

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Análise Botânica, Química e Biológica Comparativa entre Flores das Espécies
Sambucus nigra L. e *Sambucus australis* Cham. & Schlttdl. e Avaliação Preliminar da
Estabilidade

MARINA SCOPEL

PORTO ALEGRE, 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Análise Botânica, Química e Biológica Comparativa entre Flores das Espécies
Sambucus nigra L. e *Sambucus australis* Cham. & Schlttdl. e Avaliação Preliminar da
Estabilidade

Dissertação apresentada por **Marina
Scopel** para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Amélia T. Henriques

Co-orientador: Profa. Dra. Lílian A. Mentz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29 de agosto de 2005, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Edna Sayuri Suyenaga

Universidade Luterana do Brasil

Prof. Dr. Leandro Machado Rocha

Universidade Federal Fluminense

Prof^a. Dr^a. Mara Ritter

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Martin Steppe

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

S422a Scopel, Marina

Análise Botânica, Química e Biológica Comparativa entre Flores das Espécies *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltld. e Avaliação Preliminar de sua Estabilidade / Marina Scopel – Porto Alegre: UFRGS, 2005. – 263p.: il., gráf., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Sambucus nigra*. 2. *Sambucus australis*. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Sabugueiro. 5. Caprifoliaceae. I. Henriques, Amélia T. II. Mentz, Lílian A. III. Título.

CDU: 547.9:582.973

Bibliotecárias responsáveis:

Heloisa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Cláudia da Silva Gonçalves, CRB 10/1012

Este trabalho foi subvencionado pela CAPES e desenvolvido nos Laboratórios de Farmacognosia e Fitoquímica, de Controle de Qualidade e de Botânica da Faculdade de Farmácia desta Faculdade, bem como no Departamento de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

*“O maior prazer que a vida proporciona
é a superação das dificuldades,
passar de uma etapa do sucesso para a outra,
criar novos desejos e satisfazê-los”.*

SAMUEL JOHNSON

*Aos alicerces Assis e Beatriz,
a irmã Cláudia, a tia Cuca
e especialmente à nossa luz,
meu afilhado, João Victor
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por olhar por mim.

À professora Dr^a. Amélia T. Henriques por ter acreditado no meu potencial e por sua orientação.

À professora Dr^a. Lílian A. Mentz pela co-orientação e a professora Dr^a. Eliane Nunes, Msc. Márcia Vignoli, Msc. Giovana Vendruscolo pelo exaustivo e paciente trabalho botânico realizado.

Ao professor Dr. André A. Souto pelos ensinamentos na iniciação científica (PUCRS) e às professoras Dras. Clarice M. Azevedo e Renata P. Limberger pelo incentivo ao ingresso no programa de pós-graduação desta universidade.

Às companheiras de luta Ana Lúcia Arigony e Camila Sebben, aos amigos do laboratório Carolina Passos, Eduardo Konrath, Fabiane Farias, Jean Andrade, Rafaela Marin, Raquel Giordani, Roger Dresh, Rogério Petersen, Valquiria Reis, aos novos integrantes Dimas Jr., Grazielle Ramos, Letícia Pagliosa, Tiago Souza e Maria T. Kreinecker e especialmente às pacientes Ana Aboy, Melissa Schwanz e Miriam Apel. Além das amigas e vizinhas Msc. Ana Cristina Stein, Ana Paula Bernardi, Carolina Nör, Daniela Albring, Daniela Fritz, Juliana Haas, Kenia Correa, Simone Cargnin e aos Profs. Elfrides Schapoval, Gilsane von Poser e José Ângelo Zuanazzi.

Aos mestres Cláudia A. S. Pires, Nael Hamid, Paulo Artur Coelho, Tatiana Castilhos, pelo alegre acolhimento e momentos felizes vividos no laboratório.

As amigas, parceiras em momentos de descontração, ouvidoras e apoiadoras constantes Cassiana Viau, Clarissa Xavier, Fernanda Ponticelli, Kátia Verenzuck, Lisiane Fanton e ao amigo Paulo Mendes.

E àquelas pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho ou estiveram presentes ao meu lado nesta jornada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE EQUAÇÕES	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xxv
RESUMO	xxvii
ABSTRACT	xxix
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS GERAIS	5
CAPÍTULO 1 DESCRIÇÃO E ANÁLISE BOTÂNICA	9
1.1 Introdução	11
1.2 Objetivos	13
1.3 Revisão da Literatura	14
1.3.1 <i>Sambucus nigra</i> L. x <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltdl.	14
1.4 Materiais e Métodos	17
1.4.1 Material vegetal	17
1.4.2 Análise macroscópica	19
1.4.3 Análise microscópica	19
1.4.4 Testes histoquímicos	20
1.5 Resultados	22
1.5.1 Análise macroscópica	22
1.5.2 Análise microscópica	31
CAPÍTULO 2 AVALIAÇÃO QUÍMICA QUALI E QUANTITATIVA	69
2.1 Introdução	71
2.2 Objetivos	78
2.3 Revisão da Literatura	79
2.3.1 Estudos químicos em <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltdl.....	79
2.3.2 Análises cromatográficas e espectrofotométricas.....	82
2.3.3 Estudo de estabilidade.....	83
2.4 Materiais e Métodos.....	85

2.4.1 Material vegetal.....	85
2.4.2 Determinação de perda por dessecação.....	85
2.4.3 Determinação de materiais estranhos (contaminantes).....	86
2.4.4 Determinação de cinzas totais.....	86
2.4.5 Análise qualitativa.....	86
2.4.5.1 Avaliação do perfil cromatográfico utilizando cromatografia em camada delgada.....	86
2.4.5.2 Avaliação do perfil cromatográfico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.....	87
2.4.6 Análise quantitativa.....	90
2.4.6.1 Validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência.....	91
2.4.7 Determinação do teor de flavonóides totais.....	95
2.4.8 Estudo preliminar da estabilidade acelerada.....	97
2.4.9 Análises das amostras coletadas, adquiridas no comércio ou fornecidas pelo Laboratório de Farmacognosia (UFRGS).....	98
2.5 Resultados e Discussão.....	100
2.5.1 Determinação da perda por dessecação.....	100
2.5.2 Determinação de materiais estranhos (contaminantes).....	101
2.5.3 Determinação de cinzas totais.....	102
2.5.4 Análise qualitativa.....	103
2.5.5 Análise quantitativa.....	112
2.5.5.1 Validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência.....	115
2.5.6 Determinação do teor de flavonóides totais.....	124
2.5.7 Estudo preliminar da estabilidade acelerada.....	128
2.5.8 Análise das amostras coletadas, comerciais ou fornecidas pelo Laboratório de Farmacognosia (UFRGS).....	137
 CAPÍTULO 3 AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS.....	 145
3.1 Introdução.....	147
3.2 Objetivos.....	149
3.3 Revisão da Literatura.....	150
3.3.1 Gênero <i>Sambucus sp.</i>	150
3.3.2 <i>Sambucus nigra</i> L. x <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltdl.....	152
3.4 Materiais e Métodos.....	157
3.4.1 Determinação da atividade antiinflamatória <i>in vivo</i>	157

3.4.2 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	159
3.5 Resultados e Discussão.....	162
3.5.1 Atividade antiinflamatória <i>in vivo</i>	162
3.5.2 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	165
DISCUSSÃO GERAL.....	169
CONCLUSÕES.....	181
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	185
ANEXOS.....	199

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Fotografia ilustrativa de fores da espécie <i>Sambucus nigra</i> L.....	12
Figura 1.2 Fotografias ilustrativas de inflorescências da espécie <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl.....	13
Figura 1.3 <i>Sambucus nigra</i> L. - estruturas macroscópicas observadas nas flores.....	21
Figura 1.4 <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl. - estruturas macroscópicas observadas nas flores.....	25
Figura 1.5 <i>Sambucus nigra</i> L. - estruturas microscópicas observadas nas brácteas.....	35
Figura 1.6 <i>Sambucus nigra</i> L. - estruturas microscópicas observadas nas sépalas.....	37
Figura 1.7 <i>Sambucus nigra</i> L. - estruturas microscópicas observadas nas pétalas e nos filetes.....	39
Figura 1.8 <i>Sambucus nigra</i> L. - estruturas microscópicas observadas nas anteras, no receptáculo e nos pedicelos.....	41
Figura 1.9 <i>Sambucus nigra</i> L. - estruturas microscópicas observadas nos pedicelos e no pó.....	43
Figura 1.10 <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl. - estruturas microscópicas observadas nas brácteas e nas sépalas.....	51
Figura 1.11 <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl. - estruturas microscópicas observadas nas sépalas e nas pétalas.....	53
Figura 1.12 <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl. - estruturas microscópicas observadas nos estames e no receptáculo.....	55
Figura 1.13 <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl. - estruturas microscópicas observadas no pedicelo e no pó.....	57
Figura 2.1 Cromatograma de <i>Sambucus nigra</i> L. observado no comprimento de onda de 357 nm.....	99
Figura 2.2 Cromatograma de <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl. observado no comprimento de onda de 357 nm.....	100
Figura 2.3 Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE que mostram os perfis de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl.....	101
Figura 2.4 Sobreposição dos cromatogramas de substâncias de referência....	103
Figura 2.5 e 2.6 Sobreposições dos cromatogramas obtidos com soluções extrativas de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl. com o cromatograma da substância referência rutina.....	104

Figura 2.7 Representação gráfica da curva de calibração de rutina por CLAE, equação da reta e coeficiente de regressão.....	106
Figura 2.8 Cromatograma relativo a pureza do marcador químico da amostra de <i>Sambucus nigra</i> L.....	110
Figura 2.9 Cromatograma relativo a pureza do marcador químico da <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl.....	111
Figura 2.10 Curva de linearidade apresentando as equações da reta e os coeficientes de regressão para as amostras de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl.....	112
Figura 2.11 Sobreposição de cromatogramas obtidos com amostra de <i>Sambucus</i> não hidrolisada e hidrolisada.....	120
Figura 2.12 Cromatograma de amostra de <i>Sambucus</i> hidrolisada.....	120
Figura 2.13 Sobreposição dos cromatogramas das substâncias referência quercetina e canferol e cromatograma da amostra de <i>Sambucus</i> hidrolisada..	121
Figura 2.14 Cromatogramas dos extratos das amostras de <i>Sambucus nigra</i> L. submetidas à análise da estabilidade acelerada (50°C ± 90% U.R.).....	123
Figura 2.15 Cromatogramas dos extratos das amostras de <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl. submetidas à análise da estabilidade acelerada (50°C ± 90% U.R.).....	123
Figura 2.16 Perfil da redução do teor percentual de rutina obtido a partir das análises cromatográficas dos extratos obtidos de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltldl.....	124
Figura 2.17 Representação gráfica da curva de degradação, com reação de primeira ordem, para a amostra <i>Sambucus nigra</i> L.....	126
Figura 2.18 Representação gráfica da curva de degradação, com reação de segunda ordem, para a amostra <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl.....	126
Figura 2.19 Representação gráfica da curva de degradação, com reação de segunda ordem, para a amostra <i>Sambucus nigra</i> L.....	128
Figura 2.20 Análise da área dos principais picos encontrados nos cromatogramas de <i>Sambucus nigra</i> L. obtidos com a análise das amostras provenientes do estudo de estabilidade.....	130
Figura 2.21 Análise da área dos principais picos encontrados nos cromatogramas de <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl. obtidos com a análise das amostras provenientes do estudo de estabilidade.....	130
Figura 2.22 Cromatogramas das soluções extrativas das amostras de <i>Sambucus nigra</i> L. adquiridas nos anos de 2001 até 2004.....	133
Figura 2.23 Cromatogramas das soluções extrativas das amostras de <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl. adquiridas nos anos de 2003 e 2004. ...	134

Figura 2.24 Cromatogramas referentes à amostras de <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltdl. coletadas nas localidades de Veranópolis, Porto Alegre, Caxias do Sul, Santa Maria e Praia da Guarda do Embaú (SC).....	135
Figura 2.25 Sobreposição de cromatogramas referentes à diferença relativa ao comprimento dos estames encontrados em <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltdl.....	137
Figura 3.1 Efeito da administração v.o. do extrato de <i>Sambucus nigra</i> L. sobre o edema em patas de ratos induzido por carragenina.....	155
Figura 3.2 Efeito da administração v.o. do extrato de <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltdl. sobre o edema em pata de rato induzido por carragenina.....	156
Figura 3.3 “Seqüestro” do hidrato de 2,2-difenill-1-picrilhidrazila (DPPH-radical livre) por um flavonóide (agente seqüestrante).....	158
Figura 3.4 Representação gráfica comparativa de atividade antioxidante dos extratos aquosos e etanólicos de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltdl.....	159
Figura 3.5 Demonstração da atividade antioxidante de extratos de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltdl.....	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Listagem das amostras de <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltdl. e <i>Sambucus nigra</i> L. utilizadas na avaliação botânica e química.....	15
Tabela 1.2 Principais diferenças macro e microscópicas detectadas na análise das flores de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltdl.....	58
Tabela 2.1 Apresentação da definição das zonas climáticas definidas pela Organização Mundial da Saúde.....	69
Tabela 2.2 Flavonóides encontrados na constituição química das flores de <i>Sambucus nigra</i> L.....	73
Tabela 2.3 Parâmetros cromatográficos para a análise das soluções extrativas das espécies <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltdl.....	81
Tabela 2.4 Sistema gradiente linear utilizado para desenvolvimento do método de CLAE.....	82
Tabela 2.5 Parâmetros analíticos modificados para a realização do teste de robustez.....	88
Tabela 2.6 Teor de umidade de amostras de <i>Sambucus nigra</i> L. para diferenciação das análises por gravimetria e utilizando balança com radiação infravermelho.....	93
Tabela 2.7 Teor de cinzas totais para amostras de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltdl.....	96
Tabela 2.8 Valores de R _f obtidos com observação em CCD das amostras de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltdl. analisadas, e dados da literatura encontrados para <i>Sambucus nigra</i> L.....	97
Tabela 2.9 Tempos de retenção e absorvâncias obtidas com CLAE/DAD dos picos observados nos cromatogramas de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltdl.....	102
Tabela 2.10 Valores de tempo de retenção e absorvância para substâncias de referência após análises utilizando CLAE/DAD.....	103
Tabela 2.11 Análise de variância (ANOVA) para a média das curvas de calibração de rotina.....	106
Tabela 2.12 Ensaio para determinação das condições ideais de extração para <i>Sambucus nigra</i> L. utilizando os parâmetros: proporção planta:solvente, teor de orgânico no solvente extrator e método extrativo.....	107
Tabela 2.13 Ensaio para determinação das condições ideais de extração para <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltdl. utilizando os parâmetros: proporção planta:solvente, teor de orgânico no solvente extrator e método extrativo.....	107
Tabela 2.14 Análise de variância (ANOVA) para os dados de linearidade de <i>Sambucus nigra</i> L.....	113

Tabela 2.15 Análise de variância (ANOVA) para dados obtidos com o parâmetro de linearidade de <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl.....	113
Tabela 2.16 Resultados para o parâmetro de exatidão para as amostras de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl.....	114
Tabela 2.17 Valores experimentais obtidos para o parâmetro de precisão da metodologia de CLAE aplicada à soluções extrativas das amostras de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl.....	115
Tabela 2.18 Análise de amostras de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl. para verificação de precisão e repetibilidade entre as soluções extrativas.....	115
Tabela 2.19 Avaliação do parâmetro de robustez para soluções extrativas de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl.....	116
Tabela 2.20 Análise do teor de flavonóides totais, expressos em teor de quercetina para amostras de flores de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl.....	118
Tabela 2.21 Análise da estabilidade acelerada para as amostras de flores das espécies <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltldl.....	123
Tabela 2.22 Valores experimentais obtidos no estudo da estabilidade acelerada com as amostras de <i>Sambucus nigra</i> L. através do método proposto de cromatografia líquida de alta eficiência, considerando-se as diferentes ordens de reação.....	125
Tabela 2.23 Valores experimentais obtidos no estudo da estabilidade acelerada com as amostras de <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltldl., através do método proposto de cromatografia líquida de alta eficiência, considerando-se as diferentes ordens de reação.....	125
Tabela 2.24 Teores médios de rutina encontrados nas amostras comerciais e/ou fornecidas pelo laboratório, de <i>Sambucus nigra</i> L. e nas amostras coletadas de <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltldl.....	132
Tabela 3.1 Descrição dos relatos etnobotânicos e etnofarmacológicos encontrados para <i>Sambucus nigra</i> L.....	147
Tabela 3.2 Efeito da administração v.o. dos extratos de <i>Sambucus nigra</i> L....	155
Tabela 3.3 Efeito da Administração v.o. dos extratos de <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltldl.....	156
Tabela 3.4 Percentual de atividade antioxidante demonstrado pelos extratos aquosos e etanólicos de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltldl.....	159

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 2.1 Cálculo utilizado para determinação do percentual de recuperação do marcador químico.....	86
Equação 2.2 Cálculo para determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	88
Equação 2.3 Cálculo para determinação do teor percentual de quercetina.....	90
Equação 2.4 Equações de ordem zero e de segunda ordem utilizadas para o cálculo da velocidade de degradação (k) e $t_{90\%}$	126
Equação 3.1 Equação para determinação do percentual antioxidante para as amostras de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltl.....	154

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: atividade antioxidante.

ACN: acetonitrila.

CCD: cromatografia em camada delgada.

CE₅₀: concentração suficiente para obter 50% de um efeito máximo estimado em 100%.

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência.

CLAE/DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos.

DP: desvio padrão.

DPPH: hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila.

DPR: desvio padrão relativo.

k: constante de velocidade de reação.

PVDF: membrana filtrante em fluoreto de polivilideno.

SA: solução extrativa de *Sambucus australis* com concentração teórica final de 25 mg/ml.

SAA: diluição da solução extrativa SA, com concentração teórica final de 2,5 mg/ml.

SAA1: diluição da solução SAA, com concentração teórica final de 1,25 mg/ml.

SAE: solução final de acetato de etila.

SC: solução comparativa.

SL: solução metanólica de ácido acético a 5%.

SN: solução extrativa de *Sambucus nigra* com concentração teórica final de 25 mg/ml.

SNN: diluição da solução extrativa SN, com concentração teórica final de 2,5 mg/ml.

SNN 1: diluição da solução SNN, com concentração teórica final de 1,25 mg/ml

SQR: substância química de referência.

T_{90%}: valor em que a concentração da substância avaliada é 90% da concentração inicial.

TFA: ácido trifluoroacético.

UV/VIS: ultravioleta na região do visível.

R_f: razão entre a distância percorrida pela mancha relativa a componentes presentes numa mesma amostra e a distância percorrida pelo eluente na CCD.

RESUMO

Flores das espécies *Sambucus nigra*, de origem europeia, e *Sambucus australis*, nativa da América do Sul (Caprifoliaceae), denominadas sabugueiro e sabugueiro-do-brasil, respectivamente, são utilizadas popularmente sob forma de infusão, como antiinflamatórias, laxativas e para condições febris resultantes de afecções do trato respiratório. Estudos prévios para *S. nigra* indicam compostos fenólicos como principais constituintes químicos, sendo estes relacionados às principais atividades biológicas avaliadas. Objetivando comparar esta espécie com *Sambucus australis*, foram realizadas análises botânicas macro e microscópicas das flores, identificando as principais diferenças entre as espécies, tais como o número de lóculos no ovário e presença de idioblastos cristalíferos em algumas estruturas, e observando os possíveis contaminantes (pedicelos). Também foram determinados os parâmetros farmacopéicos: cinzas totais e perda por dessecação. Após a análise química, foi escolhido o flavonóide rutina como marcador das espécies, para realizar análises quantitativas nas 31 amostras adquiridas e / ou coletadas, utilizando método de CLAE previamente validado. Soluções hidroetanólicas apresentaram maior capacidade de extração do produto alvo. Os limites mínimos de rutina observados para ambas as espécies foram de aproximadamente 0,65%. Também foram quantificados, por método espectrofotométrico, os flavonóides totais expressos em quercetina, sendo 0,93% e 1,46% os teores mínimos determinados para *S.nigra* e *S. australis*, respectivamente. O estudo da estabilidade acelerada ($50^{\circ}\text{C} \pm 90\% \text{ U.R.}$), avaliando a degradação dos constituintes químicos presentes permitiu sugerir a cinética de degradação de segunda ordem para a rutina nas duas espécies. Comparações de atividades biológicas das espécies foram realizadas pelos ensaios das atividades antiinflamatória (inibição do edema em pata de rato induzido por carragenina) e antioxidante (DPPH). Os resultados para o primeiro ensaio demonstraram ação equivalente em ambas as espécies para extratos hidroetanólicos a 80% (86% de inibição) e aquosos (81%), com atividade semelhante ao padrão indometacina (~83%); para a atividade antioxidante os extratos hidroetanólicos a 80% foram mais ativos ($\text{CE}_{50} = 16 \mu\text{g/ml}$) que os aquosos ($\text{CE}_{50} = 27 \mu\text{g/ml}$) em *S. australis*, e ambos extratos, superiores ao

extrato padronizado *Gingko biloba* ($CE_{50} = 40 \mu\text{g/ml}$) e aos extratos de *S. nigra* ($CE_{50} = 50 \mu\text{g/ml}$ – hidroetanólico e $CE_{50} = 32 \mu\text{g/ml}$ – aquoso).

Palavras-chave: *Sambucus australis*, *Sambucus nigra*, cromatografia líquida de alta eficiência, estudo de estabilidade.

