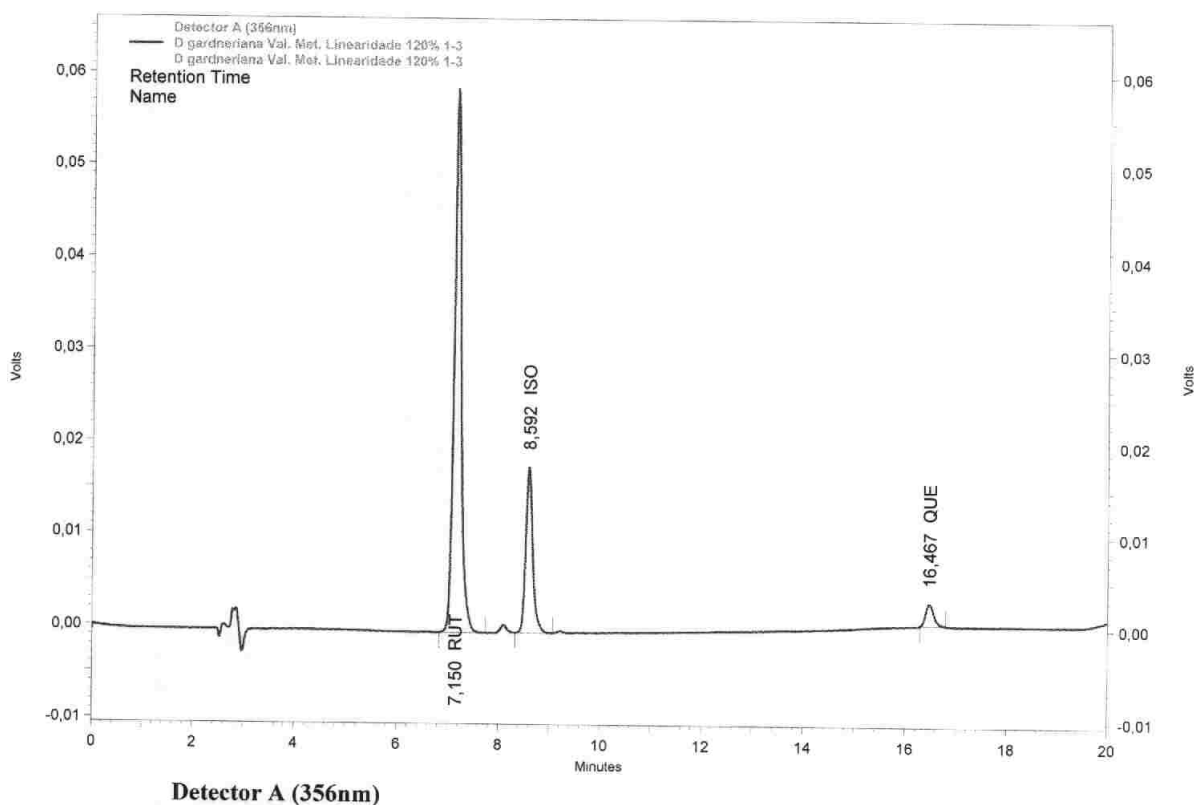
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Linearidade 120% 1-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/4/2012 13:59:06

Data de Impressão: 26/4/2012 19:36:56



Detector A (356nm)		
Name	Retention Time	Area
RUT	7,150	569662
ISO	8,592	172501
QUE	16,467	26711

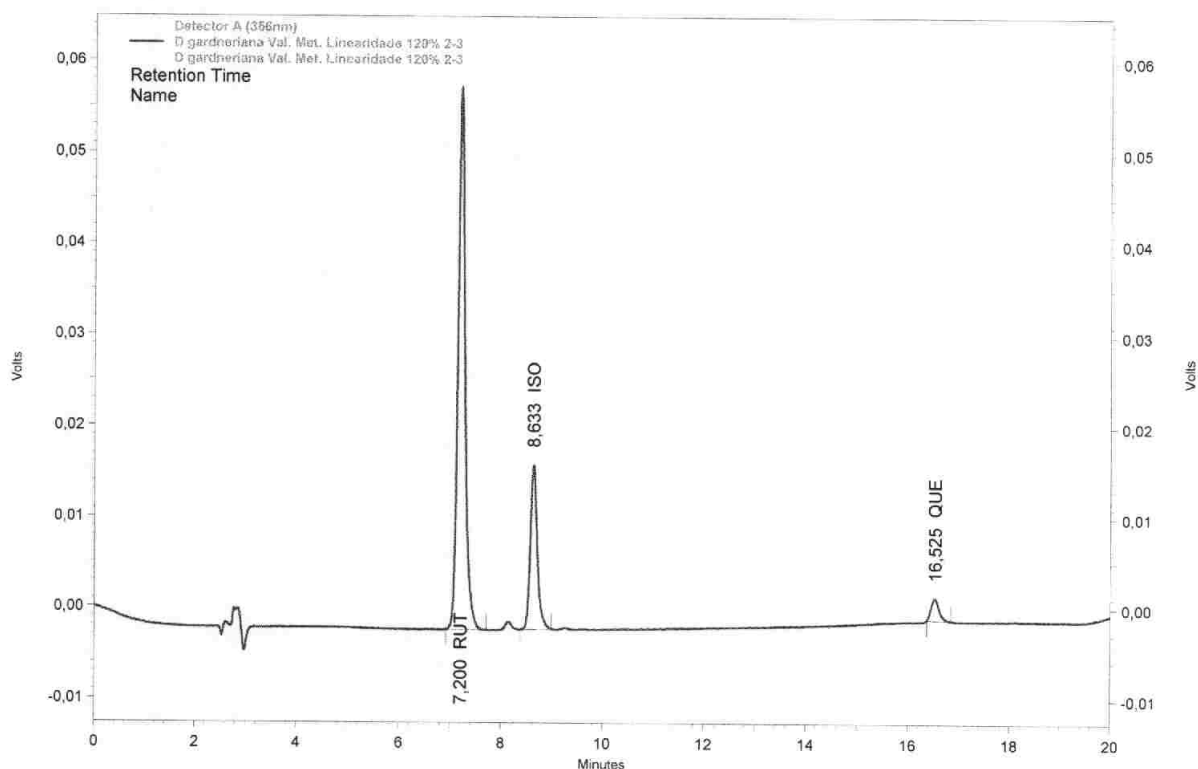
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Linearidade 120% 2-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/4/2012 14:21:06