ABSTRACT

“Botanical, Chemical, Biological comparative analysis among flowers of Sambucus nigra L. and Sambucus australis Cham. & Schlttdl. species and preliminar stability evaluation”.

Sambucus nigra (from Europe) and *Sambucus australis* (from South America) flowers (Caprifoliaceae), called sabugueiro and sabugueiro-do-brazil, respectively, are used in the folk medicine as anti-inflammatory, laxative and for respiratory diseases. Previous studies for *S. nigra* indicate phenolic compounds as the main chemical constituents, being related for these ones the biological activities reported. In order to compare this species with *S. australis* macro and microscopical analysis of the flowers were carried out to identify the major differences between the species, such as the number of ovary locules and idioblasts in some structures, verifying the possible contaminants (pedicels). The following Pharmacopoeia parameters were also determined: total ash and loss on drying. After the chemical analysis, it was chosen the rutin flavonol as the mark constituent for both species, to carry through quantitative analysis of the 31 acquired and/or collected samples, by previously validated HPLC method. Hydroethanolic solutions had shown greater capacity of extraction of the target product. The minimum limits of rutin observed for both species had been of approximately 0.65%. The total flavonoid content was also quantified by spectrophotometer method, being expressed as quercetin, finding 0.93% and 1.46% the minimum values for *S. nigra* and *S. australis*, respectively. The accelerated stability test (50 °C ± 90% UR) that evaluate the degradation of the constituents, allowed to verify a kinetic degradation of second order for rutin in both species. Comparison of biological activities of these species was carried out using the antiedematogenic (rat paw edema) and antioxidant (DPPH) activities. The results for the first test showed an equivalent action for the hydroethanolic (86% of edema inhibition) and aqueous (81%) extracts, exhibiting a similar activity to indometacin (~83%). For the antioxidant activity, the ethanolic extracts (CE₅₀ = 16 µg/ml) were more active than the aqueous (CE₅₀ = 27 µg/ml) for *S. australis*, and, both extracts were superiors to the *Ginko biloba* (CE₅₀ = 40 µg/ml) and to the *S. nigra* extracts (CE₅₀ = 50 µg/ml – hydroethanolic and CE₅₀ = 32 µg/ml - aqueous).

Palavras-chave: *Sambucus australis*, *Sambucus nigra*, HPLC, stability study.

INTRODUÇÃO GERAL

Os produtos naturais são largamente reconhecidos pela grande diversidade estrutural bem como sua ampla faixa de atividade farmacológica. Aproximadamente 30 % dos medicamentos mais vendidos no mundo são produzidos a partir de produtos obtidos de matérias-primas vegetais (STROHL, 2000).

Um fator limitante para uma maior utilização de plantas como matéria-prima pelas indústrias é que sua maioria não possui descrição em códigos oficiais (formulários e farmacopéias), não havendo inclusive estudos científicos adequados sobre muitas delas. Dentro deste restrito número pode-se citar que 324 estão descritas na Farmacopéia Alemã, 60 na Cooperativa Européia Científica de Fitoterapia, 13 na Farmacopéia Americana, 60 na Organização Mundial da Saúde e apenas 24 na Farmacopéia Brasileira (TOLEDO *et al.*, 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, entre as especificações necessárias para controle efetivo e garantia de produtos fitoterápicos, encontram-se aquelas relativas à qualidade e integridade do material de partida, em sentido restrito: da matéria-prima vegetal, com relevância para a correta identificação da espécie de interesse, suas características quanto ao cultivo, condições da coleta, fatores edafoclimáticos e região de origem (WHO, 1993).

A qualidade exigida e a disponibilidade de matérias-primas para a fabricação de fitoterápicos são fatores de estrangulamento para a indústria farmacêutica, fato que não é observado em relação aos produtos sintéticos. Enquanto milhares de estudos clínicos são realizados (fase II e III) com estes últimos, poucos fitoterápicos foram objeto de estudos clínicos duplo-cegos, aleatórios e bem controlados, de acordo com padrões aceitos internacionalmente (CALIXTO, 2001a).

Neste contexto, onde os estudos sobre composição química e avaliação de atividades biológicas que validem a utilização de uma variedade de insumos industriais são relativamente escassos, o estudo de parâmetros de qualidade e estabilidade de matérias-primas vegetais para que seja assegurada a produção de fitoterápicos com qualidade, são ainda mais raros. Assim, um conjunto de aspectos são relevantes e devem ser avaliados. Entre estes estão a análise botânica para

verificação de possíveis contaminantes, o desenvolvimento de metodologias confiáveis que permitem a quantificação de marcadores químicos, para a provável utilização destes no desenvolvimento de medicamentos, alguns ensaios biológicos que auxiliem na escolha de doses preliminares e estudos da estabilidade visando a determinação do prazo de utilização dos produtos desenvolvidos.

Por estes motivos, foram selecionadas as espécies *Sambucus nigra*, de origem europeia, estudada e mundialmente comercializada na forma de pó ou cápsulas em associação com os frutos e *in natura* para o preparo de infusões e *Sambucus australis*, nativa de nosso País, pouco investigada. Sabe-se que, popularmente, as flores de ambas as espécies são indicadas principalmente para condições febris resultantes de afecções do trato respiratório, como antiinflamatórias e laxativas; e são muitas vezes confundidas ou substituídas uma pela outra, devido a ausência de aprofundados estudos comparativos. Sendo assim, este trabalho visa a realização um estudo comparativo no âmbito botânico, químico e farmacológico para as espécies supramencionadas.

OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar comparativamente as espécies *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. quanto aos seguintes aspectos:

- **Botânicos:**

- descrição macro e microscópica das flores das espécies;
- descrição microscópica dos elementos constituintes dos pós obtidos e dos elementos contaminantes das espécies;

- **Químicos:**

- Avaliação qualitativa e determinação do marcador químico;
- escolha do método extrativo;
- determinação de métodos para análise quantitativa;
- análise de amostras adquiridas e/ou coletadas em diversas localidades;
- estudo preliminar da estabilidade das flores;

- **Biológicos:**

- avaliação da atividade antiinflamatória e antioxidante.

CAPÍTULO 1
DESCRIÇÃO E ANÁLISE BOTÂNICA

1.1 INTRODUÇÃO

Na primeira etapa da investigação fitoquímica, a coleta do material vegetal, bem como a correta preparação de exsicatas são essenciais para a identificação botânica. Estas exsicatas servirão de contraprova para a identificação de uma determinada espécie no momento que existam dúvidas quanto à sua classificação botânica. Assim, a seleção do material coletado deve ser cuidadosa, evitando partes do vegetal afetadas por doenças, parasitas e também materiais estranhos, tais como outras plantas ou mesmo partes da própria planta que não sejam de interesse para a investigação (FALKENBERG *et al.*, 2002).

O principal objetivo da realização de estudos botânicos é a identificação inequívoca de uma espécie vegetal, através da análise de características anatômicas e morfológicas, procurando destacar aquelas consideradas peculiares de uma determinada espécie e que, em última instância, estejam presentes na matéria-prima vegetal. Da mesma forma, é importante o estabelecimento de características botânicas comparativas que permitam detectar a presença de uma ou mais espécies adulterantes (SONAGLIO *et al.*, 2002; TOLEDO *et al.*, 2003), garantindo a originalidade do material que está sendo trabalhado.

Ensaio macro e microscópico são ferramentas importantes para a certificação de autenticidade da matéria-prima vegetal manipulada, aliados também às características organolépticas. No que tange às análises microscópicas, percebe-se sua importância quando o material vegetal encontra-se na forma de pó, podendo assim certificar-se da pureza e garantir a qualidade da amostra analisada. Posteriormente a estes ensaios, a realização de análises fitoquímicas auxiliará na identificação de grupos de substâncias químicas presentes na espécie vegetal e de possíveis contaminantes, quando estes não são detectados a olho nu ou através de microscopia.

Uma espécie identificada erroneamente pode resultar em medicamento fitoterápico inócuo ou até em intoxicação quando a mesma for tóxica. Igualmente, o cultivo em solo ou clima inadequado, bem como o uso de pesticidas podem gerar

uma planta com modificações quanto ao teor dos princípios ativos responsáveis pelas atividades biológicas. Coleta do material vegetal realizada na época e de forma adequada e o armazenamento incorreto podem comprometer a constituição química ou causar contaminação por microorganismos, causando intoxicações na população. Por fim, a utilização errônea das plantas ou o emprego de técnicas inadequadas de conservação e preparo pode prejudicar a constituição química final ou causar efeitos adversos, indicando a necessidade de estudos morfo-anatômicos aprofundados.

1.2 OBJETIVOS

Análise botânica das flores das espécies *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltl. com objetivos:

- descrição macroscópica ;
- descrição microscópica;
- descrição microscópica dos elementos constituintes dos pós obtidos das espécies;
- avaliação dos caracteres botânicos dos elementos contaminantes.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 *Sambucus nigra* L. x *Sambucus australis* Cham. & Schltl.

A família Caprifoliaceae (*sensu lato*) compreende 18 gêneros e 450 espécies, distribuídas principalmente nas regiões temperadas do Hemisfério Norte (Europa, América do Norte, oeste e centro da Ásia, e norte da África), com uma menor distribuição no Hemisfério Sul (HEYWOOD, 1993). O único gênero com espécies nativas na América do Sul é *Sambucus*, com duas espécies (DIMITRI, 1980), *Sambucus peruviana* Kunth, que ocorre no nordeste da Argentina e na Região Andina da América do Sul, na América Central até o México e *Sambucus australis* Cham. & Schltl., ocorrendo da Região Sudeste até o Rio Grande do Sul, no Brasil, e no Paraguai, Argentina e Uruguai (BACIGALUPO, 1974; REITZ, 1985). Os demais gêneros encontrados no país foram introduzidos e são atualmente cultivados (*Abelia*, *Lonicera* e *Viburnum*), ou esporadicamente assilvestrados (BARROSO, 1986; REITZ, 1985). Autores recentes sugerem que o gênero *Sambucus* seja realocado para a família Sambucaceae (TAKHTAJAN, 1997), ou para Adoxaceae (JUDD *et al.*, 1999), enquanto outros ampliam a circunscrição de Caprifoliaceae (APG II, 2003).

O gênero *Sambucus* possui cerca de 25 espécies (REITZ, 1985). Entre estas, destacam-se *Sambucus canadensis* L. (American Elder), *Sambucus ebulus* L. (Dwarf Elder), *Sambucus nigra* L. (Black Elder, European Elder) e *Sambucus australis* Cham. & Schltl. (sabugueiro-do-rio-grande, sabugueiro-do-brasil). As duas últimas espécies são referidas como medicinais e possuem origens distintas, *Sambucus nigra* é uma espécie europeia e *Sambucus australis* é nativa. Ambas possuem as flores como farmacógeno e são comercializadas principalmente na forma de chás, no Brasil. A espécie mais difundida é *Sambucus nigra*, encontrada também em outros países em preparações farmacêuticas e homeopatia. Estas duas espécies são o objetivo deste trabalho e estão descritas a seguir.

Sambucus nigra L. (sabugueiro) é uma árvore ou arbusto muito ramificado, de até 7,0 m de altura e copa globosa. As folhas são pecioladas, opostas,

imparipinadas, compostas de 3 a 7 (raro até 11) folíolos elípticos, fracamente assimétricos, membranosos, de 5,0 a 12,0 cm de comprimento, finamente dentados na margem, agudos no ápice, glabros. As estípulas são sésseis, e geralmente caducas. As flores são amareladas ou brancas, pequenas, dispostas em amplas cimeiras corimbosas terminais, monoclinas, diclamídeas, pentâmeras ou tetrâmeras, actinomorfas. O androceu é formado por quatro ou cinco estames epipétalos. O gineceu é formado, em regra, por três carpelos soldados entre si, com três lóculos e três rudimentos seminiais, de placentação axial. Em algumas inflorescências ocorre predominância de flores tetrâmeras. O fruto é negro, elíptico, com cerca de 7,0 mm de diâmetro (Figura 1.1) (PERROT, 1944; PLANCHON *et al.*, 1946; PARIS & MOYSE, 1971; DIMITRI, 1980, BRITISH, 1996; CZYGAN *et al.*, 2001; WHO, 2001).

Sambucus australis Cham. & Schldl. (sabugueiro-do-brasil, sabugueiro-do-rio-grande), é um arbusto muito ramificado, ou uma arvoreta, de até 4,0 m de altura, raramente mais e copa irregular. As folhas são pecioladas, opostas, imparipinadas, compostas de 7 (raro 5) a 13 folíolos ovalado-lanceolados, assimétricos, membranosos, de 4,0 a 7,5 cm de comprimento, finamente serreados na margem, acuminados no ápice, glabros. As estípulas são sésseis na base do pecíolo, obovaladas, dentadas na margem, caducas. As flores são brancas a branco-amareladas, pequenas, dispostas em amplas cimeiras corimbosas terminais, morfologicamente monoclinas, diclamídeas, pentâmeras ou tetrâmeras, actinomorfas. O androceu é formado por quatro ou cinco estames epipétalos, que podem apresentar filetes curtos (denominadas pistiladas) ou longos (denominadas estaminadas) (Figura 1.2). O gineceu é formado, em regra, por cinco carpelos soldados entre si, com cinco lóculos e cinco rudimentos seminiais de placentação axial. Em algumas inflorescências ocorre uma predominância de flores tetrâmeras. O fruto é negro, ovalado a globoso, com 6,0 a 7,5 mm de diâmetro (MUELLER, 1885; CABRERA, 1965; BACIGALUPO, 1974; DIMITRI, 1980; REITZ, 1985; ALICE *et al.*, 1990).



Figura 1.1 Fotografia ilustrativa de flores da espécie *Sambucus nigra* L.

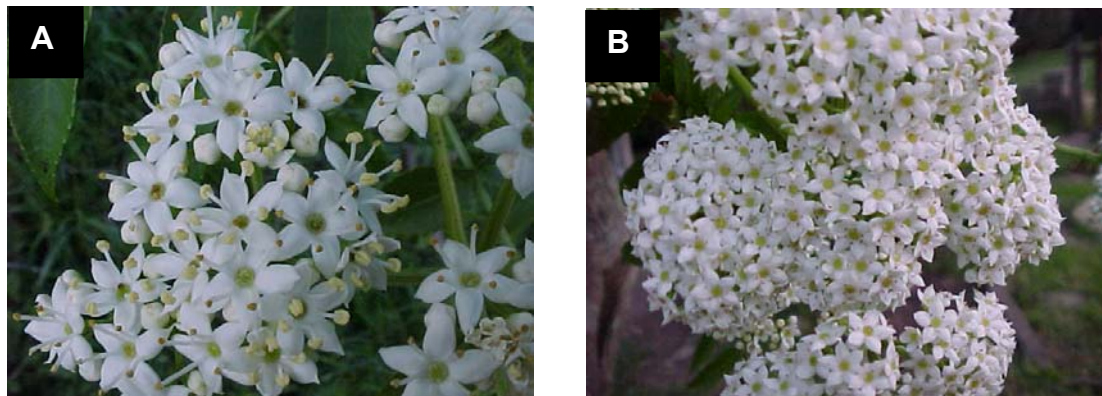


Figura 1.2 Fotografia ilustrativa de inflorescências da espécie *Sambucus australis* Cham. & Schtdl.

As diferenças encontradas entre *Sambucus nigra* e *Sambucus australis* são muito discretas. Ambas são arbustivas a arbóreas. *Sambucus nigra* se caracteriza por apresentar, em regra, folhas com 5 a 7 folíolos, de bordo dentado, enquanto que *Sambucus australis* tem folhas com 7 a 13 folíolos, ou mais, raramente, cinco folíolos, de bordo serrado (DIMITRI, 1980; REITZ, 1985). As inflorescências, nas duas espécies, são cimeiras corimbosas terminais, com flores muito semelhantes entre si, diferindo principalmente no número de lóculos existentes no ovário. Em *Sambucus nigra* os estames têm filetes de tamanho igual em todas as flores da inflorescência, enquanto que em *Sambucus australis* ocorrem flores com estames de filetes curtos (Figura 1.2 – B) e de filetes longos (Figura 1.2 – A). *Sambucus nigra* apresenta predominantemente 3 lóculos no ovário, enquanto que em *Sambucus australis* ocorrem principalmente 5 lóculos no ovário.

1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

1.4.1 Material vegetal

Para a análise de *Sambucus nigra* foram adquiridas no comércio ou fornecidas pelo laboratório de Farmacognosia desta Faculdade, um total de 13 amostras secas, datadas de 2001 à 2004 (Tabela 1.1). Para *Sambucus australis* foram coletadas inflorescências de 18 indivíduos, em diferentes localidades do estado do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Viamão, Caxias do Sul, Veranópolis e Santa Maria) e no estado de Santa Catarina (Praia da Guarda do Embaú / município de Palhoça) (Tabela 1.1).

O material coletado em maior quantidade foi depositado, um testemunho, no herbário ICN da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob os números 157497-157499, 157501, 157502 e 157504-157506, o testemunho da amostra adquirida no município de Santa Maria está localizado no Herbário do Departamento de Farmácia Industrial (HDFI) da Universidade Federal de Santa Maria sob a pasta número 136 (Tabela 1.1).

O material foi identificado, utilizando-se como caráter o número de lóculos no ovário, predominantemente três para *Sambucus nigra* e cinco para *Sambucus australis*. Para esta última espécie foi observado também o comprimento dos filetes dos estames presentes nas flores, sendo denominadas flores estaminadas, as de filetes longos e pistiladas as de filetes curtos.

Tabela 1.1 Listagem das amostras de *Sambucus australis* Cham. & Schldl. e *Sambucus nigra* L. utilizadas na avaliação botânica e química.

Espécie	Nº.	Local da coleta / origem	Característica da flor*	Ano de coleta	Identificação no herbário
<i>Sambucus australis</i>	1	Viamão	E	2003	-
	2	Viamão	E	2003	-
	3	Viamão	E	2003	ICN 137505
	4	Porto Alegre	E	2003	ICN 137506
	5	Caxias do Sul	E	2003	-
	6	Caxias do Sul	P	2003	-
	7	Caxias do Sul	E	2003	ICN 137501
	8	Caxias do Sul	E	2003	-
	9	Caxias do Sul	E	2003	ICN 137502
	10	Caxias do Sul - Interior	E	2003	ICN 137497
	11	Caxias do Sul - Interior	P	2003	ICN 137498
	12	Caxias do Sul - Interior	E	2004	-
	13	Caxias do Sul - Interior	P	2004	-
	14	Veranópolis	E	2003	ICN 137499
	15	Veranópolis	E	2004	-
	16	Santa Maria	P	2004	HDFI 136
	17	Santa Maria	E	2004	HDFI 136
	18	Praia da Guarda do Embaú	E	2005	ICN 137504
<i>Sambucus nigra</i>	19	A 1 - LF	E	2001	-
	20	A 2 - LF	E	2001	-
	21	A 3 - LF	E	2001	-
	22	A 4 - LF	E	2001	-
	23	A 5 - LF	E	2002	-
	24	A 6 - LF	E	2002	-
	25	A 7 - LF	E	2002	-
	26	A 8 - LF	E	2003	-
	27	A 9 - AC	E	2003	-
	28	A 10 - LF	E	2003	-
	29	A 11 - AC	E	2003	-
	30	A 12 - AC	E	2003	-
	31	A 13 - LF	E	2004	-

* Pistilada – P / Estaminada – E

LF – Laboratório de Farmacognosia

AC – Adquiridas no comércio

1.4.2 Análise macroscópica

A análise macroscópica foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópico (lupa), WILLD (modelo M5A) e as ilustrações foram feitas com câmara clara acoplada ao microscópio estereoscópico ZEISS. A matéria-prima adquirida no comércio, portanto já seca, passou por um processo de hidratação, com líquido de hidratação e aquecimento, quando necessário, para facilitar o manuseio do material.

- Líquido para hidratação:

Etanol comercial	80 ml
Glicerina	20 ml
5 gotas de detergente	
Água destilada	q.s.p. 200 ml

O material coletado foi analisado fresco ou conservado em solução etanólica 70% (água:etanol, 30:70) para posterior análise.

Também foram analisados macroscopicamente os possíveis contaminantes presentes nas amostras que, de acordo com os compêndios europeus (EUROPEAN, 2002; FARMACOPÉIA, 2002), para *Sambucus nigra* podem apresentar pedicelos grosseiros e flores escurecidas. A determinação dos limites permitidos para a presença destes materiais estranhos nas amostras analisadas estão presentes no Capítulo 2.

1.4.3 Análise microscópica

Para a análise microscópica, as peças florais da matéria-prima fresca ou hidratada (em água quente ou utilizando líquido de hidratação), foram destacadas, montadas em lâmina e lamínula, com água, e observadas ao microscópio óptico Olympus CB. Quando a hidratação das flores secas não foi suficiente para obtenção de um material adequado para a visualização de todas as estruturas desejadas, as amostras foram diafanizadas, tornando-as semi-transparentes, possibilitando melhor

análise. Para este procedimento preparou-se uma solução com hipoclorito de sódio e água destilada (1:1, v/v).

As melhores lâminas foram montadas em lâmina e lamínula, com gelatina glicerinada (lâminas semi-permanentes) e lutadas com esmalte incolor.

- Gelatina glicerinada:

Água 30 ml
Gelatina incolor 5 g
Glicerina 35 ml
5 gotas de fenol dissolvidas em 10 gotas de água

Estas lâminas semi-permanentes serviram para a análise em microscopia óptica e elaboração das ilustrações, as quais foram feitas com auxílio de câmara clara acoplada.

Brácteas, pedicelo, receptáculo, sépalas, pétalas, androceu e gineceu foram seccionados transversalmente e tangencialmente, a mão livre, para análise; também foram feitas observações em vista frontal da epiderme de algumas peças e tricomas.

O pó de algumas das amostras adquiridas foi analisado ao microscópio óptico, utilizando hidrato de cloral. O material deve corresponder a todas as exigências estabelecidas para a espécie, exceto os caracteres macroscópicos.

1.4.4 Testes histoquímicos

Testes histoquímicos, para detectar lipídios (SASS, 1951; GERLACH, 1984) e amido (FOSTER, 1949), foram realizados, utilizando-se as metodologias sugeridas por ARGÜESO (1986), KRAUS & ARDUIN (1997), WHO (1998), FARIAS (2002) e Farmacopéia Brasileira 4 ed. (1988).

AMIDO - Adicionou-se uma gota de Reativo de Lugol (ou de solução de iodo) e observou-se a coloração adquirida pelo corte histológico, que deve ser azul ou violeta, para a presença de amido.

LIPÍDIOS – Adicionou-se uma gota de Sudan III (SASS, 1951) ou Sudan IV (GERLACH, 1984), aguardou-se dez minutos e, em seguida, lavou-se o corte histológico com solução etanólica 70% (água:etanol, 30:70). Observou-se a coloração laranja-avermelhada na presença de lipídios, e também cutina e suberina.

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Análise macroscópica

Inicialmente foram avaliadas as características organolépticas para as espécies estudadas. As flores secas das amostras de *Sambucus nigra* apresentaram um odor agradável adocicado, concordando com a descrição encontrada em BRITISH (1996), WHO (1998), CZYGAN e colaboradores (2001) bem como o sabor doce encontrado.

Nas flores secas de *Sambucus australis* o odor pareceu muito similar com o encontrado para a outra espécie, porém, mais acentuado. Relacionado ao sabor, a doçura foi mais acentuada.

***Sambucus nigra* L.**

As flores secas, amareladas pela dessecação são pentâmeras ou tetrâmeras, diclamídeas, gamopétalas, actinomorfas, com 3,0 a 5,0 mm de diâmetro, completas, monoclinas (Fig. 1.3-A e Fig. 1.3-B) e apresentam, cada uma delas, até três diminutas brácteas, distribuídas uma ou duas na base do cálice e uma ou duas no corpo do pedicelo, ou uma no receptáculo e duas no corpo do pedicelo em diferentes alturas, ou todas ao longo do pedicelo em diferentes alturas, visíveis com lente de aumento; de coloração verde e com variadas formas, como elípticas (Fig. 1.3-G1, a-e) a obovado-elípticas (Fig. 1.3-G5, a-b), oblongas (Fig. 1.3-G2), laminares (Fig. 1.3-G3) ou triangulares (Fig. 1.3-G4), pouco papilosas. Estas peças medem 0,5 mm de largura e 0,6 a 1,5 mm de comprimento e possuem tricomas tectores (Fig. 1-G1, c) distribuídos por toda a lâmina ou restritos a margem basal da face adaxial, e os tricomas glandulares (Fig. 1-G1, b), ambos com ampla variabilidade de formas. Não é observada proeminência apical nestas estruturas.

Os botões florais são globosos, em todos os estágios de desenvolvimento, esbranquiçados ou amarronzados, medem 1,5 a 3,0 mm de diâmetro.

O cálice é formado por sépalas esbranquiçado-amareladas, esverdeadas ou amarronzadas, triangulares (Fig. 1.3-E), medem 0,5 a 1,2 mm de comprimento e 0,5 a 0,7 mm de largura na porção basal, levemente soldadas entre si na base. Estas peças apresentam dentes marginais unicelulares e tricomas tectores distribuídos na margem e na base da face adaxial, onde também são observados tricomas glandulares, de variados tipos, visíveis com lente de aumento. A corola é rotácea (Fig. 1.3-A), branco-amarelada a amarelo-claro, de pré-floração imbricada, com pétalas soldadas entre si na base em um curto tubo. As pétalas são ovaladas a elípticas (Fig. 1.3-A e Fig. 1.3-C), de ápice retrorso, arredondado, medindo 2,0 a 3,5 mm de comprimento e 2,0 a 3,0 mm de largura. A corola desprende-se com facilidade e apresenta aspecto de estrela (Fig. 1.3-C), sendo comum nas flores secas a aderência das sépalas ao gineceu.

O androceu é formado por cinco ou quatro estames, dispostos alternadamente às pétalas (Fig. 1.3-A), com filetes aderidos ao tubo da corola. As anteras (Fig. 1.3-F) são ditecas, extrorsas, dorsifixas, oblongas, deiscentes, de coloração amarela, com 1,0 mm de comprimento. Os filetes são glabros e cilíndricos medem de 1,0 a 1,5 mm de comprimento.

A flor possui ovário ínfero, soldado ao tubo calicino, tricarpelar, raro tetracarpelar, trilocular, raro tetralocular, com carpelos bem demarcados nas flores secas, com um rudimento seminal por lóculo, de placentação axial. Um curto estilete, e estigma trilobado é observado no gineceu globoso e papiloso (Fig. 1.3-D). Os lobos estigmáticos obtusos apresentam três proeminências em cada um. Um disco anelado e proeminente ocorre ao redor do gineceu.

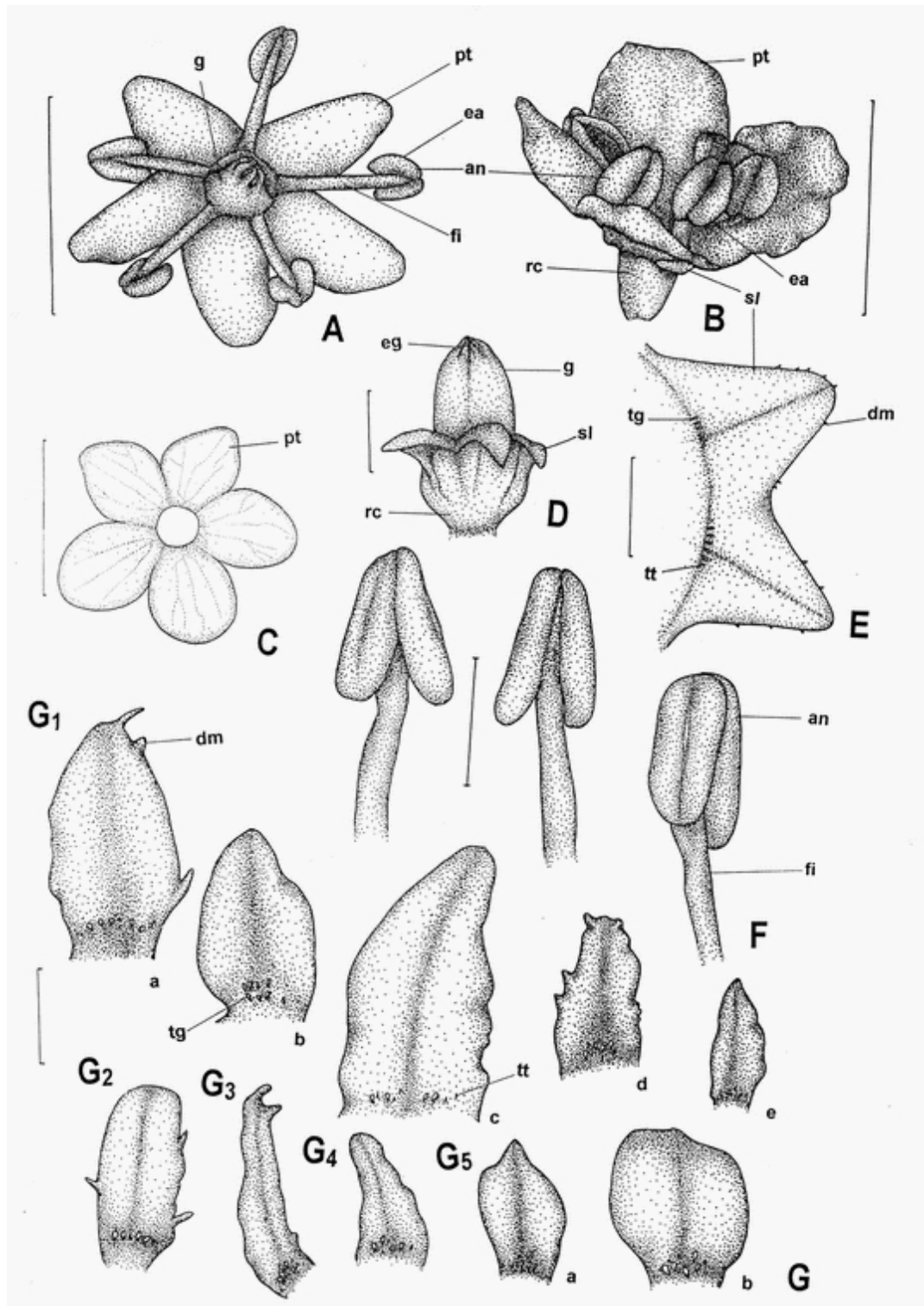


Figura 1.3 *Sambucus nigra* L. - estruturas macroscópicas observadas nas flores. **A.** aspecto geral da flor, em vista frontal; **an:** antera; **ea:** estame; **fi:** filete; **g:** gineceu; **pt:** pétala; **B.** aspecto geral da flor, em vista lateral; **an:** antera; **ea:** estame; **rc:** receptáculo; **pt:** pétala; **sl:** sépala; **C.** aspecto geral da corola desprendida, em vista frontal; **pt:** pétala; **D.** aspecto geral do gineceu, do receptáculo e do cálice, em vista lateral: **eg:** estigma; **g:** gineceu; **rc:** receptáculo; **sl:** sépala; **E.** aspecto geral de parte do cálice, mostrando a face adaxial de duas sépalas, em vista frontal; **dm:** dente marginal; **sl:** sépala; **tg:** tricoma glandular; **tt:** tricoma tector; **F.** aspectos gerais de estames em diferentes posições laterais; **an:** antera; **fi:** filete; **G.** aspectos gerais da face adaxial de brácteas, em vista frontal, evidenciando suas distintas formas; **G1.** a-e) brácteas elípticas; **G2.** bráctea oblonga; **G3.** bráctea laminar; **G4.** bráctea triangular; **G5.** a-b) brácteas obovado-elípticas; **dm:** dente marginal; **tg:** tricoma glandular; **tt:** tricoma tector. As réguas correspondem em **A** e **B** a 3 mm; em **C** a 5 mm, em **D** e **E** a 1,0 mm; em **F** a 0,5 mm; **G** a 0,4 mm.

***Sambucus australis* Cham. & Schlttdl.**

As flores secas, amareladas pela dessecação, são pentâmeras ou tetrâmeras, diclamídeas, gamopétalas, actinomorfas, com 7,0 a 10,1 mm de diâmetro, completas, funcionalmente unissexuais, isto é, estaminadas, com estames longos (Fig. 1.4-A) ou pistiladas, com estames curtos (Fig. 1.4-B), e apresentam, cada uma, três diminutas brácteas (Fig. 1.4-C), distribuídas uma ou duas na base do cálice e uma ou duas no corpo do pedicelo, ou uma no receptáculo e duas no corpo do pedicelo em diferentes alturas, ou todas ao longo do pedicelo em diferentes alturas, visíveis com lente de aumento, de coloração verde e com variadas formas, como triangulares (Fig. 1.4-H1), elípticas (Fig. 1.4-H2, a-b) ou oblongas (Fig. 1.4-H3, a-b) e, muitas vezes apresentam uma proeminência no extremo apical. O bordo das brácteas é revoluto quando triangulares, estas são papilosas, com as papilas visíveis com lente de aumento. Estas peças medem 0,5 a 0,6 mm de largura e 0,9 a 2,8 mm de comprimento, e possuem tricomas tectores e glandulares de diferentes formas, na porção basal da face adaxial.

Os botões florais são globosos, em todos os estágios de desenvolvimento, esbranquiçados ou amarronzados, medem 1,0 a 3,0 mm de diâmetro.

O cálice é formado por sépalas amarelo-esverdeadas, triangular-ovaladas (Fig. 1.4-E), e medem 1,0 a 1,5 mm de comprimento e 1,0 mm de largura na porção basal, levemente soldadas entre si na base, encontrando tricomas tectores e glandulares abundantes na porção basal da face adaxial. A corola é rotácea (Fig. 1.4-A), branca a branco-amarelada, de pré-floração imbricada, com pétalas soldadas entre si na base em um curto tubo. As pétalas são ovaladas a elípticas (Fig. 1.4-F), de ápice retrorso, medindo 2,5 a 5,0 mm de comprimento e 1,5 a 3,0 mm de largura. No material fresco a corola se desprende com facilidade que apresenta aspecto de estrela de cinco pontas (Fig. 1.4-F). Algumas corolas apresentam apenas pétalas, devido ao desprendimento dos estames.

O androceu é formado por cinco ou quatro estames, curtos ou longos, dispostos alternadamente às pétalas (Fig. 1.4-A), com filetes aderidos ao tubo da

corola. As anteras (Fig. 1.4-G) são ditecas, extrorsas, dorsifixas, oblongas, deiscentes nas flores estaminadas e indeiscentes nas flores pistiladas, de coloração amarela, com 1,0 mm de comprimento. Os filetes são glabros e cilíndricos, curtos nas flores pistiladas com 1,0 a 2,0 mm de comprimento enquanto que longos nas flores estaminadas, com 3,0 a 4,0 mm de comprimento.

A flor possui ovário ínfero, soldado ao tubo calicino, pentacarpelar ou tetracarpelar, raro tricarpelar, pentalocular ou tetralocular, raro trilocular, com carpelos bem demarcados nas flores secas, com um rudimento seminal por lóculo, de placentação axial. Um curto estilete, e estigma pentalobado é observado no gineceu globoso, papiloso (Fig. 1.4-D). Os lobos estigmáticos apresentam três proeminências em cada um. Disco anelado proeminente é visível ao redor do gineceu.

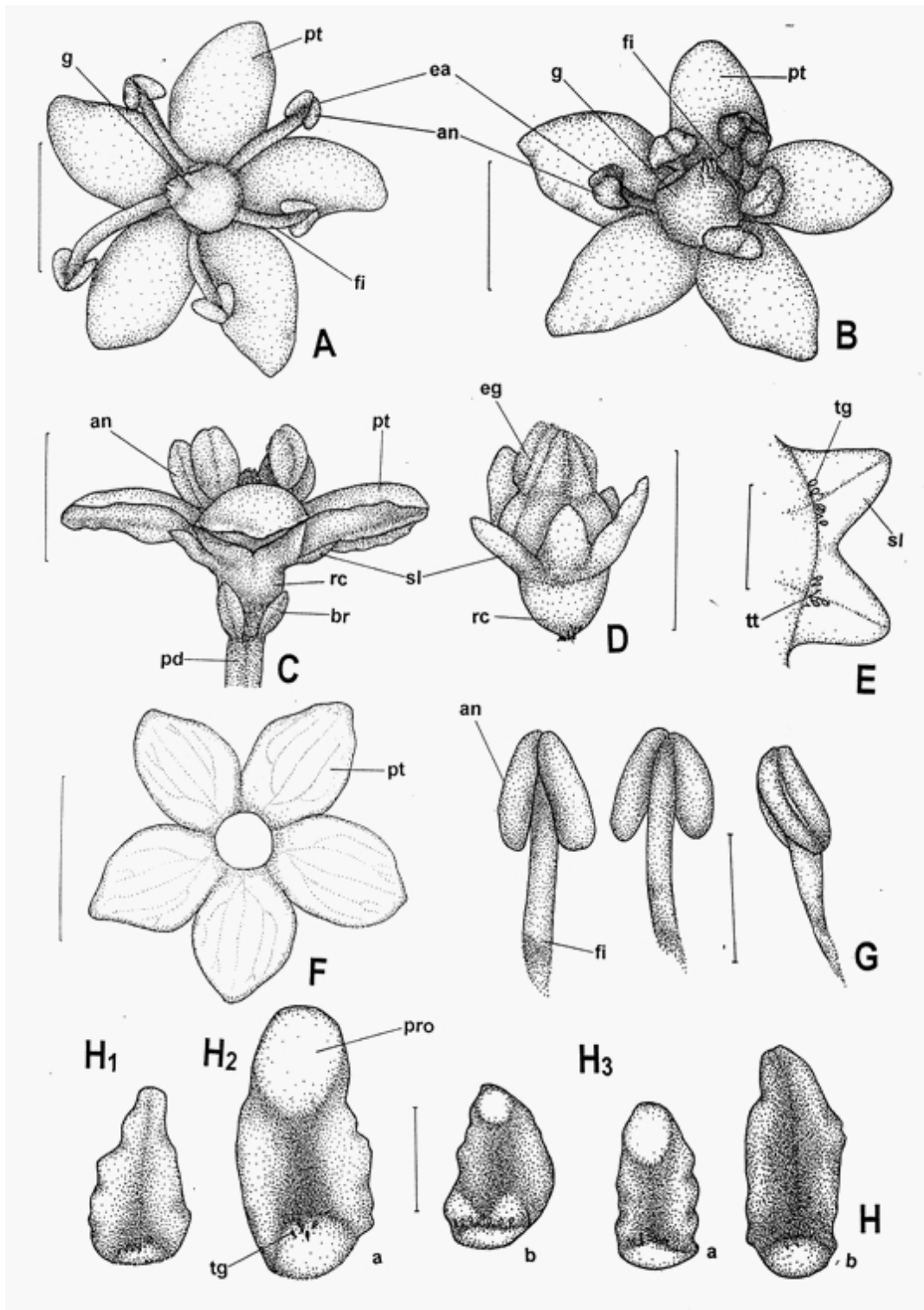


Figura 1.4 *Sambucus australis* Cham. & Schldl. - estruturas macroscópicas observadas nas flores. **A.** aspecto geral da flor estaminada, em vista frontal; **an:** antera; **ea:** estame; **fi:** filete; **g:** gineceu; **pt:** pétala; **B.** aspecto geral da flor pistilada, em vista frontal; **an:** antera; **ea:** estame; **fi:** filete; **g:** gineceu; **pt:** pétala; **C.** aspecto geral da flor pistilada, em vista lateral; **an:** antera; **br:** bráctea; **rc:** receptáculo; **pd:** pedicelo; **pt:** pétala; **sl:** sépala; **D.** aspecto geral do gineceu, do receptáculo e do cálice de uma flor pistilada, em vista lateral; **eg:** estigma; **rc:** receptáculo; **sl:** sépala; **E.** aspecto geral de parte do cálice, mostrando a face adaxial de duas sépalas, em vista frontal; **sl:** sépala; **tg:** tricoma glandular; **F.** aspecto geral da corola desprendida, em vista frontal; **pt:** pétala; **G.** aspectos gerais de estames em diferentes posições laterais; **an:** antera; **fi:** filete; **H.** aspectos gerais da face adaxial de brácteas, em vista frontal, evidenciando suas distintas formas; **H1.** bráctea triangular; **H2. a-b.** brácteas elípticas; **H3. a-b.** brácteas oblongas; **pro:** proeminência apical; **tg:** tricoma glandular. As réguas correspondem em **A – D e G** a 2,5 mm; em **E e H** a 1,0 mm; em **F** a 5 mm.

Descrição macroscópica dos contaminantes

Sambucus nigra L.

De acordo com o determinado pelos compêncios europeus (EUROPEAN, 2002; FARMACOPEIA, 2002) no material considerado estranho nas amostras de flores de *Sambucus nigra*, estão os pedicelos grosseiros da própria espécie. Em geral estes apresentam-se esbranquiçados pela dessecação, longitudinalmente sulcados, medindo 1,0 a 7,0 mm de comprimento, com tricomas tectores distribuídos por toda a sua extensão ou somente na região basal, onde também ocorrem tricomas glandulares, visíveis com lente de aumento.

Sambucus australis Cham. & Schltl.

Para esta espécie consideraram-se as especificações encontradas para a espécie europeia. São observados pedicelos com as mesmas características citadas para *Sambucus nigra*, diferindo apenas nas medidas que são de 1,0 a 6,0 mm de comprimento.

1.5.2 Análise microscópica

***Sambucus nigra* L.**

BRÁCTEAS

Em vista frontal, a cutícula é estriada e as estrias acompanham o eixo maior das células epidérmicas (Fig. 1.5-A e Fig. 1.5-B). As células epidérmicas fundamentais são alongadas, de diferentes formas, com núcleos evidentes e com algumas gotas lipídicas esféricas. Na região do bordo e sobre a região da nervura principal, estas células apresentam forma tabular e são mais alongadas e de paredes retilíneas. Tricomas tectores (Fig. 1.5-F1, a-c e Fig. 1.5-F2, a-c) e glandulares (Fig. 1.5-F3, a-z), muito variados, são observados principalmente na base da face adaxial. Raros idioblastos de areia cristalina, de oxalato de cálcio, de

aspecto enegrecido e sem forma definida, são visíveis. As brácteas são hipostomáticas, com estômatos do tipo anomocítico (Fig. 1.5-B).

Em secção transversal, a cutícula é bastante espessa e estriada (Fig. 1.5-D e Fig. 1.5-E). Os estômatos localizam-se no mesmo nível das demais células epidérmicas. A constituição do mesofilo é de até quatro camadas de clorênquima, geralmente três, com células isodiamétricas, reduzidos espaços intercelulares e na região da nervura principal há redução do número de cloroplastídios. O sistema vascular geralmente é composto por um único agrupamento xilemático (Fig. 1.5-D), o qual pode estar envolto por bainha parenquimática simples, com poucos ou sem cloroplastídios. Gotas lipídicas esféricas ocorrem em todos os tecidos (Fig. 1.5-D e Fig. 1.5-E), exceto no xilema.