Data de Impressão: 26/4/2012 19:37:32



Detector A (356nm)		
Name	Retention Time	Area
RUT	7,200	576240
ISO	8,633	171894
QUE	16,525	26449

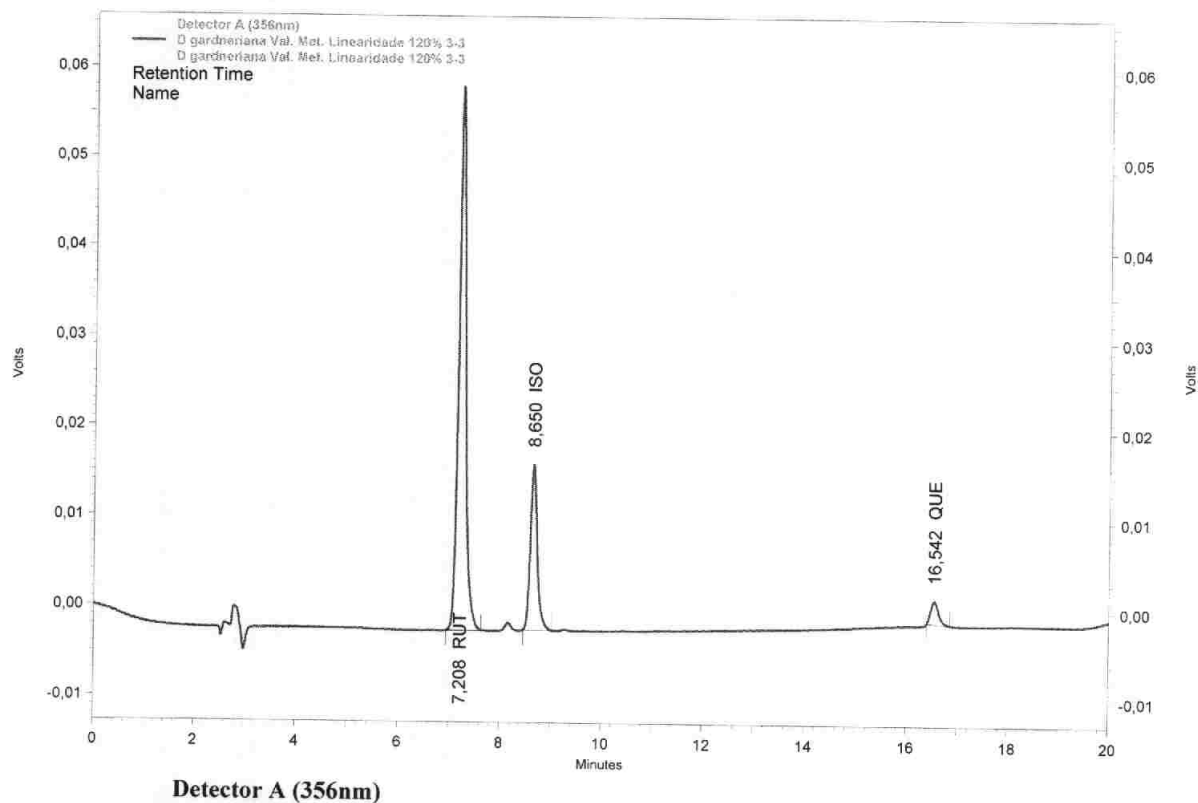
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : D gardneriana Val. Met. Linearidade 120% 3-3

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/4/2012 14:42:16

Data de Impressão: 26/4/2012 19:38:24



Name	Retention Time	Area
RUT	7,208	583168
ISO	8,650	174200
QUE	16,542	27032

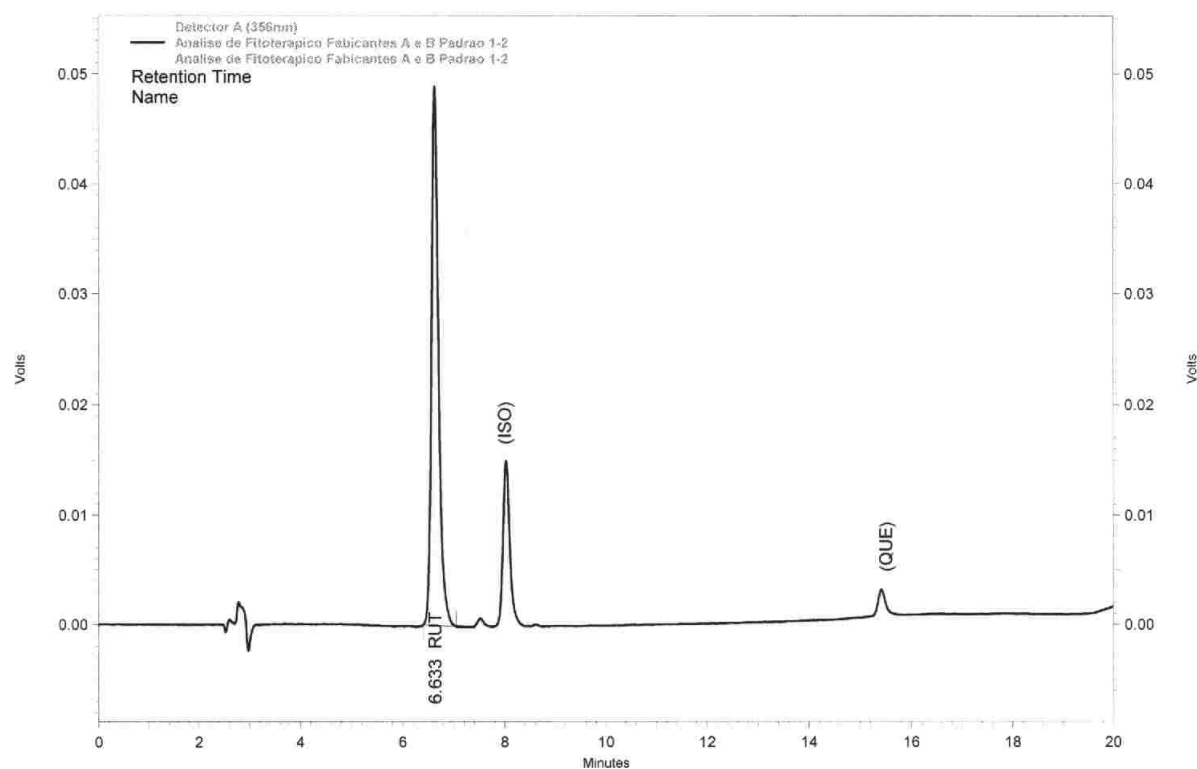
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : Análise de Fitoterapico Fabricantes A e B Padrao 1-2