RECEPTÁCULO

Em vista frontal, a cutícula é espessa e estrias epicuticulares acompanham o eixo maior das células epidérmicas, as quais constituem uma única camada celular, possuem forma tabular e / ou quadrangular, paredes retilíneas, núcleo evidente, e gotas lipídicas esféricas.

Em secção transversal, o receptáculo apresenta forma circular, com cutícula espessa e bastante estriada. O tecido parenquimático é formado por células isodiamétricas, de pequeno volume, com reduzidos espaços intercelulares e poucos cloroplastídios, formando até doze camadas celulares. Percebe-se o descréscimo do volume celular a medida que se aproxima do lóculo (Fig. 1.8-E). Os feixes vasculares são do tipo colateral e distribuem-se em forma de anel pelo tecido parenquimático (Fig. 1.8-D). Gotas lipídicas esféricas ocorrem em todos os tecidos (Fig. 1.8-E).

CÁLICE

Cada sépala, quando diafanizada, mostra uma a três nervuras paralelas (Fig. 1.6-C), a principal chega até o ápice e ramifica-se, as outras duas ramificam-se na

região mediana ou acompanham a nervura principal até o ápice, mantendo o paralelismo. As sépalas são anfiestomáticas, com estômatos do tipo anomocítico (Fig. 1.6-A e Fig. 1.6-B).

Em vista frontal, a cutícula é espessa e intensamente estriada e as estrias dispõem-se paralelamente ao eixo maior das células fundamentais da epiderme (Fig. 1.6-A e Fig. 1.6-B). Estas células apresentam forma tabular, paredes retilíneas, na face adaxial e retilíneas a sinuosas na face abaxial, núcleos evidentes e comumente gotas lipídicas esféricas. A face abaxial mostra estriação cuticular mais intensa. Na região basal de ambas as faces, apresentando maior densidade na face adaxial visualizam-se tricomas tectores (Fig. 1.6-E1, a-f e Fig. 1.6-E2, a-h) e glandulares (Fig. 1.6-E3, a-g), de diferentes formas. Os tricomas tectores ocorrem também na região da margem e são comumente encontrados na porção basal entre as sépalas. Idioblastos de areia cristalina, de oxalato de cálcio, de aspecto enegrecido e sem forma definida, são visíveis em ambas as faces.

Em secção transversal (Fig. 1.6-C e Fig. 1.6-D), a cutícula é bastante estriada e espessa principalmente na região dos bordos. A epiderme é uniestratificada e constituída por células com paredes retilíneas, de forma poligonal, achatadas tangencialmente na face adaxial e de forma poligonal na face abaxial. O mesofilo é homogêneo, formado por até cinco camadas de células parenquimáticas isodiamétricas, poucos cloroplastídios, amplos espaços intercelulares (Fig. 1.6-D) e esparsos idioblastos de areia cristalina. O sistema vascular está representado por um a três agrupamentos xilemáticos (Fig. 1.6-C), com até cinco elementos traqueais de espessamento helicoidal cada um (Fig. 1.6-D). Nas células parenquimáticas do xilema ocorrem grãos de amido elipsóides e, envolvendo o grupamento xilemático principal é visível uma bainha parenquimática simples, com cloroplastídios. Na região do bordo o parênquima apresenta-se frouxo e na extremidade desta reação geralmente ocorre uma única camada de células parenquimáticas. Gotas lipídicas esféricas ocorrem em todos os tecidos.

COROLA

Cada pétala, quando diafanizada, mostra geralmente, três, raro quatro nervuras paralelas, sendo que as secundárias partem da principal, ramificadas ou não, nunca anastomosadas no ápice (Fig. 1.3-C). Na porção basal de ambas as faces, ocorrem tricomas tectores (Fig. 1.7-F1) e glandulares (Fig. 1.7-F2, a-f) de diferentes formas, sendo que a maior densidade é verificada na face adaxial. As pétalas são anfi-hipoestomáticas, com estômatos arredondados, do tipo anomocítico (Fig. 1.7-B).

Em vista frontal, a cutícula é mais estriada na face abaxial (Fig. 1.7-B), e menos estriada na face adaxial. Idioblastos de areia cristalina, de oxalato de cálcio, de aspecto enegrecido e sem forma definida, são visíveis em ambas as faces (Fig. 1.7-C).

Em secção transversal, a cutícula é espessa e estriada na face abaxial e mais espessa e menos estriada na face adaxial (Fig. 1.7-E). A epiderme é uniestratificada, com células fundamentais poligonais e isodiamétricas, papilosas e de paredes anticliniais espessas, retilíneas na face adaxial, com pontoações e núcleos evidentes. Na região da nervura principal estas células podem apresentar forma tabular. Na face abaxial as células epidérmicas fundamentais são alongadas, de maior volume do que as da face adaxial, exceto na região da nervura principal, de paredes muito sinuosas e delgadas. Em ambas as faces ocorrem pequenas gotas lipídicas. O mesofilo é homogêneo, formado por até dez camadas de parênquima frouxo, com células de forma irregular, núcleos evidentes e poucos cloroplastídios (Fig. 1.7-E). Por vezes, ocorrem amplos espaços intercelulares. O sistema vascular está representado por três a seis feixes vasculares colaterais igualmente desenvolvidos (Fig. 1.7-D) distribuídos pelo parênquima, com maior quantidade de elementos xilemáticos do que floemáticos, e podem estar envolvidos por bainha parenquimática simples. Na região do bordo o sistema vascular é formado apenas por agrupamentos de elementos xilemáticos. Grãos de amido elipsóides estão presentes nos parênquimas.

ANDROCEU

O filete em vista frontal possui cutícula estriada e as estrias acompanham o eixo maior das células epidérmicas, as quais são alongadas, possuem forma retangular, paredes retilíneas e delgadas, núcleo evidente e poucas gotas lipídicas (Fig. 1.7-G).

Em secção transversal (Fig. 1.7-H e Fig. 1.7-I), o filete apresenta forma circular, possui cutícula delgada e finamente estriada. A epiderme é uniestratificada, formada por células epidérmicas poligonais e os estômatos são ausentes. O parênquima é formado por células poligonais de diferentes dimensões que diminuem de volume em direção ao centro, é frouxo, desprovido de cloroplastídios e com poucas gotas lipídicas. O sistema vascular preenche a região central e é formado por elementos traqueais de espessamento helicoidal (Fig. 1.7-I).

A antera, em secção transversal (Fig. 1.8-A), possui epiderme bastante papilosa. O tapete é formado por uma única camada de células achatadas tangencialmente e o endotécio por duas a três camadas de células de forma trapezoidal, fibrosas, com pontuações evidentes. O parênquima é pouco frouxo.

O pólen é prolato, arredondado em vista polar (Fig. 1.8-B, b), elipsoidal em vista equatorial (Fig. 1.8-B, a), tricolporado, com 15 µm a 25 µm de diâmetro com superfície reticulada.

GINECEU

O gineceu, em secção transversal apresenta, em geral, três carpelos, raro quatro, cada uma de forma triangular a triangular-ovalada. Cada cavidade apresenta um rudimento seminal, de forma ovalada a elíptica (Fig. 1.8-D). Numerosas gotas lipídicas e grande quantidade de grãos de amido tornaram-se evidentes somente com corante no tecido parenquimático das paredes carpelares (Fig. 1.8-E). Os feixes vasculares estão distribuídos no tecido parenquimático e geralmente seu número corresponde ao número de lóculos, com disposição oposta a estes. O tecido

parenquimático é compacto, com células pequenas, isodiamétricas, com cloroplastídios e gotas lipídicas. Observa-se que a quantidade de cloroplastídios diminui significativamente na região central do ovário. O tecido que reveste o lóculo (Fig. 1.8-E) é formado por células achatadas tangencialmente, sem espaços intercelulares e com núcleo evidente quando utilizado lugol. O tecido adjacente que forma a parede carpelar apresenta até três camadas de células justapostas, alongadas, compactas, com grande quantidade de grãos de amido, sem cloroplastídios e com espessamento parietal evidente em todas as paredes. Gotas lipídicas ocorrem em todos os tecidos. As células epidérmicas do estigma são extremamente papilosas.

Descrição microscópica dos contaminantes

O pedicelo, em vista frontal, apresenta ornamentação cuticular evidente (Fig. 1.8-F), com estrias paralelas ao eixo maior das células epidérmicas. Estas células são alongadas e retangulares, de paredes retilíneas espessadas e comumente possuem gotas lipídicas. Os estômatos são do tipo anomocítico (Fig. 1.8-F). Na porção basal ocorrem tricomas tectores (Fig. 1.9-A1, a-b e Fig. 1.9-A2, a-e) e glandulares (Fig. 1.9-A3, a-c), de várias formas.

Em secção transversal, o pedicelo apresenta forma irregular, com proeminências e reentrâncias muito acentuadas (Fig. 1.8-G). A cutícula é espessa e estriada. A epiderme é uniestratificada, com células fundamentais de forma tabular e de paredes periclinais internas espessas. A região cortical externa é composta por um colênquima tabular subepidérmico, distribuído em uma a seis camadas apresentando poucos cloroplastídios, além de parênquima com amplos espaços intercelulares e poucos cloroplastídios. Na região cortical interna, as células parenquimáticas apresentam maior volume e raros cloroplastídios (Fig. 1.8-H). O sistema vascular é envolvido por uma camada endodérmica e apresenta até dezesseis feixes vasculares colaterais, dispostos em forma de anel, em grau de desenvolvimento variável (Fig. 1.8-G). Nos feixes de maior desenvolvimento ocorre uma calota de fibras calibrosas, externamente ao floema, enquanto que o xilema apresenta, externamente, fibras poucos desenvolvidas. O câmbio interfascicular, por

vezes é evidente. Nos pedicelos em estágio de desenvolvimento secundário, há expressão do tecido xilemático. A região medular é reduzida e preenchida por parênquima com células de grande volume, paredes delgadas e poucos cloroplastídios. Gotas lipídicas ocorrem na epiderme e no parênquima cortical. Grãos de amido foram observados na endoderme e no floema.

Descrição microscópica do pó

São característicos para o pó das flores de *Sambucus nigra* coloração amarelo-esverdeada; fragmentos de sépalas com dentes marginais unicelulares; isolados (Fig. 1.9-B3, a-c); fragmentos de epiderme de sépalas e pétalas papilosas e com cutícula estriada (Fig. 1.9-B1, a-g); fragmentos de epiderme com estômatos anomocíticos (Fig. 6-B1, f); células-guarda isoladas (Fig. 1.9-B2); fragmentos de epiderme com tricomas tectores de diferentes tipos; raros tricomas tectores (Fig. 1.9-B4, a-c) e glandulares (Fig. 1.9-B5, a-b), isolados ou partes destes; fragmentos de parênquima (Fig. 1.9-B7); porções de tecidos com gotas lipídicas; parte de elementos traqueais de espessamento anelar e helicoidal (Fig. 1.9-B9); fragmentos da epiderme de antera, extremamente papilosa (Fig. 1.9-B8, a-b); fragmentos da camada fibrosa de antera (Fig. 1.9-B10); numerosos grãos de pólen como descritos; grãos de pólen isolados (Fig. 1.9-B11, a) ou agrupados (Fig. 1.9-B11, b), ou associados a fragmentos de anteras e de epiderme de diversas peças (Fig. 1.9-B8); porções de estigma com epiderme papilosa; porções de brácteas; porções do bordo de sépalas, de pétalas (Fig. 1.9-B6) e de brácteas.

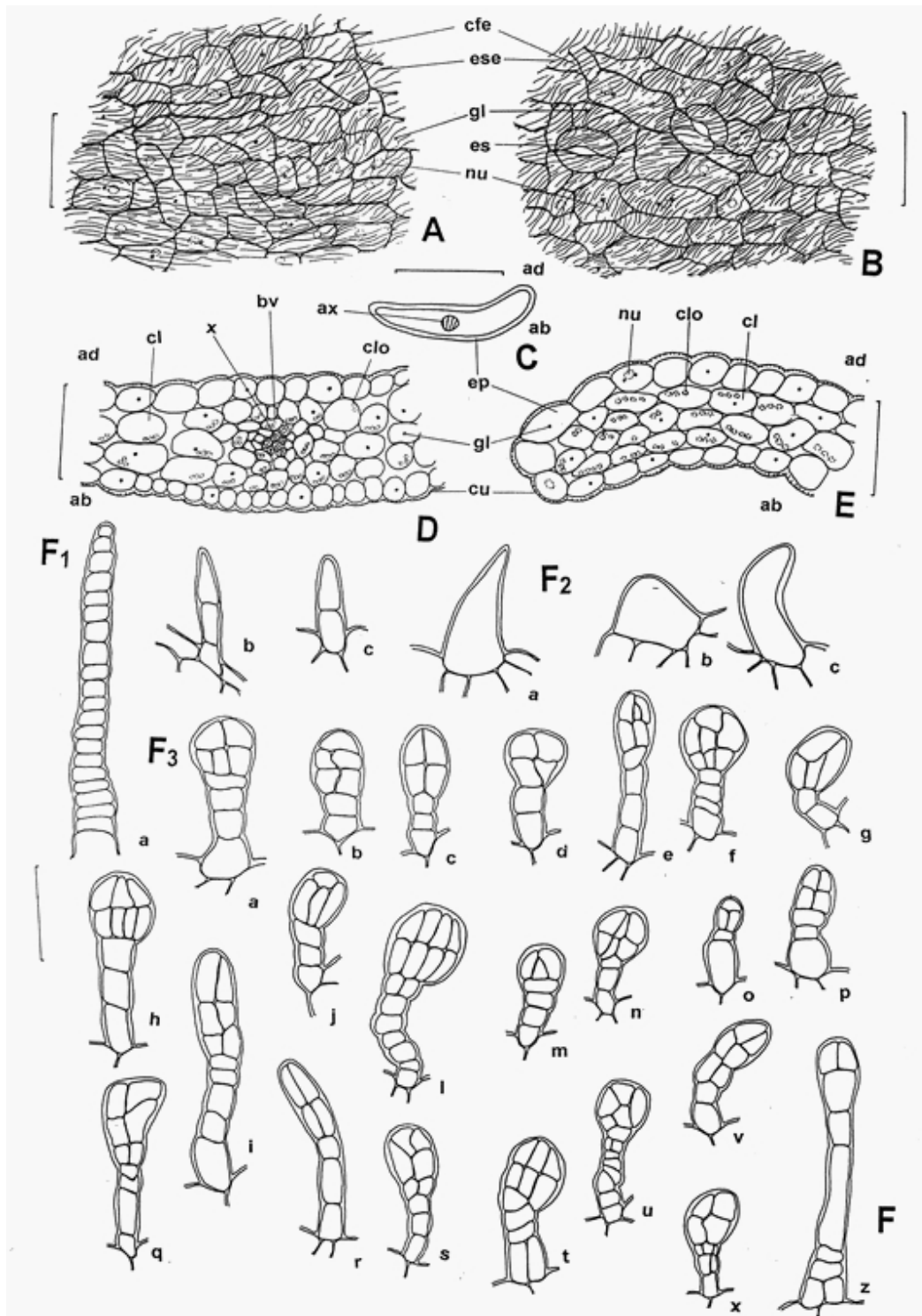


Figura 1.5 *Sambucus nigra* L. - estruturas microscópicas observadas nas brácteas. **A.** detalhe de porção da face adaxial da epiderme da bráctea, em vista frontal; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **nu**: núcleo; **B.** detalhe de porção da face abaxial da epiderme de bráctea, em vista frontal; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **es**: estômato; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **nu**: núcleo; **C.** esquema geral da bráctea, em secção transversal; **ab**: face abaxial; **ad**: face adaxial; **ax**: agrupamento xilemático; **ep**: epiderme; **D.** detalhe da região da nervura principal, da bráctea, em secção transversal; **ab**: face abaxial; **ad**: face adaxial; **bv**: bainha vascular; **cl**: clorênquima; **clo**: cloroplastídio; **cu**: cutícula; **ep**: epiderme; **gl**: gota lipídica; **x**: xilema; **E.** detalhe de porção da região do bordo, da bráctea, em secção transversal; **ab**: face abaxial; **ad**: face adaxial; **cl**: clorênquima; **clo**: cloroplastídio; **cu**: cutícula estriada; **ep**: epiderme; **gl**: gota lipídica; **nu**: núcleo; **F.** detalhe de tricomas ocorrentes em brácteas. **F1.a-c**: tricomas tectores pluricelulares unisseriados; **F2. a-c**: tricomas tectores unicelulares; **F3.a-z**: tricomas glandulares com cabeça pluricelular. As réguas correspondem em **A, B e D – F** a 100 µm; em **C** a 0,4 mm.

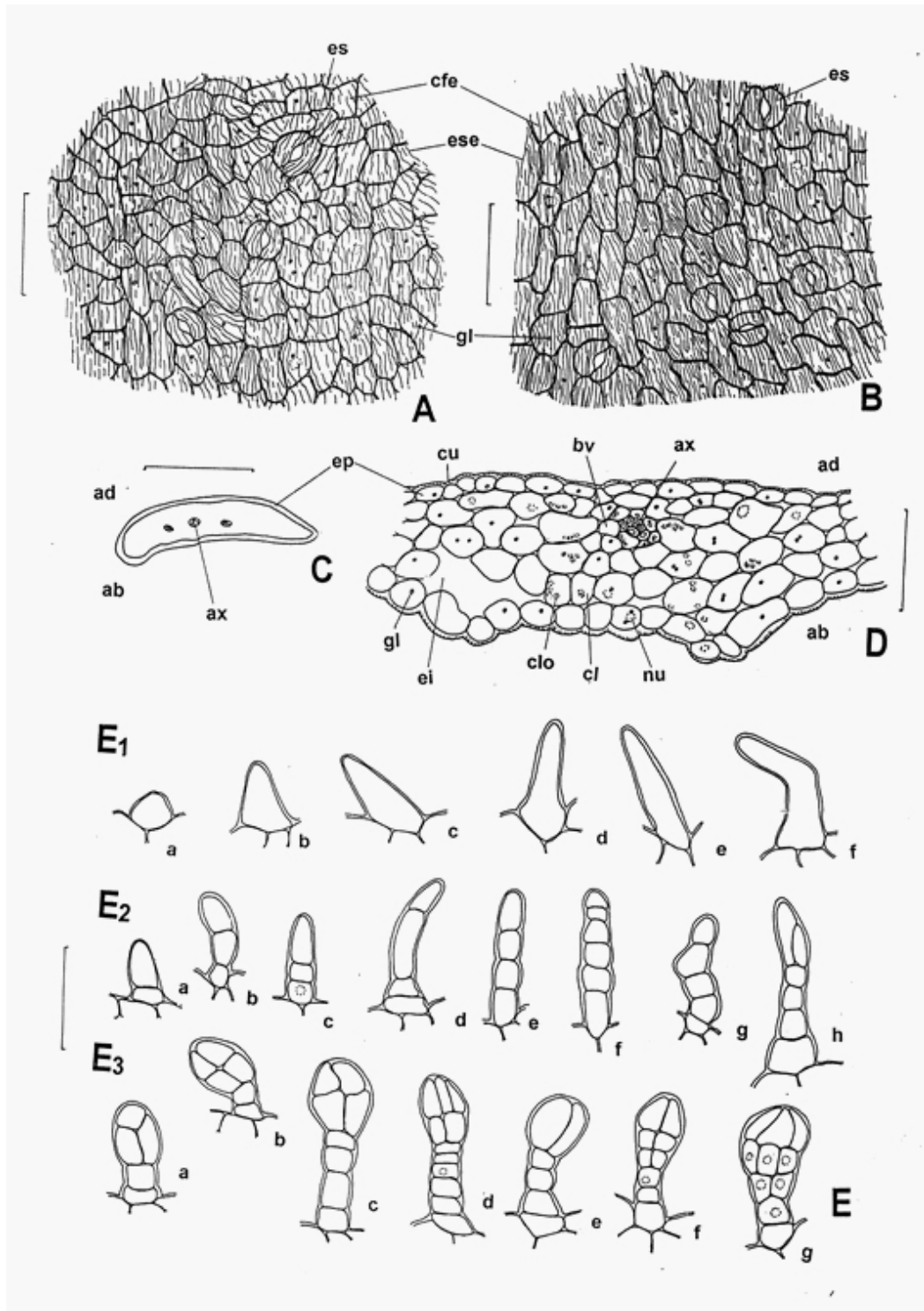


Figura 1.6 *Sambucus nigra* L. - estruturas microscópicas observadas nas sépalas. **A.** detalhe de porção da face adaxial da epiderme da sépala, em vista frontal; **cfe:** célula fundamental da epiderme; **es:** estômato; **ese:** estrias epicuticulares; **gl:** gota lipídica; **B.** detalhe de porção da face abaxial da epiderme da sépala, em vista frontal; **cfe:** célula fundamental da epiderme; **es:** estômato; **ese:** estrias epicuticulares; **gl:** gota lipídica; **C.** esquema geral da sépala, em secção transversal; **ab:** face abaxial; **ad:** face adaxial; **ax:** agrupamento xilemático; **ep:** epiderme; **D.** detalhe de porção da sépala na região da nervura principal, em secção transversal; **ab:** face abaxial; **ad:** face adaxial; **ax:** agrupamento xilemático; **bv:** bainha vascular; **cl:** clorênquima; **clo:** cloroplastídio; **cu:** cutícula estriada; **ei:** espaço intercelular; **ep:** epiderme; **gl:** gota lipídica; **nu:** núcleo; **E.** detalhe de tricomas ocorrentes em sépalas. **E1. a-f:** tricomas tectores unicelulares; **E2. a-h:** tricomas tectores pluricelulares unisseriados; **E3. a-g:** tricomas glandulares com cabeça pluricelular. As réguas correspondem em **A, B, D e E** a 100 µm; em **C** a 0,4 mm.