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 5/5/2012 10:00:17

Data de Impressão: 5/5/2012 16:14:11



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.633	466310	100.000 CAL
ISO			0.000 BDL
QUE			0.000 BDL

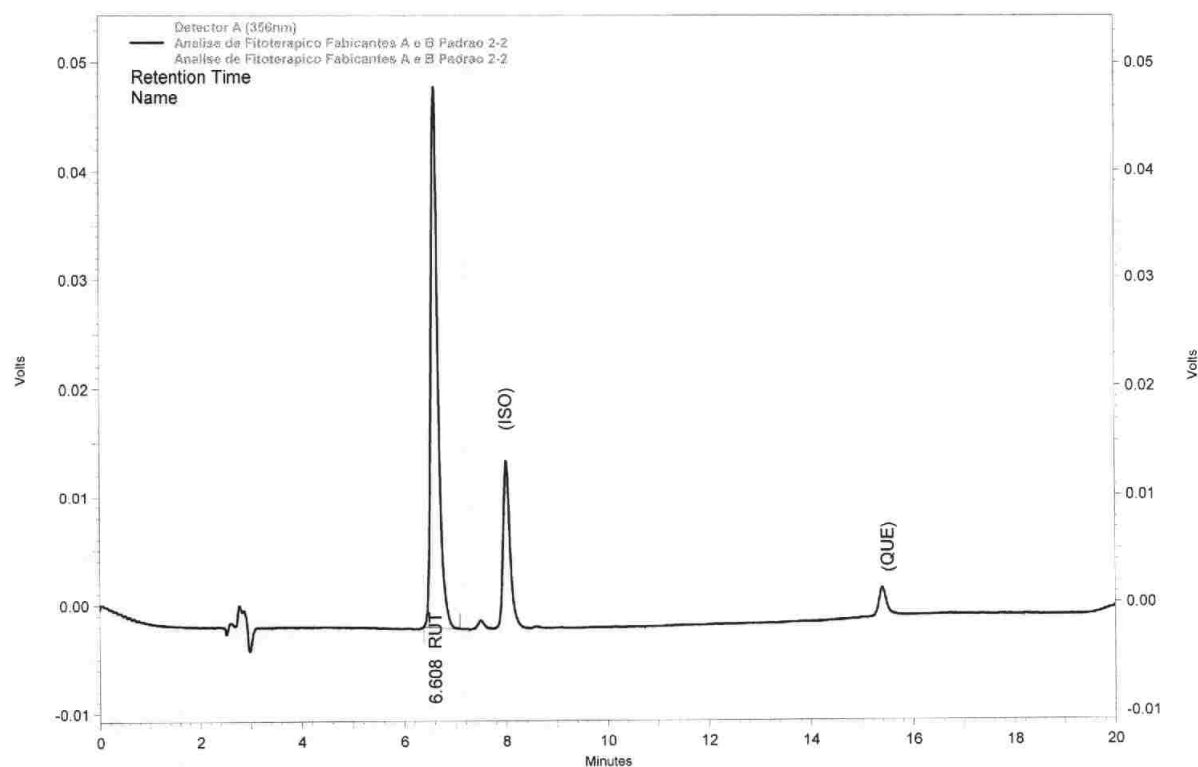
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : Análise de Fitoterapico Fabricantes A e B Padrao 2-2

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 5/5/2012 10:25:33

Data de Impressão: 5/5/2012 16:14:38



Detector A (356nm)			
Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.608	474915	100.000 CAL
ISO			0.000 BDL
QUE			0.000 BDL

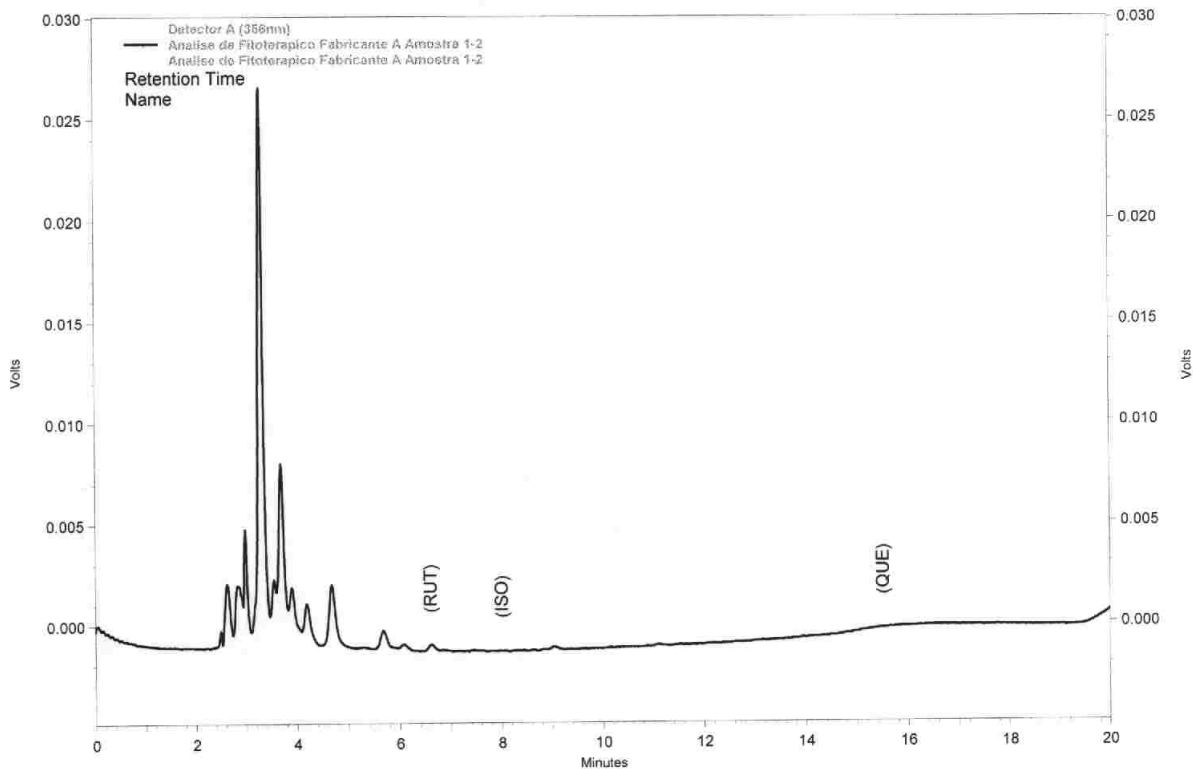
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : Analise de Fitoterapico Fabricante A Amostra 1-2

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 5/5/2012 11:28:15

Data de Impressão: 5/5/2012 16:15:32



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT			0.000 BDL
ISO			0.000 BDL
QUE			0.000 BDL

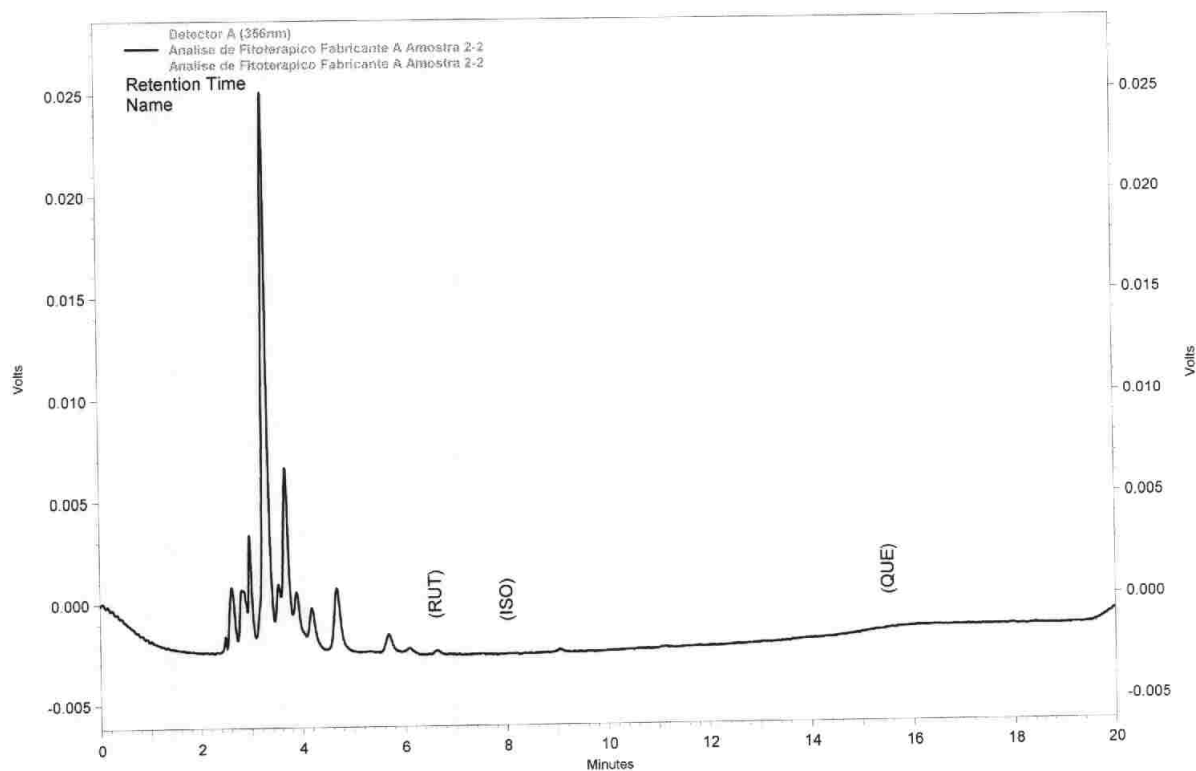
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : Analise de Fitoterapico Fabricante A Amostra 2-2

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 5/5/2012 11:50:07

Data de Impressão: 5/5/2012 16:15:39



Detector A (356nm)			
Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT			0.000 BDL
ISO			0.000 BDL
QUE			0.000 BDL