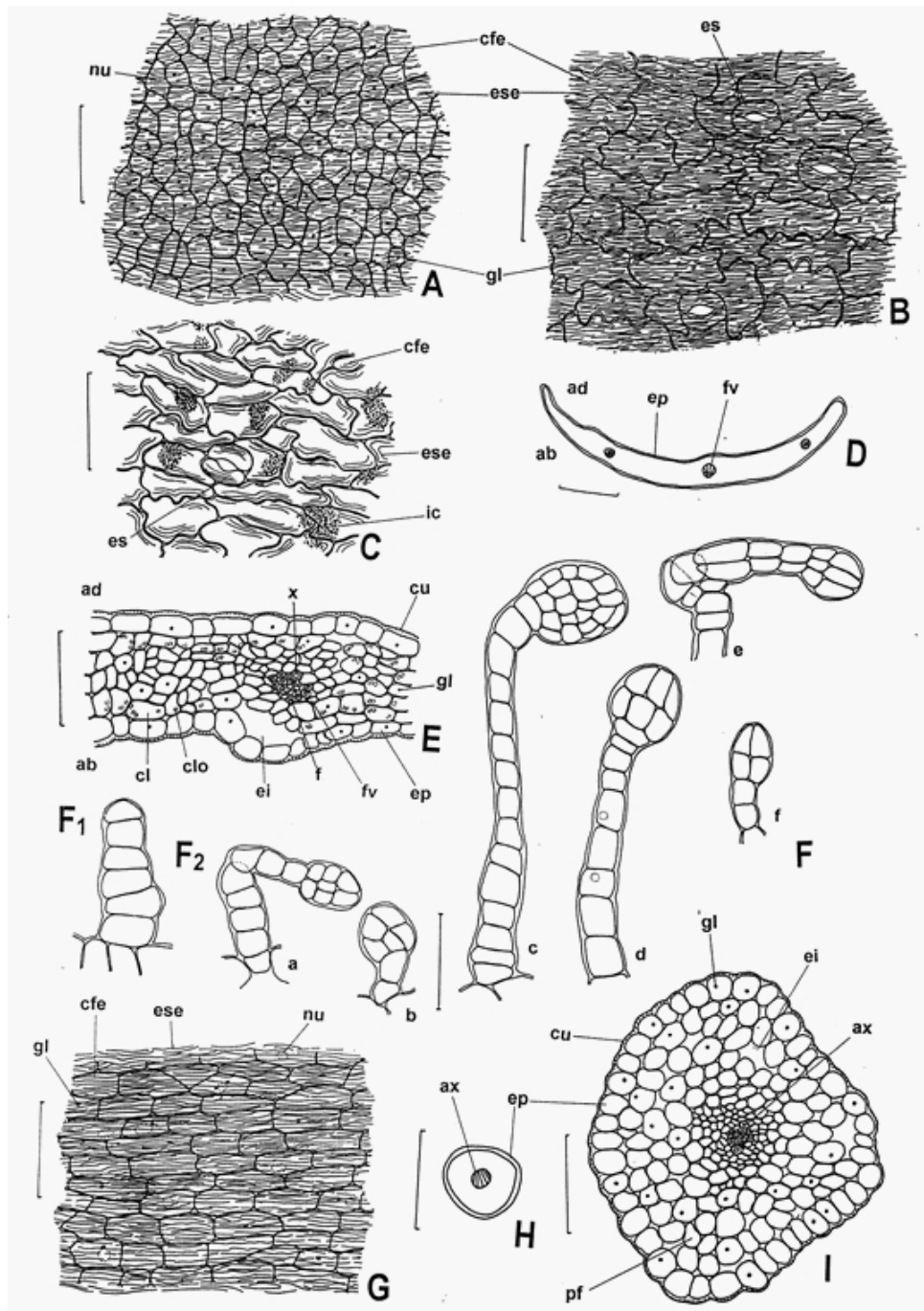


Figura 1.7 *Sambucus nigra* L. - estruturas microscópicas observadas nas pétalas e nos filetes. **A.** detalhe de porção da face adaxial da epiderme da pétala, em vista frontal; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **nu**: núcleo; **B.** detalhe de porção da face abaxial da epiderme da pétala, em vista frontal; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **es**: estômato; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **C.** detalhe de porção da face abaxial da epiderme da pétala, em vista frontal, evidenciando idioblastos de areia cristalina; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **es**: estômato; **ese**: estrias epicuticulares; **ic**: idioblasto cristalífero; **D.** esquema geral da pétala, em secção transversal; **ab**: face abaxial; **ad**: face adaxial; **ep**: epiderme; **fv**: feixe vascular; **E.** detalhe de porção da pétala, na região da nervura principal, em secção transversal; **ab**: face abaxial; **ad**: face adaxial; **cl**: clorênquima; **clo**: cloroplastídio; **cu**: cutícula estriada; **ei**: espaço intercelular; **ep**: epiderme; **f**: floema; **fv**: feixe vascular; **gl**: gota lipídica; **x**: xilema; **F.** detalhe de tricomas em pétalas; **F1.** tricoma tector pluricelular unisseriado; **F2.** a-f: tricomas glandulares com cabeça pluricelular; **G.** detalhe de porção da epiderme do filete, em vista frontal; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **nu**: núcleo; **H.** esquema geral do filete, em secção transversal; **ax**: agrupamento xilemático; **ep**: epiderme; **I.** detalhe do filete em secção transversal; **ax**: agrupamento xilemático; **cu**: cutícula estriada; **ei**: espaço intercelular; **ep**: epiderme; **gl**: gota lipídica; **pf**: parênquima fundamental. As régua correspondem em **A – C, E – G e I** a 100 µm; em **D e H** a 0,4 mm.

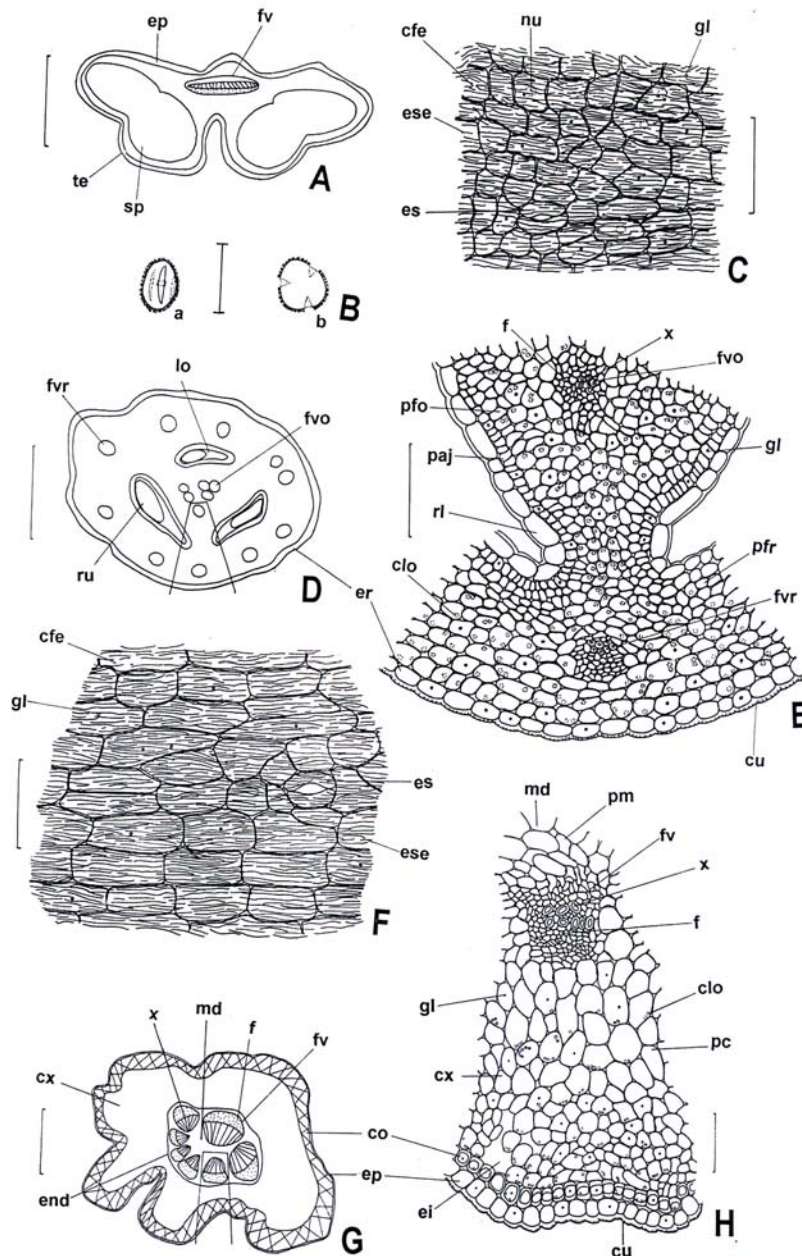


Figura 1.8 *Sambucus nigra* L. - estruturas microscópicas observadas nas anteras, no receptáculo e nos pedicelos. **A.** esquema geral da antera, em secção transversal; **ep:** epiderme; **fv:** feixe vascular; **sp:** saco polínico; **te:** teca; **B.** esquema geral do grão de pólen; **a:** vista polar; **b:** vista equatorial. **C.** detalhe de porção da epiderme do receptáculo, em vista frontal; **cfe:** célula fundamental da epiderme; **es:** estômato; **ese:** estrias epicuticulares; **gl:** gota lipídica; **nu:** núcleo; **D.** esquema geral do receptáculo e do ovário em secção transversal; **er:** epiderme do receptáculo; **fvo:** feixe vascular do ovário; **fvr:** feixe vascular do receptáculo; **lo:** lóculo; **ru:** rudimento seminal; **E.** detalhe de porção do receptáculo e do ovário, em secção transversal; **clo:** cloroplastídios; **cu:** cutícula estriada; **er:** epiderme do receptáculo; **f:** floema; **fvo:** feixe vascular do ovário; **fvr:** feixe vascular do receptáculo; **gl:** gota lipídica; **paj:** parênquima de células justapostas; **pfo:** parênquima fundamental do ovário; **pfr:** parênquima fundamental do receptáculo; **rl:** revestimento do lóculo; **x:** xilema; **F.** detalhe de porção da epiderme do pedicelo, em vista frontal; **cfe:** célula fundamental da epiderme; **es:** estômato; **ese:** estrias epicuticulares; **gl:** gota lipídica; **G.** esquema geral do pedicelo em secção transversal; **co:** colênquima; **cx:** córtex; **end:** endoderme; **ep:** epiderme; **f:** floema; **fv:** feixe vascular; **md:** medula; **x:** xilema; **H.** detalhe de porção do pedicelo em secção transversal; **clo:** cloroplastídio; **co:** colênquima; **cu:** cutícula estriada; **ei:** espaço intercelular; **ep:** epiderme; **f:** floema; **fv:** feixe vascular; **gl:** gota lipídica; **pc:** parênquima cortical; **pm:** parênquima medular; **x:** xilema. As régua correspondem em **A, D e G** a 400 μm ; em **C, E, F e H** a 100 μm ; em **B** a 30 μm

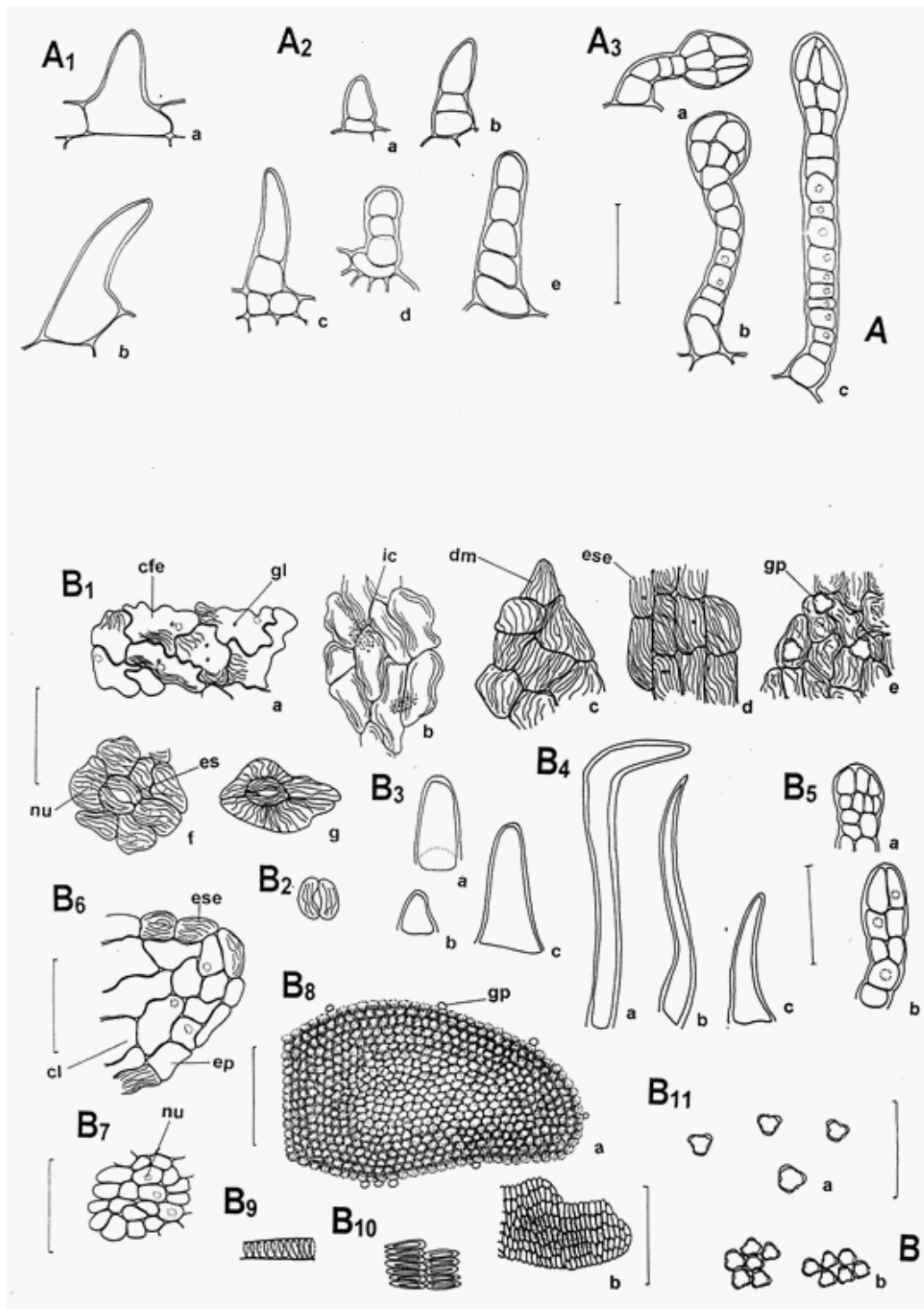


Figura 1.9 *Sambucus nigra* L - estruturas microscópicas observadas nos pedicelos e no pó. **A**. detalhe de tricomas ocorrentes no pedicelo; **A1**. a-b: tricomas tectores unicelulares; **A2**. a-e: tricomas tectores pluricelulares unisseriados; **A3**. a-c: tricomas glandulares com cabeça pluricelular; **B**. detalhes do pó. **B1**. a-g fragmentos de epiderme; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **dm**: dente marginal; **es**: estômato; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **gp**: grão de pólen; **ic**: idioblasto cristalífero; **nu**: núcleo; **B2**. células-guarda isoladas; **B3**. a-c: porções de dentes marginais; **B4**. a-c: porções de tricomas tectores unicelulares; **B5**. a-b: porções de tricomas glandulares com cabeça pluricelular; **B6**. porção de bordo da pétala; **ep**: epiderme; **ese**: estrias epicuticulares; **cl**: clorênquima; **nu**: núcleo; **B7**. fragmento de parênquima; **nu**: núcleo; **B8**. fragmentos da antera; **a**. porção convexa; **b**. porção côncava; **gp**: grão de pólen; **B9**. porção de elemento traqueal com espessamento parietal helicoidal; **B10**. fragmento da camada fibrosa da antera; **B11**. grãos de pólen; **a**. isolados; **b**. agrupados. As réguas correspondem em **A** e **B** (**B1** – **B7** e **B9** – **B11**) e 100 μm ; em **B** (**B8**) a 400 μm .

***Sambucus australis* Cham. & Schltdl.**

BRÁCTEAS

Em vista frontal, a cutícula é estriada e as estrias acompanham o eixo maior das células epidérmicas (Fig. 1.10-A e Fig. 1.10-B). As células epidérmicas fundamentais são de forma irregular, geralmente alongadas, com núcleos evidentes e abundantes gotas lipídicas esféricas. Na região do bordo e sobre a região da nervura principal, estas células são mais alongadas e de paredes retilíneas. Nas demais regiões apresentam forma poligonal e menores dimensões. Tricomas tectores (Fig. 1.10-E1 e Fig. 1.10-E2, a-c) e glandulares (Fig. 1.10-E3, a-c) são observados na porção basal da face adaxial. As brácteas são anfiestomáticas, com estômatos do tipo anomocítico (Fig. 1.10-A e Fig. 1.10-B).

Em secção transversal a cutícula é espessa e estriada (Fig. 1.10-D). A região apical é de forma circular devido a proliferação dos elementos xilemáticos, relacionada à proeminência visível macroscopicamente. Na porção mediana, a face abaxial é proeminente e as células epidérmicas fundamentais assumem a forma poligonal e são de menores dimensões do que as da face adaxial. Os estômatos localizam-se no mesmo nível das demais células epidérmicas. A constituição do mesofilo é de até quatro camadas de clorênquima, com células isodiamétricas e podem estar ausentes na região dos bordos. O sistema vascular pode estar formado por um a quatro feixes vasculares ou por agrupamentos xilemáticos. Quando apenas um (Fig. 1.10-C), localiza-se na região da nervura principal, pode ser constituído por subagrupamentos e estar envolvido por uma bainha parenquimática simples, sem ou com poucos cloroplastídios. Gotas lipídicas esféricas são muito abundantes em todos os tecidos (Fig. 1.10-D), exceto no xilema.

RECEPTÁCULO

Em vista frontal, a cutícula é espessa e pouco estriada, as estrias epicuticulares acompanham o eixo maior das células epidérmicas, as quais têm forma tabular e quadrangular, paredes retilíneas, constituem uma única camada

celular e possuem grande quantidade de gotas lipídicas esféricas (Fig. 1.12-F). Tricomas glandulares ocorrem na região de inserção da bráctea.

Em secção transversal (Fig. 1.12-G e Fig. 1.12-H), o receptáculo apresenta forma circular, com cutícula espessa e bastante estriada. O tecido parenquimático é formado por células isodiamétricas, de pequeno e igual volume, com reduzidos espaços intercelulares e poucos cloroplastídios que formam até doze camadas celulares. Os feixes vasculares são do tipo colateral e distribuem-se em forma de anel pelo tecido parenquimático. Gotas lipídicas esféricas ocorrem em todos os tecidos, em menor quantidade no xilema.

CÁLICE

Cada sépala, quando diafanizada, mostra uma a três nervuras paralelas, a principal chega até o ápice e ramifica-se, as outras duas ramificam-se na região mediana ou acompanhando a nervura principal até o ápice, mantendo o paralelismo. As sépalas são hipostomáticas, com estômatos do tipo anomocítico (Fig. 1.10-G).

Em vista frontal, a cutícula é intensamente estriada e as estrias dispõem-se paralelamente ao eixo maior das células fundamentais da epiderme (Fig. 1.10-F e Fig. 1.10-G). Estas células apresentam forma alongada e de paredes sinuosas em ambas as faces, com uma papila por célula, núcleos celulares grandes e muito evidentes. Algumas das células na face abaxial são alongadas e possuem forma irregular, paredes sinuosas, espessas e visíveis pontuações. As células encontradas na face adaxial são retangulares e possuem paredes espessas. Na face adaxial da epiderme distribuem-se tricomas tectores (Fig. 1.11-A1, a-b) e glandulares, que são abundantes (Fig. 1.11-A2, a-c). Não são encontrados idioblastos cristalíferos.

Em secção transversal (Fig. 1.10-H e Fig. 1.10-I), a cutícula é espessa, com maior espessura na face abaxial. A epiderme é uniestratificada e constituída de células epidérmicas achatadas tangencialmente ou poligonais na face adaxial e poligonais, na face abaxial. Os estômatos encontram-se no mesmo nível das demais células epidérmicas e nas células-guarda grãos de amido elipsóides são

observados. O mesofilo é homogêneo, formado por duas a sete camadas de células parenquimáticas isodiamétricas, de núcleo grande, com maiores espaços intercelulares na região do bordo (Fig. 1.10-I). Não são encontrados idioblastos de areia cristalina. O sistema vascular está representado por um a três agrupamentos xilemáticos (Fig. 1.10-H), com até cinco elementos traqueais de espessamento helicoidal cada um (Fig. 1.10-I). Nas células parenquimáticas do xilema ocorrem grãos de amido elipsóides e, envolvendo o agrupamento xilemático principal é visível uma bainha parenquimática simples, com cloroplastídios. Na região do bordo o parênquima é frouxo e na extremidade desta região geralmente ocorrem uma a duas camadas de células parenquimáticas. Gotas lipídicas esféricas são extremamente abundantes e ocorrem em todos os tecidos, em maior quantidade na epiderme e no mesofilo.