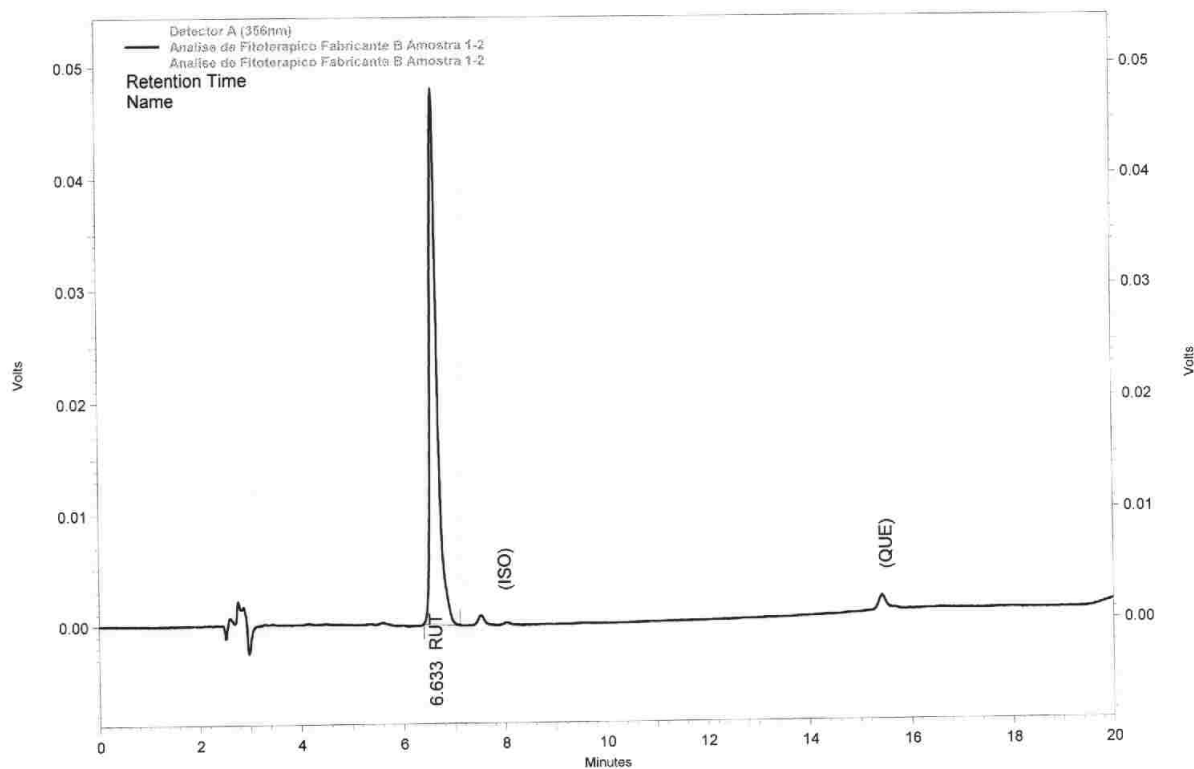
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : Analise de Fitoterapico Fabricante B Amostra 1-2

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 5/5/2012 12:15:07

Data de Impressão: 5/5/2012 16:16:05



Detector A (356nm)			
Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.633	466248	99.987
ISO			0.000 BDL
QUE			0.000 BDL

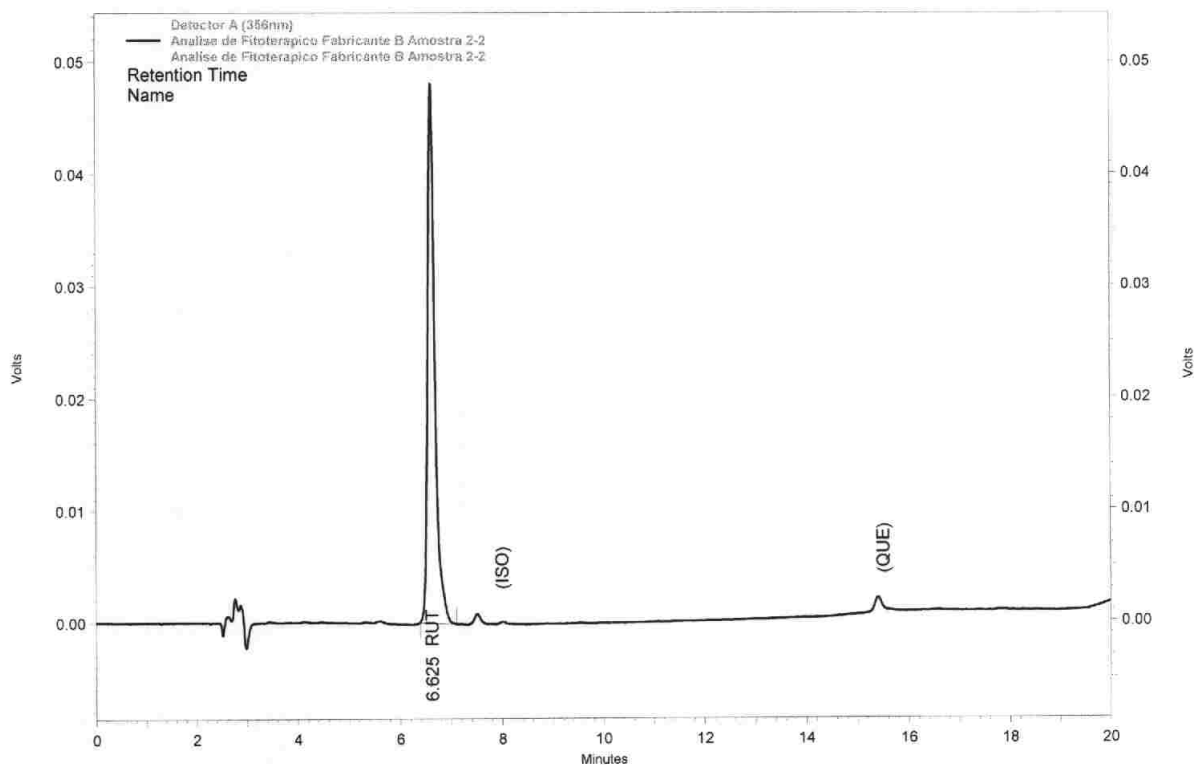
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : Analise de Fitoterapico Fabricante B Amostra 2-2