COROLA

Cada pétala, quando diafanizada, mostra geralmente cinco, raro quatro nervuras paralelas, sendo que as secundárias partem da principal, ramificadas ou não, nunca anastomosadas no ápice (Fig. 1.4-F). Na porção basal da face adaxial são encontrados principalmente tricomas glandulares (Fig. 1.11-F2, a-f), além de tricomas tectores (Fig. 1.11-F1), de diferentes formas. As pétalas são anfi-hipoestomáticas, com estômatos arredondados e elipsóides, do tipo anomocítico (Fig. 1.11-C).

Em vista frontal, a cutícula mostra-se intensamente estriada na face adaxial (Fig. 1.11-B) e menos estriada na face abaxial (Fig. 1.11-C). Na face abaxial as células epidérmicas fundamentais são alongadas, de maior volume do que as da face adaxial e de paredes sinuosas e delgadas. Não são encontrados idioblastos de areia cristalina. Em ambas as faces ocorrem pequenas gotas lipídicas.

Em secção transversal, a cutícula é mais espessa e menos estriada na face abaxial do que na face adaxial (Fig. 1.11-E). A epiderme é uniestratificada, com células fundamentais poligonais e isodiamétricas, papilosas e de paredes anticlinais espessas e retilíneas na face adaxial, com núcleos evidentes. Na região da nervura

principal estas células podem apresentar forma tabular. Na face abaxial as células epidérmicas fundamentais são alongadas, de maior volume do que as da face adaxial, exceto na região da nervura principal, de paredes muito sinuosas e delgadas. As papilas são menos proeminentes nas regiões dos bordos. Em ambas as faces ocorrem pequenas gotas lipídicas. O mesofilo é homogêneo, formado por até doze camadas de parênquima fundamental frouxo, com células de forma irregular e com núcleos evidentes (Fig. 1.11-E). Nas regiões dos bordos geralmente ocorrem amplos espaços intercelulares. Não são evidenciados idioblastos de areia cristalina. O sistema vascular está representado por três a seis feixes vasculares colaterais (Fig. 1.11-D), distribuídos pelo parênquima e com maior quantidade de elementos xilemáticos do que floemáticos que podem estar envolvidos por bainha parenquimática simples. Ao ser observado um feixe vascular de maior desenvolvimento, este localiza-se na região da nervura principal, envolvido por bainha parenquimática simples, sem cloroplastídios, e as células parenquimáticas fundamentais do mesofilo distribuem-se radialmente em torno desta. Nas regiões dos bordos o sistema vascular é formado apenas por agrupamentos de elementos xilemáticos. Grãos de amido elipsóides estão presentes nos parênquimas dos tecidos de condução.

ANDROCEU

O filete em vista frontal possui cutícula estriada e as estrias acompanham o eixo maior das células epidérmicas as quais são alongadas, possuem forma retangular, paredes retilíneas e delgadas, núcleo evidente e raras gotas lipídicas (Fig. 1.12-A).

Em secção transversal (Fig. 1.12-B e Fig. 1.12-C), o filete apresenta forma circular possui cutícula delgada e finamente estriada. A epiderme é uniestratificada, formada por células epidérmicas poligonais e os estômatos são ausentes. O parênquima é formado por células poligonais de diferentes dimensões que diminuem de volume em direção ao centro, é frouxo, desprovido de cloroplastídios e com poucas gotas lipídicas. O sistema vascular preenche a região central e é formado por elementos traqueais de espessamento helicoidal (Fig. 1.12-C).

A antera, em secção transversal (Fig. 1.12-D), possui epiderme papilosa. O tapete é formado por uma única camada de células achatadas tangencialmente e o endotécio por duas a três camadas de células de forma trapezoidal, fibrosas, com pontoações evidentes. O parênquima é pouco frouxo.

O pólen é prolato, elipsoidal em vista polar (Fig. 1.12-E, b), arredondado em vista equatorial (Fig. 1.12-E, a), tricolporado, com 18 μm a 34 μm de diâmetro com superfície reticulada.

GINECEU

O gineceu, em secção transversal, apresenta cinco, quatro ou raro três carpelos, cada uma de forma triangular a triangular-ovalada. Cada cavidade apresenta um rudimento seminal, de forma ovalada a elíptica (Fig. 1.12-G). Numerosas gotas lipídicas e grande quantidade de grãos de amido tornam-se evidentes somente com corante no tecido parenquimático das paredes carpelares (Fig. 1.12-H). Os feixes vasculares estão distribuídos no tecido parenquimático e geralmente seu número corresponde ao número de lóculos, com disposição oposta a estes; raramente o número de feixes corresponde ao dobro do número de lóculos e, neste caso, apresentam-se distribuídos em forma de anel (Fig. 1.12-G). O tecido parenquimático é compacto, com células globosas, isodiamétricas, ricas em cloroplastídios e em gotas lipídicas. Observa-se que a quantidade de cloroplastídios diminui significativamente na região central do ovário e na porção entre os lóculos. Nestas regiões as células possuem maior volume. O tecido que reveste o lóculo (Fig. 1.12-H) é formado por células achatadas tangencialmente, sem espaços intercelulares e com núcleo evidente, quando utilizado lugol. O tecido adjacente que forma a parede carpelar apresenta até três camadas de células justapostas, alongadas, com reduzidos espaços intercelulares, com grande quantidade de grãos de amido, sem cloroplastídios e com espessamento parietal evidente em todas as paredes. Gotas lipídicas ocorrem em todos os tecidos. As células epidérmicas do estigma são extremamente papilosas.

Descrição microscópica dos contaminantes

O pedicelo, em vista frontal, apresenta ornamentação cuticular evidente (Fig. 1.13-A), com estrias paralelas ao eixo maior das células epidérmicas, as quais são alongadas e retangulares, de paredes retilíneas espessadas e com gotas lipídicas. Os estômatos são do tipo anomocítico (Fig. 1.13-A). Na porção basal ocorrem tricomas tectores (Fig. 1.13-D1, a-b e Fig. 1.13-D2, a-c) e glandulares (Fig. 1.13-D3, a-c), de várias formas.

Em secção transversal, o pedicelo apresenta forma irregular, com proeminências e reentrâncias muito acentuadas (Fig. 1.13-B). A cutícula é espessa e estriada. A epiderme é uniestratificada, com células fundamentais de forma tabular e de paredes periclinais internas espessas. A região cortical externa é composta por uma camada de colênquima tabular subepidérmico, com cloroplastídios, além de um parênquima com amplos espaços intercelulares e poucos cloroplastídios (Fig. 1.13-C). Na região cortical interna, as células parenquimáticas apresentam maior volume e raros cloroplastídios. Não é observada endoderme. O sistema vascular é formado por até doze feixes vasculares colaterais, dispostos em forma de anel, em grau de desenvolvimento variável (Fig. 1.13-B). Nos feixes de maior desenvolvimento, o floema é expressivo. Calotas de fibras externas ao floema, câmbio interfascicular e sistema vascular em estágio de desenvolvimento secundário não são observados. A região medular é reduzida e preenchida por parênquima constituído com células de grande volume, paredes delgadas e poucos de cloroplastídios. Grãos de amido foram observados em todos os tecidos, em maior quantidade no parênquima floemático. Gotas lipídicas ocorrem em todos os tecidos.

Descrição microscópica do pó

São característicos para o pó das flores de *Sambucus australis* coloração amarelo-esverdeada; fragmentos de epiderme de sépalas e pétalas papilosas e com cutícula estriada (Fig. 1.13-E1, a-f); fragmentos de epiderme com estômatos anomocíticos (Fig. 1.13-E1, e); células-guarda isoladas (Fig. 1.13-E2); fragmentos de epiderme com tricomas tectores (Fig. 1.13-E1, f), de diferentes tipos; raros

tricomas tectores (Fig. 1.13-E3, a-b) e glandulares (Fig. 1.13-E4, a-b) isolados ou partes destes; porções de tecidos com gotas lipídicas (Fig. 1.13-E1, c); parte de elementos traqueais de espessamento anelar e helicoidal (Fig. 1.13-E7); fragmentos da epiderme de antera, extremamente papilosa (Fig. 1.13-E5, a-b); fragmentos da camada fibrosa de antera (Fig. 1.13-E6); numerosos grãos de pólen como descritos; grãos de pólen isolados (Fig. 1.13-E8, a) ou agrupados (Fig. 1.13-E8, b), ou associados a fragmentos de anteras e de epiderme de diversas peças; porções de estigma com epiderme papilosa; porções de brácteas; porções do bordo de sépalas, de pétalas e de brácteas.

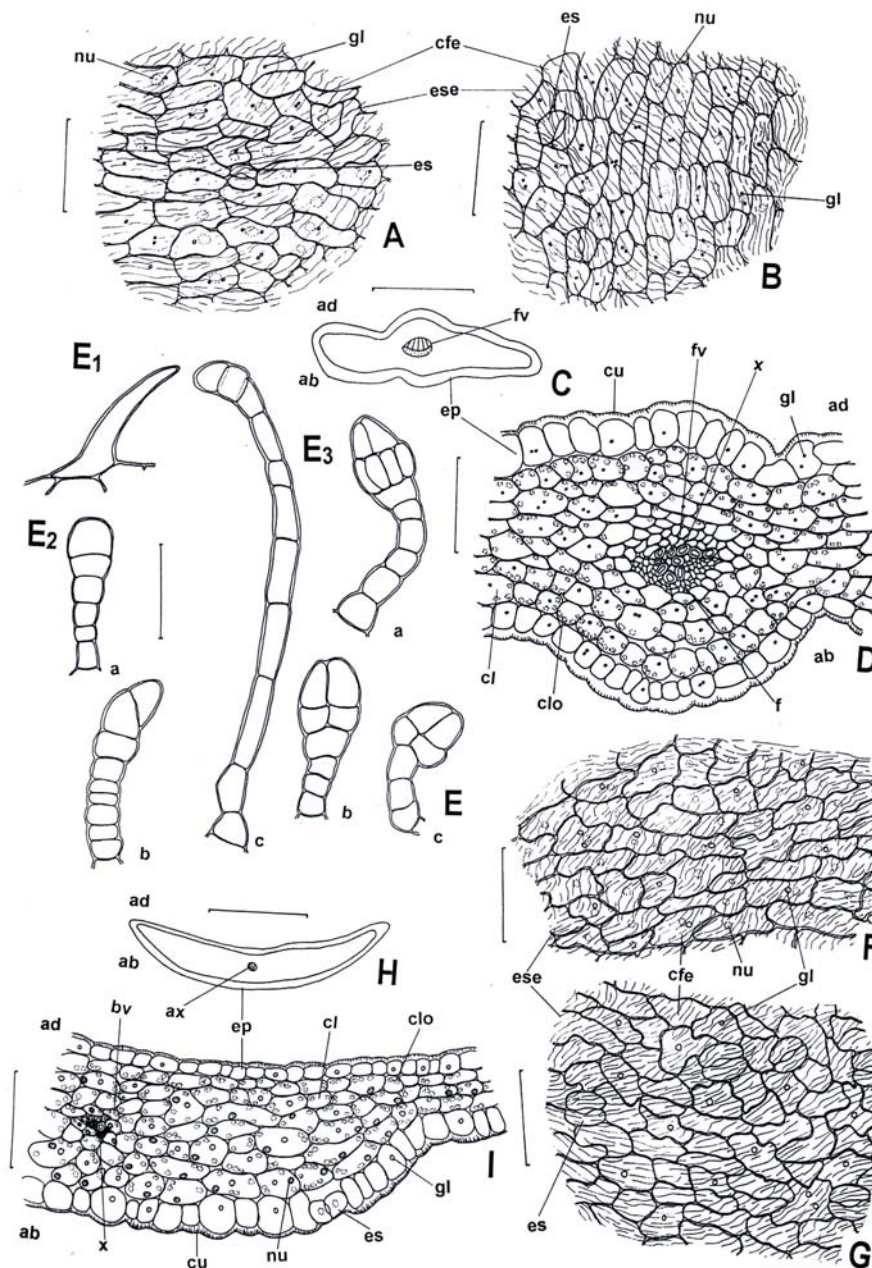


Figura 1.10 *Sambucus australis* Cham. & Schldl. - estruturas microscópicas observadas nas brácteas e nas sépalas. **A.** detalhe de porção da face adaxial da epiderme da bráctea, em vista frontal; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **es**: estômato; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **nu**: núcleo; **B.** detalhe de porção da face abaxial da epiderme da bráctea, em vista frontal; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **es**: estômato; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **nu**: núcleo; **C.** esquema geral da bráctea, em secção transversal; **ab**: face abaxial; **ad**: face adaxial; **ep**: epiderme; **fv**: feixe vascular; **D.** detalhe da região da nervura principal da bráctea, em secção transversal; **ab**: face abaxial; **ad**: face adaxial; **cl**: clorênquima; **clo**: cloroplastídio; **cu**: cutícula estriada; **ep**: epiderme; **f**: floema; **fv**: feixe vascular; **gl**: gota lipídica; **x**: xilema; **E.** detalhe de tricomas ocorrentes em brácteas. **E1.** tricoma tector unicelular; **E2 a-c:** tricomas tectores pluricelulares unisseriados; **E3 a-c:** tricomas glandulares com cabeça pluricelular; **F.** detalhe de porção da face adaxial da epiderme da sépala, em vista frontal; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **nu**: núcleo; **G.** detalhe de porção da face abaxial da epiderme da sépala, em vista frontal; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **nu**: núcleo; **H.** esquema geral da sépala, em secção transversal; **ab**: face abaxial; **ad**: face adaxial; **ax**: agrupamento xilemático; **ep**: epiderme; **I.** detalhe de porção da sépala, em secção transversal; **ab**: face abaxial; **ad**: face adaxial; **ax**: agrupamento xilemático; **bv**: bainha vascular; **cl**: clorênquima; **clo**: cloroplastídio; **cu**: cutícula estriada; **ep**: epiderme; **es**: estômato; **gl**: gota lipídica; **nu**: núcleo; **x**: xilema. As régua correspondem em **A, B, D – G e I** a 100 μm ; em **C e H** a 400 μm .

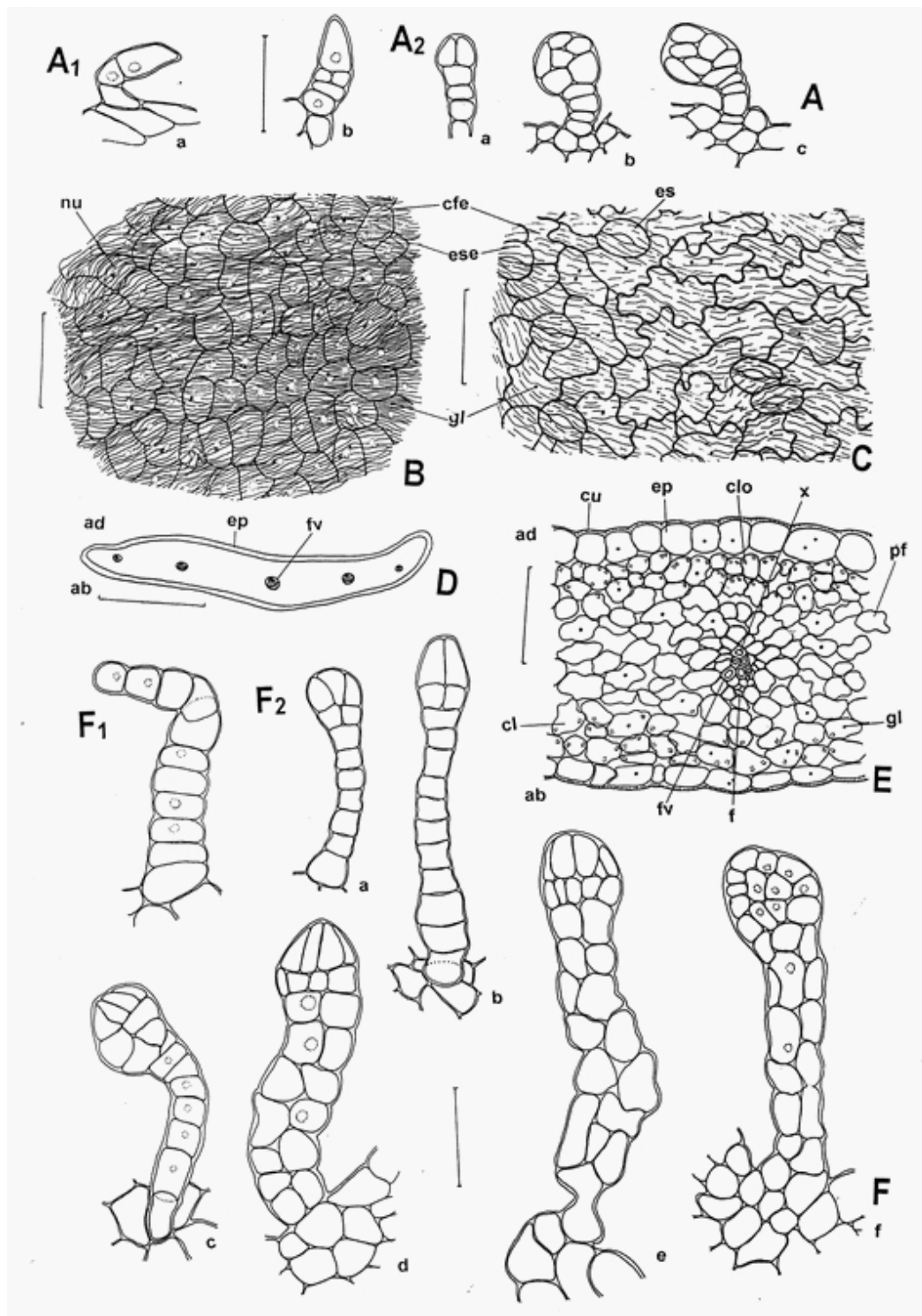


Figura 1.11 *Sambucus australis* Cham. & Schldl. - estruturas microscópicas observadas nas sépalas e nas pétalas. **A**. detalhe de tricomas ocorrentes em sépalas. **A1.a-b**: tricomas tectores pluricelulares; **A2. a-c**: tricomas glandulares com cabeça pluricelular; **B**. detalhe de porção da face adaxial da epiderme da pétala, em vista frontal; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **nu**: núcleo; **C**. detalhe de porção da face abaxial da epiderme da pétala, em vista frontal; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **es**: estômato; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **D**. esquema geral da pétala, em secção transversal; **ab**: face abaxial; **ad**: face adaxial; **ep**: epiderme; **fv**: feixe vascular; **E**. detalhe de porção da pétala, na região da nervura principal, em secção transversal; **ab**: face abaxial; **ad**: face adaxial; **cl**: clorênquima; **clo**: cloroplastídio; **cu**: cutícula estriada; **ep**: epiderme; **f**: floema; **fv**: feixe vascular; **gl**: gota lipídica; **pf**: parênquima fundamental; **x**: xilema; **F**. detalhe de tricomas ocorrentes em pétalas. **F1**. tricoma tector pluricelular unisseriado; **F2: a-f**: tricomas glandulares com cabeça pluricelular. As réguas correspondem em **A – C, E e F** a 100 μm ; em **D** a 800 μm .