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 05/5/2012 12:42:18

Data de Impressão: 05/5/2012 16:16:23



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	6.625	466124	99.960
ISO			0.000 BDL
QUE			0.000 BDL

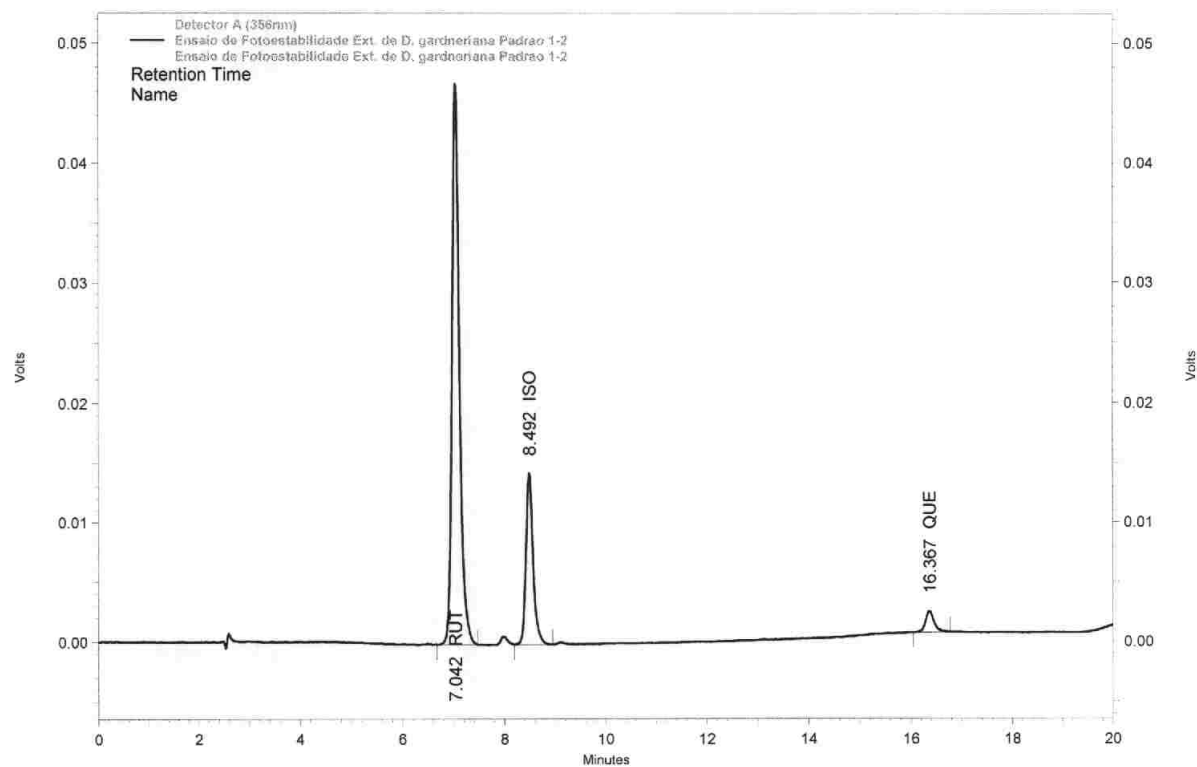
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : Ensaio de Fotoestabilidade Ext. de D. gardneriana Padrao 1-2

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/5/2012 14:57:27

Data de Impressão: 25/5/2012 17:27:07



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	7.042	467793	100.000 CAL
ISO	8.492	140017	100.000 CAL
QUE	16.367	20804	100.000 CAL

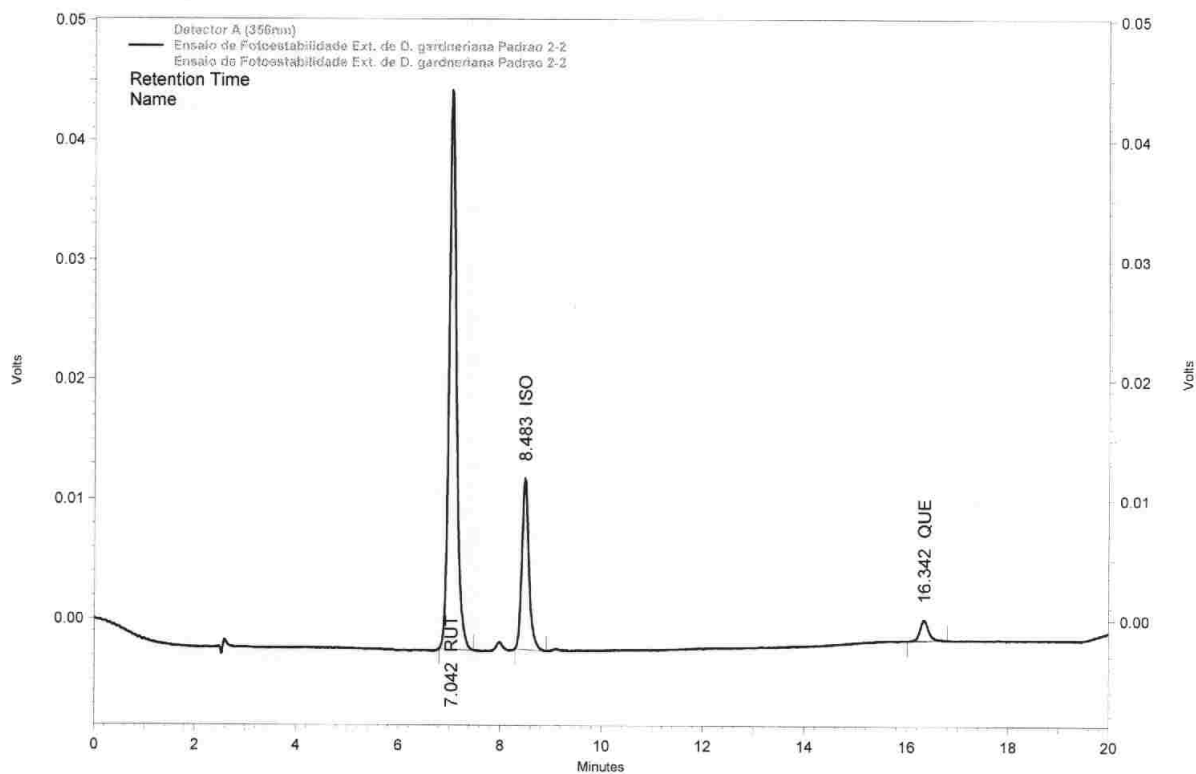
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : Ensaio de Fotoestabilidade Ext. de D. gardneriana Padrao 2-2