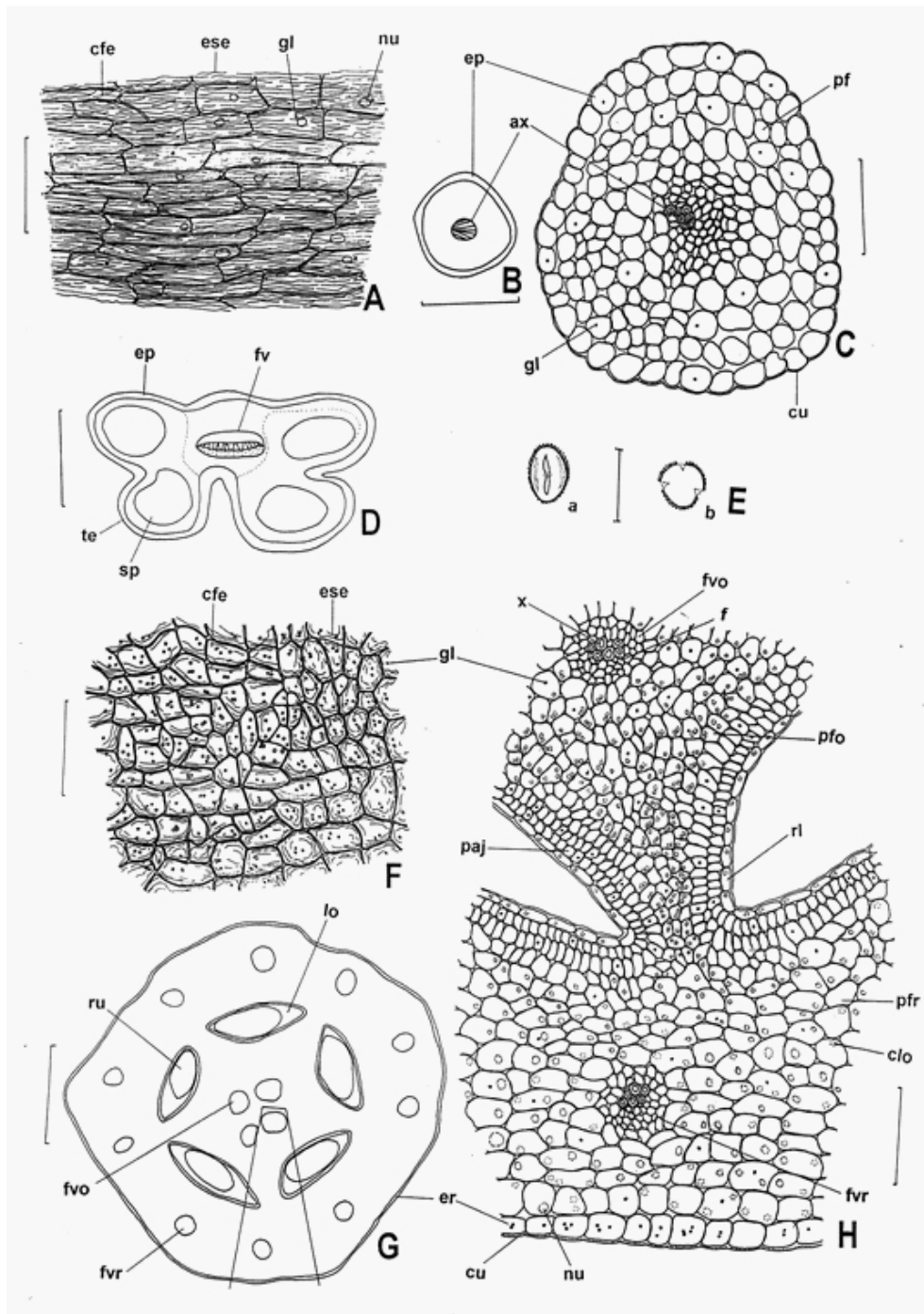


Figura 1.12 *Sambucus australis* Cham. & Schldl. - estruturas microscópicas observadas nos estames e no receptáculo. **A.** detalhe de porção da epiderme do filete, em vista frontal; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **nu**: núcleo; **B.** esquema geral do filete, em secção transversal; **ep**: epiderme; **ax**: agrupamento xilemático; **C.** detalhe do filete em secção transversal; **ax**: agrupamento xilemático; **cu**: cutícula estriada; **ep**: epiderme; **gl**: gota lipídica; **pf**: parênquima fundamental; **D.** esquema geral da antera em secção transversal; **ep**: epiderme; **fv**: feixe vascular; **sp**: saco polínico; **te**: teca; **E.** esquema geral grão de pólen; **a**: vista polar; **b**: vista equatorial. **F.** detalhe de porção da epiderme de receptáculo, em vista frontal; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **G.** esquema geral do receptáculo e do ovário, em secção transversal; **er**: epiderme do receptáculo; **fvo**: feixe vascular do ovário; **fvr**: feixe vascular do receptáculo; **lo**: lóculo; **ru**: rudimento seminal; **H.** detalhe de porção do receptáculo e do ovário, em secção transversal; **cu**: cutícula estriada; **clo**: cloroplastídio; **er**: epiderme do receptáculo; **fvo**: feixe vascular do ovário; **fvr**: feixe vascular do receptáculo; **gl**: gota lipídica; **nu**: núcleo; **paj**: parênquima de células justapostas; **pfo**: parênquima fundamental do ovário; **pfr**: parênquima fundamental do receptáculo; **ri**: revestimento do lóculo; **x**: xilema. As réguas correspondem em **A**, **C**, **F** e **H** a 100 μm ; em **B** – **D** e **G** a 400 μm ; em **E** a 30 μm .

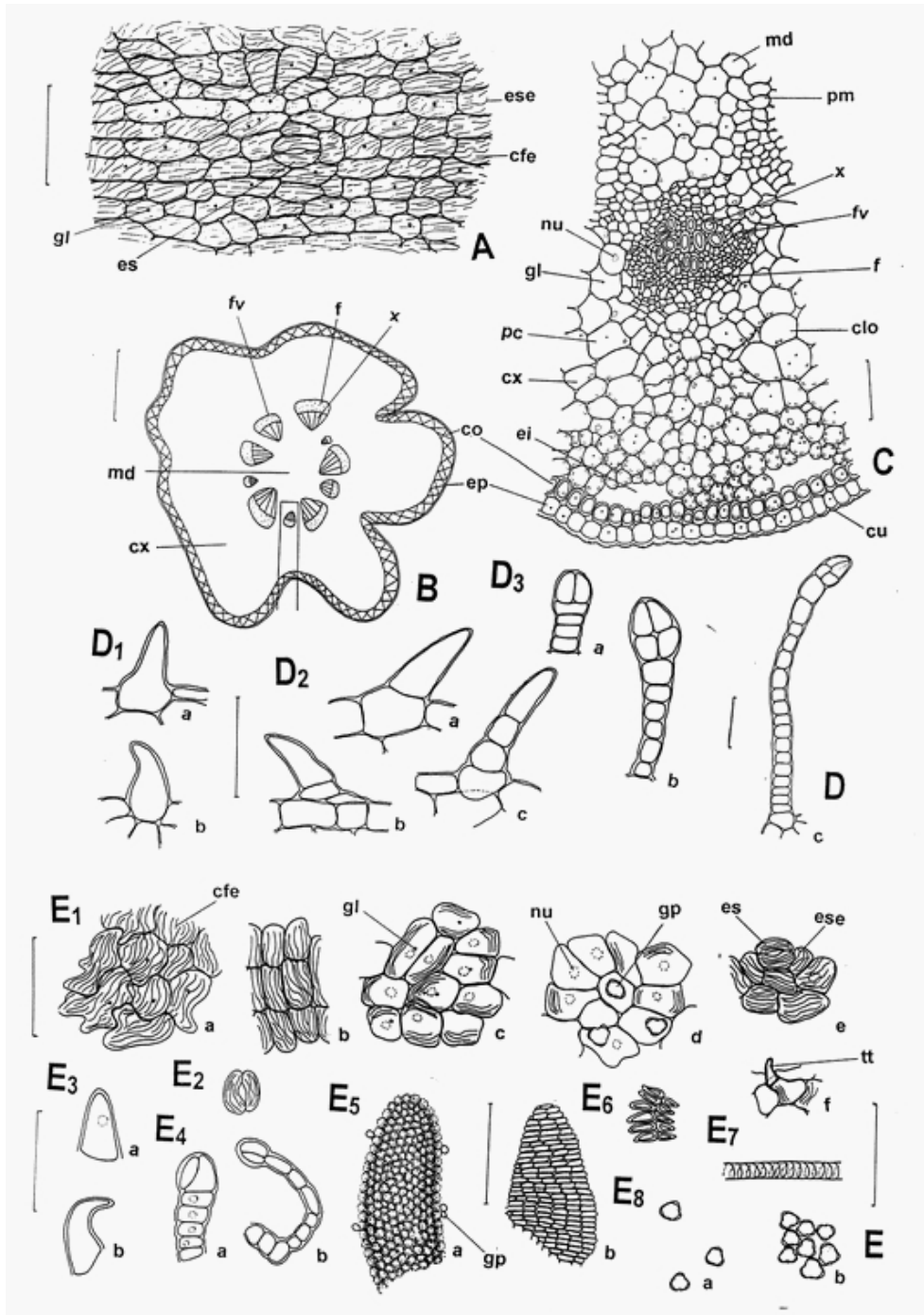


Figura 1.13 *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. - estruturas microscópicas observadas no pedicelo e no pó. **A.** detalhe de porção da epiderme do pedicelo, em vista frontal; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **es**: estômato; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **B.** esquema geral do pedicelo em secção transversal; **ep**: epiderme; **co**: colênquima; **f**: floema; **fv**: feixe vascular; **cx**: córtex; **md**: medula; **x**: xilema; **C.** detalhe de porção de pedicelo em secção transversal; **clo**: cloroplastídeo; **co**: colênquima; **cu**: cutícula estriada; **ei**: espaço intercelular; **ep**: epiderme; **f**: floema; **fv**: feixe vascular; **gl**: gota lipídica; **nu**: núcleo; **pc**: parênquima cortical; **pm**: parênquima medular; **x**: xilema; **D.** detalhe de tricomas ocorrentes em pedicelos; **D1.** a-b: tricomas tectores unicelulares; **D2.** a-c: tricomas tectores pluricelulares unisseriados; **D3.** a-c: tricomas glandulares com cabeça pluricelular; **E.** representações em detalhe do pó. **E1.** a-f: fragmentos de epiderme; **cfe**: célula fundamental da epiderme; **es**: estômato; **ese**: estrias epicuticulares; **gl**: gota lipídica; **gp**: grão de pólen; **nu**: núcleo; **tt**: tricoma tector; **E2.** células-guarda isoladas; **E3.** a-b: porções de tricomas tectores; **E4.** a-b: porções de tricomas glandulares com cabeça pluricelular; **E5.** fragmentos da antera; a. porção convexa; b. porção côncava; **gp**: grão de pólen; **E6.** fragmento da camada fibrosa de antera; **E7.** porção de elemento traqueal com espessamento helicoidal; **E8.** grãos de pólen; a. isolados; b. agrupados. As réguas correspondem em **A, C, D** e **E (E1 – E4, E6 – E8)** a 100 μm ; em **B** e **E (E5)** a 400 μm .

Após as avaliações macro e microscópicas, observou-se muita similaridade entre as espécies. Todas as diferenças macroscópicas encontradas foram agrupadas e estão mencionadas na Tabela A1 em Anexo, bem como as diferenças microscópicas (Tabela A2). A Tabela 1.2 apresenta um resumo das principais características detectadas que podem ser aplicadas no controle de qualidade destas matérias-primas vegetais inteiras e em pó.

Tabela 1.2 Principais diferenças macro e microscópicas detectadas na análise das flores de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schldl.

Estruturas	Caracteres	<i>Sambucus australis</i>	<i>Sambucus nigra</i>
MACROSCÓPICA			
FLORES	diâmetro	7,0 a 10,1 mm	3,0 a 5,0 mm
	quanto ao sexo	funcionalmente unissexuais	monoclinas
BRÁCTEAS	proeminência apical	presente	ausente
SÉPALAS	dentes marginais	ausentes	presentes
GINECEU	número de lóbulos no estigma	pentalobado	trilobado
	número de carpelos e loculos no ovário	pentacarpelar ou tetracarpelar, raro tricarpelar, pentalocular ou tetralocular, raro trilocular	tricarpelar, raro tetracarpelar, trilocular, raro tetralocular
MICROSCÓPICA			
BRÁCTEAS	forma das células fundamentais da epiderme	poligonal	alongadas, de diferentes formas
	classificação quanto aos estômatos	anfiestomáticas	hipoestomáticas
	idioblastos cristalíferos	ausentes	raros
SÉPALAS	forma das células fundamentais da epiderme	alongadas e possuem forma irregular e retangulares	tabular
	paredes das células fundamentais da epiderme	sinuosas em ambas as faces,	retilíneas a sinuosas
	idioblastos cristalíferos	ausentes	presentes
PÉTALA	idioblastos cristalíferos	ausentes	presentes

A necessidade de análises macro e microscópicas para detectar diferenças e semelhanças entre plantas de uma mesma espécie são evidentes principalmente tratando-se de espécies como *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*. A existência de descrições e ilustrações na literatura farmacognóstica e botânica, além da

presença das espécies em monografias farmacopéicas, também são fundamentais para a realização de análises corretas.

Pelo pequeno tamanho das flores, foram grandes as dificuldades encontradas para a obtenção de secções anatômicas que possibilitassem a visualização de todas as estruturas pretendidas na análise microscópica. Mesmo para a análise macroscópica, principalmente das flores de *Sambucus nigra*, para a qual não foi possível a obtenção de amostras frescas, encontraram-se dificuldades, pois após hidratadas, tornavam-se muito frágeis e de difícil manuseio.

Observando-se a Tabela A1, em Anexo, referente às diferenças macroscópicas, notou-se que o tamanho das estruturas em todas as partes das flores foram distintos. No entanto, em muitas delas, as medidas têm valores superpostos, não permitindo o uso exclusivo destes parâmetros para o controle de qualidade. Também é importante ressaltar que, apesar de a literatura consultada separar as duas espécies estudadas pelo número de lóculos no ovário (três para *Sambucus nigra* e cinco para *Sambucus australis*), verificou-se, no presente estudo, que podem ocorrer quatro lóculos em ambas as espécies, tornando novamente difícil a identificação.

Um bom caráter de distinção entre as espécies, detectado neste trabalho, foi a presença de dois tamanhos de filetes nas flores de uma mesma amostra, caracterizando *Sambucus australis*, ou a presença de apenas um tamanho de filetes, caracterizando *Sambucus nigra*. Apesar desta característica, e do número de lóculos no ovário, em geral, as flores das duas espécies são bastante semelhantes entre si, macroscopicamente.

Apesar da análise microscópica das flores de *Sambucus nigra* ter sido realizada com material seco, foram observadas características que possibilitaram a distinção das espécies. Entre estas destacam-se: a presença de idioblastos cristalíferos nas brácteas, sépalas e pétalas, a presença de endoderme no pedicelo em *Sambucus nigra* (apesar de este ser considerado contaminante), a localização dos estômatos nas brácteas e a forma das paredes das células fundamentais da

epiderme das sépalas. Nesse contexto, a presença de profissionais qualificados na realização destas análises é fundamental e imprescindível.

As características apresentadas demonstram que existe grande possibilidade da adulteração das amostras de *Sambucus nigra* por *Sambucus australis* e vice-versa, pois, na atualidade, são poucas as indústrias produtoras de fitoterápicos que possuem botânicos ou farmacêuticos especializados no setor de controle de qualidade da matéria-prima vegetal, antes que seja realizado o seu processamento.

Existe, é claro, a possibilidade de identificação de adulterantes através de análises químicas. Porém, tratando-se de pequenas indústrias ou até mesmo distribuidoras de material vegetal para reembalagem e comercialização de chás, isto torna-se complicado. Muitas vezes estas empresas não possuem condições de realizar ensaios refinados para o controle de qualidade e, com a presença de um profissional habilitado para caracterizar macro ou microscopicamente o material analisado, este controle de adulterações é facilitado.

Foi encontrado um relato que descreve a adulteração de amostras de *Sambucus nigra* por *Sambucus ebulus* L., que se caracteriza pelos pedicelos avermelhados, pétalas rosadas e estames com anteras vermelhas (HERBAL, 2000). Porém, as Farmacopéias Européia (EUROPEAN, 2002) e Portuguesa (FARMACOPEIA, 2002) indicam nas monografias de *Sambucus nigra* ensaios de análises químicas com esta outra espécie. Sendo assim, fica difícil determinar a verdadeira adulteração por *Sambucus ebulus*.

Com a análise do pó das flores de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis* foi possível a diferenciação microscópica. Entre as diferenças identificadas estão o tamanho do pólen e a presença de pedaços de tecidos da epiderme com os idioblastos cristalíferos e, macroscopicamente foram observados fragmentos dos dentes marginais presentes nas sépalas de *Sambucus nigra*. Estas análises podem então auxiliar no controle de qualidade do pó destas matérias-primas vegetais.

Quanto aos testes histoquímicos realizados para a identificação de amido e lipídios em amostras de flores de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*, foram positivos e muitas vezes auxiliaram na identificação destes compostos nas secções anatômicas elaboradas.

CAPÍTULO 2
AVALIAÇÃO QUÍMICA QUALI E QUANTITATIVA

2.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas ocorreram grandes avanços analíticos no âmbito de isolamento e identificação de constituintes químicos das espécies vegetais. Porém, raramente todos os constituintes presentes nos extratos das plantas podem ser identificados e caracterizados.

Além de existirem dificuldades de análise, o teor dos constituintes presentes nas plantas pode variar consideravelmente em função de fatores externos, incluindo: temperatura, umidade, luminosidade, nutrientes do solo, método de coleta, secagem, transporte, parte da planta usada, entre outros. Cada um desses fatores pode afetar diretamente a qualidade da matéria-prima vegetal e, conseqüentemente, o produto final e a eficácia clínica dos medicamentos fitoterápicos (CALIXTO, 2001a).

A determinação dos constituintes químicos, principalmente do marcador químico das espécies vegetais é de extrema importância na definição dos parâmetros necessários na padronização de metodologias para a avaliação da qualidade da matéria-prima vegetal e de medicamentos fitoterápicos. Segundo a resolução nº 48 (BRASIL, 2004a), marcador é o “componente ou classe de compostos químicos (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.) presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico”.

Para a análise das matérias-primas vegetais, muitos parâmetros são requeridos e devem ser considerados anteriormente à aplicação dos métodos desenvolvidos para a realização do controle de qualidade e determinação do marcador químico. Entre os principais fatores estão a proporção de planta : solvente extrator a ser utilizado, bem como a escolha do solvente ideal, o método de extração, calibração de material, entre outros. Após estas definições, o método de análise mais adequado deve ser selecionado de acordo com os constituintes presentes na planta, elegendo preferencialmente aquele que propicie maior rapidez

e simplicidade de análise, e que possibilite quantificação precisa dos compostos, principalmente do marcador.

Atualmente, muitas indústrias de fitoterápicos estão empregando métodos analíticos como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para avaliação do perfil químico e determinação do marcador para as espécies trabalhadas porém, quando esta técnica não é acessível parte-se para a quantificação de um grupo de constituintes por metodologias que, na maioria das vezes encontram-se descritas em compêndios oficiais como, por exemplo, a espectrofotometria na região do ultravioleta.

A técnica de CLAE vem sendo selecionada por apresentar uma variedade de parâmetros passíveis de modificação, pelo operador, para otimizar o procedimento de separação dos constituintes. Entre os principais fatores encontram-se os solventes que compõem a fase móvel, o tamanho e enchimento das colunas, a presença de diferentes tipos de detectores, alta rapidez de análise, repetibilidade e precisão dos resultados, além da facilidade na manipulação do equipamento e a presença de *softwares* modernos que possibilitam análises completas dos cromatogramas.

Aliados ao desenvolvimento de metodologias analíticas quantitativas utilizando CLAE estão os procedimentos de validação, onde órgãos regulamentadores como ICH (*International Harmonization Conference*, 1996), Farmacopéia Americana (*United States Pharmacopoeia Convention*; USP, 2005), e ANVISA (*Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, BRASIL; 2003) estabelecem normas para a sua realização, garantindo assim a confiabilidade nos resultados alcançados.

Podem ser encontrados na literatura um número significativo de trabalhos que apresentam métodos de quantificação de substâncias químicas em medicamentos utilizando CLAE que apresentam metodologia de análise validada (GÖREN *et al.*, 2004; NISHITANI & SAGESAKA, 2004; KOKOLETSI *et al.*, 2005). Por outro lado, para matérias-primas vegetais ou fitoterápicos, a publicação de trabalhos que

relatam o desenvolvimento e a validação de metodologias para a realização do controle de qualidade está em ascendência. Sendo assim, os parâmetros de performance analítica utilizados estão fundamentados naqueles utilizados para os medicamentos, segundo ICH (1996), SWARTZ & KRULL (1997), HONG & SHAH (2000), ANVISA (BRASIL, 2003), SHABIR (2003), RIBANI e colaboradores (2004), Farmacopéia Americana 28 (USP, 2005) são eles:

Especificidade / Seletividade – um método instrumental de separação que produza resposta para uma única substância de interesse, normalmente um dado elemento, pode ser chamado de específico e um método que produza resposta para vários compostos químicos com características em comum, seletivo. Apesar do termo mais adequado para a descrição do parâmetro seja seletividade, o ICH (1996) e a Farmacopéia Americana (USP, 2005) consideram especificidade como o termo correto. Então, especificidade traduz-se como a capacidade de medir exata e especificamente o analito de interesse na presença de outros componentes que podem ser esperados na amostra (cada um dos ativos, excipientes, impurezas e produtos de degradação bem como outros compostos de propriedades similares). Uma das maneiras para avaliação da especificidade para CLAE é utilizando detectores de arranjo de fotodiodos, que comparam o espectro de absorção de uma substância referência com a do pico obtido na separação da amostra e utiliza-se isto como indicação da pureza do composto. Se a especificidade não for assegurada, a linearidade, exatidão e precisão estarão comprometidas.

Linearidade – corresponde à capacidade de um método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada faixa de aplicação que deve possuir, no mínimo, cinco concentrações no intervalo de 80 – 120%. O comportamento dos resultados obtidos com a análise deve ser descrito por uma equação linear e avaliado por métodos estatísticos apropriados como, por exemplo, o cálculo da regressão pelos métodos dos mínimos quadrados e análise da variância.

Exatidão – indica o percentual de recuperação de um composto (substância referência, marcador) adicionado à uma amostra cuja concentração é conhecida. Para esta análise, devem-se executar no mínimo três níveis de concentração.

Precisão - é a medida de concordância entre valores experimentais obtidos que resultam da aplicação repetida do método à amostra homogênea. Usualmente é avaliada nos resultados o desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), que corresponde ao desvio padrão relativo (DPR). O ICH (1996) e a resolução n.º. 899 (BRASIL, 2003) concordam que a precisão pode ser medida em três níveis:

- Repetibilidade: medição de precisão entre ensaios com condições analíticas mantidas. A avaliação do resultado ocorre através de medições sucessivas em um curto período de tempo de uma mesma amostra, porém em diferentes preparações, como pela avaliação de seis determinações a 100% da concentração teórica da amostra, ou nove determinações em três níveis de concentração.
- Precisão Intermediária: expressa a variabilidade em longo prazo de um processo de determinação. Indica o efeito das variações dentro de um laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou equipamentos. É a mais representativa variabilidade dos resultados em um único laboratório e podem ser monitoradas as variáveis individuais dos analistas (rotina analítica). Expresso em DP ou DPR (DPR).
- Reprodutibilidade: refere-se a estudos colaborativos entre laboratórios, no sentido de reprodução dos resultados da metodologia de análise aplicada.