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/5/2012 15:18:24

Data de Impressão: 25/5/2012 17:27:22



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	7.042	465572	100.000 CAL
ISO	8.483	137690	100.000 CAL
QUE	16.342	20510	100.000 CAL

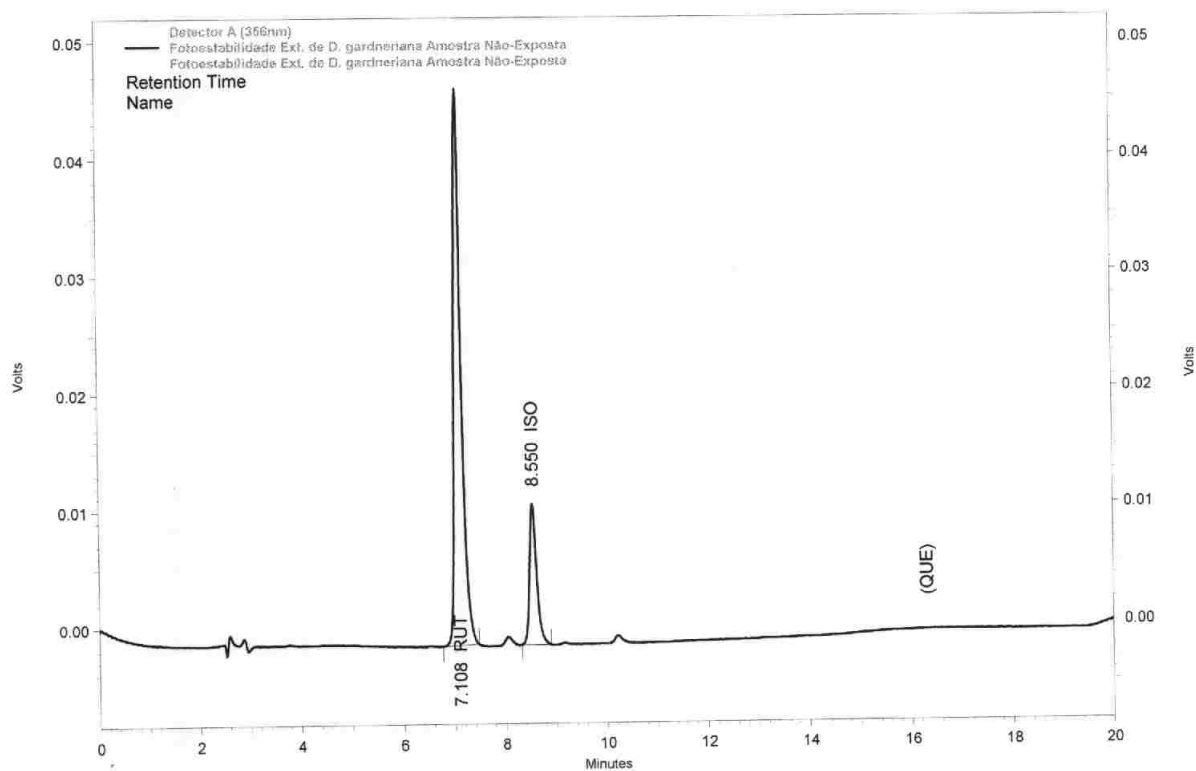
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : Fotoestabilidade Ext. de D. gardneriana Amostra Não-Exposta

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/5/2012 16:29:09

Data de Impressão: 25/5/2012 17:29:30



Detector A (356nm)			
Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	7.108	468902	100.237
ISO	8.550	115767	82.681
QUE			0.000 BDL

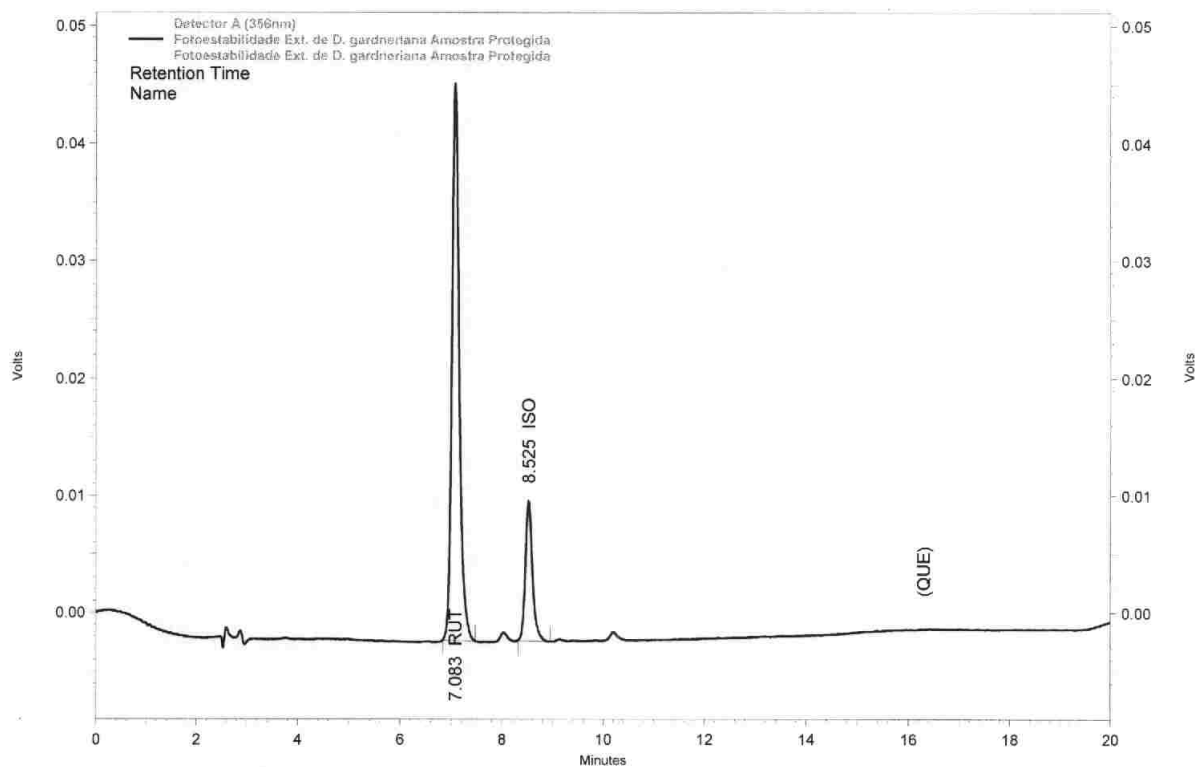
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : Fotoestabilidade Ext. de *D. gardneriana* Amostra Protegida

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/5/2012 16:05:39

Data de Impressão: 25/5/2012 17:29:03



Detector A (356nm)

Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	7.083	467995	100.043
ISO	8.525	115284	82.336
QUE			0.000 BDL

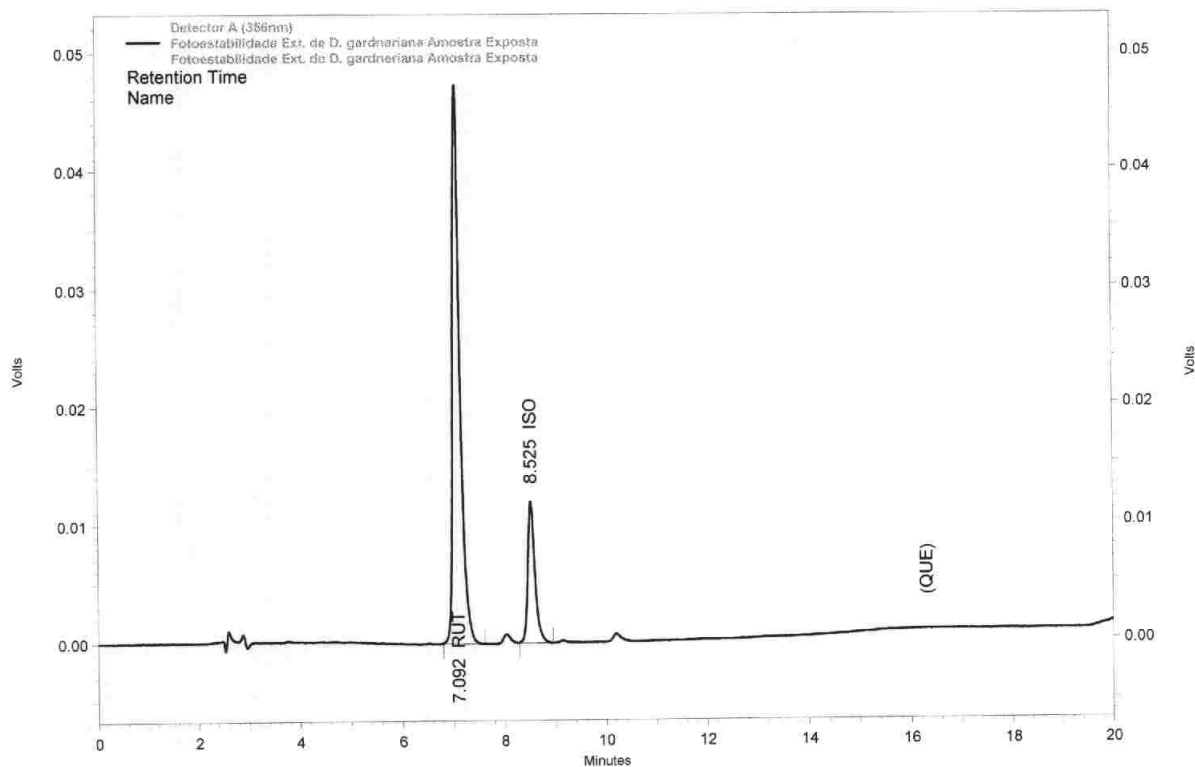
DIMORPHANDRA GARDNERIANA - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Identificação da Amostra : Fotoestabilidade Ext. de D. gardneriana Amostra Exposta

Volume de injeção : 20 µL

Data de Aquisição: 25/5/2012 15:44:11

Data de Impressão: 25/5/2012 17:28:19



Detector A (356nm)			
Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
RUT	7.092	471408	100.773
ISO	8.525	116073	82.899
QUE			0.000 BDL