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) – o primeiro pode ser definido como a menor concentração do analito detectado em uma amostra, mas não necessariamente quantificada, enquanto que o LQ representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis, ambos sob as condições experimentais previamente estabelecidas. Podem ser calculados com dados obtidos do desvio padrão do

intercepto e da inclinação da curva de calibração, previamente construída com o composto de interesse. Outros meios para determinação do LD e LQ são aqueles baseados na avaliação visual em métodos não instrumentais e na relação sinal-ruído para procedimentos analíticos que exibem ruído de base.

Robustez – medida da capacidade do método de análise em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Para CLAE os parâmetros requeridos são variação do pH da fase móvel, variação da composição da fase móvel, diferentes lotes e temperatura das colunas e fluxo da fase móvel.

Na validação de metodologias analíticas cromatográficas o ICH (1996) e a Farmacopéia Americana (USP, 2005) reconhecem que não existe a necessidade de avaliar todos os parâmetros de performance analítica. O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais os parâmetros devem ser investigados (SWARTZ & KRULL, 1997) então, é de inteira responsabilidade do analista identificá-los para que os resultados gerados pela aplicação do método sejam de total confiabilidade quando o seu uso for rotineiro.

Aliado à validação de metodologias analíticas para as matérias-primas vegetais, um requisito importante para garantir a qualidade, segurança e eficácia da substância é o estudo da estabilidade química de seus constituintes. Na atualidade, CLAE é considerado método de escolha para investigar a estabilidade dos componentes de matérias-primas vegetais e seus possíveis produtos de degradação.

Estabilidade é definida como o tempo durante o qual um produto de origem sintética ou vegetal permanece íntegro em termos de identidade química, efetividade, potência, inocuidade e pureza. Alguns fatores ambientais podem afetar a integridade da amostra analisada, como a temperatura, luz e umidade, existindo também outros fatores relacionados ao próprio produto como pH, excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (NUDELMAN, 1976; WHO, 1996; MERCOSUL, 1996; LACHMAN *et al.*, 2001; MINISTÉRIO, 2003; BRASIL, 2004b;

MINISTÉRIO, 2004). Tratando-se de plantas medicinais, se os constituintes com atividade terapêutica não são conhecidos, um limite de variação de 10 % do valor do ensaio inicial é aceito (EMEA, 1999; LACHMAN *et al.*, 2001; HEIGL & FRANZ, 2003) e 5% para condições aceleradas de estabilidade, segundo a resolução n. 398 (BRASIL, 2004b), WHO (1996), Ministério da Saúde da Costa Rica (2003) e Ministério da Saúde de Cuba (2004).

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 1996) e o ICH (2003) descrevem que o tempo de conservação de um fármaco deve ser estabelecido levando-se em consideração as zonas climáticas em que um produto encontra-se disponível para a comercialização. Estes órgãos definem quatro diferentes zonas climáticas (Tabela 2.1) que são, segundo ANVISA (BRASIL, 2004b), espaços ou zonas geograficamente delimitadas de acordo com os critérios de temperatura e umidade aplicáveis quando da realização de estudos de estabilidade.

Tabela 2.1 Apresentação de definição das zonas climáticas definidas pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1996):

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

Para os produtos encontrados nas zonas III e IV que, se destinados ao mercado mundial, o estudo da estabilidade deve realizar-se nas condições da zona IV (MERCOSUL, 1996; WHO, 1996), pois precisa-se levar em conta o efeito nocivo das condições climáticas adversas existentes em certos países, principalmente nos casos de exportação. O Brasil está situado na Zona Climática IV (quente/úmida) (BRASIL, 2004b).

Órgãos regulamentadores responsáveis pelo estabelecimento de diretrizes para a realização destes estudos da estabilidade, os classificam em (ICH, 1996; WHO, 1996; BRASIL, 2004b):

Estudos da estabilidade a longo prazo - são estudos utilizados para determinar, a longo prazo, as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas do produto, durante e além do prazo de armazenamento. Seus resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e prever as condições de armazenamento.

Estudos da estabilidade acelerada – são realizados para monitorar a aceleração da velocidade de degradação química ou física de uma substância e / ou alterações de características da forma farmacêutica, quando são empregadas condições extremas de armazenamento, com o propósito de prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento em sua embalagem primária definitiva. Os resultados nem sempre podem prever mudanças físicas e devem ser sustentados por estudos de estabilidade a longo prazo.

Os testes para o estudo da estabilidade acelerada devem ser conduzidos, para a zona IV, nas condições de temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa (U.R.) em 6 meses e como alternativa, também podem ser utilizados $50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $90\% \pm 5\%$ em 3 meses (MERCOSUL, 1996; BRASIL, 2004b).

Em alguns casos, dados sobre estabilidade dos compostos farmacológicos ativos ou marcadores químicos de materiais vegetais são documentados nas suas respectivas monografias. Pela escassez destes dados, principalmente para material de origem vegetal, tornam-se indispensáveis estes estudos para obter informações extensivas sobre estabilidade destas substâncias (HEIGL & FRANZ, 2003).

2.2 OBJETIVOS

No que se refere à avaliação química, os objetivos deste trabalho consistem em avaliar a matéria-prima vegetal, constituída por flores de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. quanto aos aspectos:

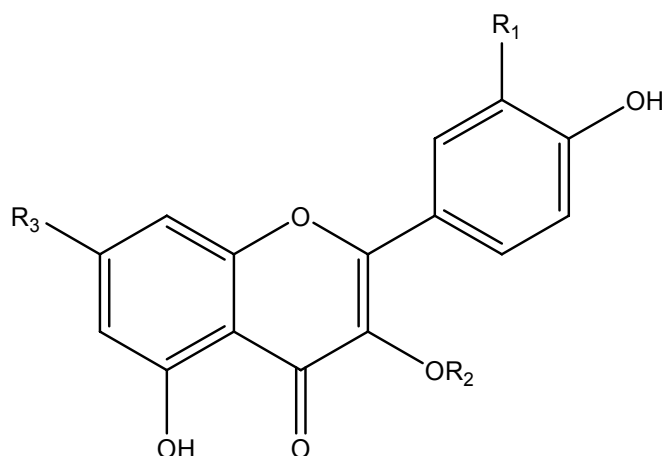
- perda por dessecação;
- quantidade de materiais estranhos (contaminantes);
- teor de cinzas totais;
- análise qualitativa da droga por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência a fim de estabelecer o marcador químico para a espécie;
- desenvolvimento e validação de metodologia de análise quantitativa do marcador químico utilizando CLAE;
- análise quantitativa por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV/VIS) com a determinação do teor de flavonóides totais;
- avaliação preliminar da estabilidade;
- análise (UV/VIS e CLAE) de diferentes amostras adquiridas comercialmente, fornecidas pelo laboratório de Farmacognosia desta Faculdade e/ou amostras coletadas.

2.3 REVISÃO DA LITERATURA

2.3.1 Estudos químicos em *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schldl.

As flores de *Sambucus nigra* são constituídas, especialmente, por flavonóides (> 3,0%) principalmente glicosilados como rutina (1,5% a 3,5%), considerado majoritário (CHARAUX, 1924; DAVIDECK, 1961; SHOAIB *et al.*, 1972; NEWALL *et al.*, 2002), hiperosídeo, isoquercitrina, quercitrina, astralgina, canferol-7-ramnosídeo, isoramnetina-3-glucosídeo e isoramnetina-3-rutinosídeo; aparecendo em menor quantidade as agliconas quercetina e canferol (Tabela 2.2) (ALICE *et al.*, 1990; LAMAISON *et al.*, 1991; BRITISH, 1992; SEITZ *et al.*, 1992; WAGNER & BLADT, 1996; D'AMÉLIO, 1999; EVANS, 2002; NEWALL *et al.*, 2002). SEITZ e colaboradores (1992) identificaram flavanonas como naringina e hesperidina.

Tabela 2.2 Flavonóides encontrados na constituição química das flores de *Sambucus nigra* L.



Composto	R ₁	R ₂	R ₃
Rutina	-OH	-ramnoglucose	-OH
Isoquercitrina	-OH	-glucose	-OH
Hiperosídeo	-OH	-galactose	-OH
Quercitrina	-OH	-ramnose	-OH
Astralgina	-H	-glucose	-OH
Canferol-7-ramnosídeo	-H	-H	-ramnose
Isoramnetina-3-glucosídeo	-OCH ₃	- glucose	-OH
Isoramnetina-3-ramnogluco-sídeo	-OCH ₃	-ramnogluco-se	-OH
Quercetina	-OH	-H	-OH
Canferol	-H	-H	-OH

Para flores desta espécie também é descrita a presença de óleos (0,05% a 0,14%) onde, entre as 80 substâncias identificadas estão, em grande concentração, os ácidos graxos livres (66%), principalmente os ácidos linoleico, linolênico e palmítico (38%), seguido de 7,2% de alcanos (C₁₄ – C₃₁) (TOULEMONDE & RICHARD, 1983; BRITISH, 1992; HERBAL, 2000; PDR, 2000; BRUNETON, 2001; EVANS, 2002; REVIEW, 2002) entre outros componentes como éteres, óxidos, cetonas, aldeídos, álcoois e ésteres (TOULEMONDE & RICHARD, 1983; NEWALL *et al.*, 2002).

Triterpenos como α - e β - amirina (1%), ocorrendo como ésteres de ácidos graxos, ácidos ursólico e oleanólico (0,85%) e 20 β -hidroxiursólico (BRITISH, 1992;

ALONSO, 1998; D'AMÉLIO, 1999; HERBAL, 2000; BRUNETON, 2001; CZYGAN *et al.*, 2001; EVANS, 2002; NEWALL *et al.*, 2002), lupeol, cicloartenol, 24-metilenocicloartenol e cicloeucalenol (WILLUHN & RICHTER, 1977) também fazem parte da composição química das flores de *Sambucus nigra*, bem como os esteróis sitosterol, estigmasterol e campesterol (WILLUHN & RICHTER, 1977; HERBAL, 2000; CZYGAN *et al.*, 2001; NEWALL *et al.*, 2002). Outros compostos fenólicos como ácidos clorogênico (3%), caféico, ferúlico e *p*-cumárico e seus ésteres β -glucosilados (BRITISH, 1992; ALONSO, 1998; D'AMÉLIO, 1999; HERBAL, 2000; EVANS, 2002; NEWALL *et al.*, 2002), sambunigrina (ALONSO, 1998; EVANS, 2002) e taninos também são descritos para a espécie. A presença de mucilagem, pectina, açúcares, minerais (8 – 9% potássio), plastocinina (proteína) igualmente foi relatada (ALICE *et al.*, 1990; ROMBI, 1991; BRITISH, 1992; ALONSO, 1998; D'AMÉLIO, 1999; HERBAL, 2000; EVANS, 2002; NEWALL *et al.*, 2002).

Por outro lado, as flores da espécie *Sambucus australis* apresentam poucos estudos quanto à constituição química, sendo relatados flavonóides do tipo 3-O-monoglicosídeo de diidroflavonol, 3,7-O-diglicosídeo de flavonol, isoquercitrina, rutina e quercetina, ácidos caféico e clorogênico (ALICE *et al.*, 1990). Os dois primeiros constituintes citados, encontrados em extratos metanólicos, são considerados pelos autores como um dos pontos de diferenciação entre as espécies *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*.

Segundo ALICE e colaboradores (1991), em *screening* realizado com amostra de *Sambucus australis*, foi possível identificar a presença de flavonóides em grande quantidade, esteróis e triterpenos em menor quantidade e ausência de taninos.

Parâmetros farmacognósticos utilizando tintura-mãe da espécie nativa e da espécie europeia foram estabelecidos por MACIEL & BRANDÃO (1998). Estes determinaram perda por dessecação, cinzas totais, determinação da presença de taninos, flavonóides e triterpenos utilizando testes reativos e caracterização das tinturas-mãe quanto a densidade, teor alcoólico, pH e resíduo seco total. Os valores obtidos para as duas espécies apresentaram diferenças significativas, observando

também a presença de apenas traços de taninos em *Sambucus australis*, enquanto que estes estão presentes na outra espécie.

2.3.2 Análises cromatográficas e espectrofotométricas

Relatos científicos de análises cromatográficas e espectroscópicas para os extratos de flores de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis* são escassos. Em farmacopéias, como citado anteriormente, são encontrados somente métodos de doseamento utilizando espectroscopia na região do ultravioleta, visando a determinação do teor de flavonóides totais, calculados como isoquercitrina, em monografia de *Sambucus nigra*, porém utilizando a espécie *Sambucus ebulus* para as análises químicas (DAB 10, 1994; EUROPEAN, 2002; FARMACOPÉIA, 2002).

No ano de 1992, PIETTA e colaboradores analisaram as espécies *Calendula officinalis* L e *Sambucus nigra* utilizando CLAE e cromatografia capilar eletrocínética micelar (MECC). Para *Sambucus nigra* foi possível realizar a separação dos flavonóides glicosilados presentes em extratos hidrometanólicos (rutina, isoquercitrina, astralgina, entre outros) utilizando 2-propanol:THF:água (12:4:84) como fase móvel e verificou-se também que a MECC foi uma técnica de análise complementar à CLAE.

MALEŠ E MEDIC-ŠARIĆ (1999) investigaram a constituição de extratos metanólicos das flores de *Sambucus nigra* por cromatografia em camada delgada (CCD). Neste estudo foram testados dez diferentes sistemas eluotrópicos a fim de estabelecer o melhor para análise dos compostos encontrados. Através da construção de um dendograma relacionando os sistemas e os tempos de retenção dos flavonóides e ácidos fenólicos analisados, os autores selecionaram dois sistemas como sendo os melhores para separação: acetato de etila:metanol:ácido fórmico:água (100:13,5:2,5:10) e acetato de etila:ácido fórmico:água (8:1:1). A *British Herbal Pharmacopoeia* (BRITISH, 1996) e a Farmacopéia Européia (EUROPEAN, 2002) citam análises de CCD para os extratos das flores de *Sambucus ebulus* em monografia de *Sambucus nigra*, utilizando um sistema cromatográfico com acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:27) e a Farmacopéia

Portuguesa (2002) utiliza ácido fórmico:água:metiletilcetona:acetato de etila (10:10:30:50) para tal análise. WAGNER & BLADT (1996) empregam o mesmo sistema das Farmacopéias Européia e da Herbária Britânica, citadas anteriormente, porém utilizando a espécie *Sambucus nigra*.

Outras metodologias analíticas também foram encontradas para análise dos extratos das flores de *Sambucus nigra* como cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV e fotodiodos (CLAE/DAD) (LAMAISON *et al.*, 1992) e eletroforese capilar (SEITZ *et al.*, 1992). No primeiro método citado, os autores realizaram a identificação de dois glicosídeos de isoramnetina utilizando UV e CLAE/DAD em extrato das flores; e no segundo os autores desenvolveram um método validado de eletroforese capilar que foi utilizado para a quantificação dos flavonóides presentes na solução extrativa das flores.

Para a espécie *Sambucus australis* existe somente um relato onde os autores verificaram a presença de compostos polifenólicos em soluções extrativas das flores, comparativamente com *Sambucus nigra*. Nesta descrição os autores analisaram amostras das flores extraídas em Soxhlet, com solventes em polaridade crescente, empregando técnicas de cromatografia em papel e em camada delgada bidimensional (ALICE *et al.*, 1990).

2.3.3 Estudo da estabilidade

O único estudo que referenda a avaliação da estabilidade para *Sambucus nigra* foi realizado por HEIGL & FRANZ (2003), utilizando diferentes tipos de embalagens primárias e granulometrias. O teste empregado foi o de estabilidade de longa duração (~27 meses – 25°C / 60% U.R.) com a planta inteira e pulverizada, utilizando, para avaliação do estudo, a determinação do teor de flavonóides totais segundo a Farmacopéia Européia e estudos com CLAE (EUROPEAN, 2002). Foi constatada uma redução no teor de flavonóides totais e CLAE acima dos limites permitidos (10%) após o período de 12 meses. Além disso, esta análise demonstrou um desenvolvimento não-linear no método espectrofotométrico que, segundo os autores, ocorreu devido à insuficiente reprodutibilidade do método analítico aplicado

ou devido a problemas de dissolução dos flavonóides durante o processo de extração.

Após análise dos dados encontrados na literatura para ambas espécies, constatou-se a escassez de estudos relativos a análise do conteúdo de flavonóides totais, bem como para identificação do marcador e constituinte majoritário além do desenvolvimento de metodologias analíticas validadas. Para a espécie europeia, mesmo com presença de monografias nas Farmacopéias Alemã (DAB 10, 1994), Portuguesa (FARMACOPEIA, 2002), Europeia (EUROPEAN, 2002), Herbária Britânica (BRITISH, 1996), entre outras, além de citações científicas, não existem dados referentes ao desenvolvimento de um método de análise validado utilizando CLAE e testes de estabilidade acelerada analisando possíveis produtos de degradação.

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1 Material vegetal

Os materiais vegetais utilizados para a realização das análises foram, principalmente, a amostra número **26** para *Sambucus nigra* (Tabela 1.1) e para *Sambucus australis*, a amostra número **10** (ICN n.137497) (Tabela 1.1). A descrição das demais amostras coletadas, adquiridas no comércio e / ou fornecidas pelo laboratório de Farmacognosia desta Faculdade, também analisadas, encontram-se na Tabela 1.1.

2.4.2 Determinação de perda por dessecação

Para esta análise foram utilizados os métodos gravimétrico e de secagem com balança de infravermelho a fim de verificar sua equivalência. A comparação dos métodos de perda por dessecação foi realizada utilizando somente a amostra de *Sambucus nigra* devido ao fato de estar em maior quantidade. Como ferramenta de análise estatística aplicou-se o teste “t” de *Student*. Após a definição do método a ser utilizado, este foi aplicado à totalidade das amostras obtidas.

Método gravimétrico (F.B. 4 ed., 1988)

Para realização deste ensaio, utilizou-se a técnica descrita para a determinação de perda por dessecação presente na Farmacopéia Brasileira 4 ed. (1988). A análise foi feita em triplicata e os resultados foram expressos em perda de massa percentual.

Método de secagem em balança de infravermelho

Pesou-se cerca de 1,0 g do material vegetal seco e pulverizado, em pratos de alumínio previamente dessecados (105°C / 1 hora). Para este método utilizou-se uma balança acoplada ao sistema de secagem por irradiação infravermelha

(termobalança - Top Ray) com rampa de aquecimento para 105°C, até o peso permanecer constante no tempo de 10 segundos. A análise foi feita em triplicata e os resultados foram fornecidos automaticamente pela balança, em perda de massa percentual.

2.4.3 Determinação de materiais estranhos (contaminantes) (F.B. 4 ed., 1988)

Como foi citado no Capítulo 1, segundo as Farmacopéias Alemã (DAB 10, 1994), Européia (EUROPEAN, 2002) e Portuguesa (FARMACOPEIA, 2002), os materiais considerados estranhos em amostras de *Sambucus nigra* são os pedicelos grosseiros e outros elementos estranhos. Também existem limites para a presença de amostra de flores com cor alterada, enegrecida.

O ensaio foi realizado com 5 g de três amostras de cada espécie, tomadas de acordo com a quantidade disponível individualmente, utilizando o método de quarteamento, de acordo com o especificado na Farmacopéia Brasileira 4 ed. (1988). O resultado foi expresso em percentual de materiais estranhos.

2.4.4 Determinação de cinzas totais (F.B. 4 ed., 1988)

Este ensaio foi realizado de acordo com as especificações da Farmacopéia Brasileira 4 ed. (1988). Três amostras de cada espécie foram avaliadas em triplicata e os resultados foram obtidos calculando-se a porcentagem de resíduo em relação ao material vegetal seco.

2.4.5 Análise qualitativa

2.4.5.1 Avaliação do perfil cromatográfico utilizando cromatografia em camada delgada

Na tentativa de reproduzir e / ou desenvolver condições cromatográficas similares às aquelas citadas por WAGNER & BLADT (1996), MALEŠ & MEDIĆ-ŠARIĆ

(1999) e encontradas em Farmacopéias, a análise cromatográfica empregada para verificar a presença de flavonóides nas soluções extrativas de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis* foi feita utilizando-se um sistema de solventes composto por uma mistura de acetato de etila (NUCLEAR), ácido fórmico (SYNTH), ácido acético glacial (NUCLEAR) e água destilada (100:11:11:27).

As amostras foram preparadas pesando-se 0,5 g de flores pulverizadas das duas espécies e aquecendo-as sob refluxo com 5 ml de metanol (NUCLEAR) por 30 minutos. Estas foram filtradas, concentradas em evaporador rotatório e ressuspensas com 5 ml de metanol. As amostras foram aplicadas em cromatofolhas de gel de sílica 60 GF₂₅₄ (MERCK) e submetidas ao sistema proposto. Após secagem das placas, as manchas foram observadas sob lâmpada de luz ultravioleta (254 e 366 nm), fazendo a revelação por aspensão com anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento a 105°C.

Para serem utilizadas como referência, foram preparadas soluções metanólicas das substâncias rutina, isoquercitrina, quercitrina, hiperosídeo e quercetina de concentração aproximada a 0,01% (p/v), submetendo-os às mesmas condições das amostras.

Os volumes de amostra e de substância referência aplicadas foram aproximadamente 10 µl.

2.4.5.2 Avaliação do perfil cromatográfico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência

Identificação dos constituintes e do marcador químico

Preparo das soluções extrativas

Inicialmente foram feitas soluções extrativas a 5% (p/v), com as amostras pulverizadas (**10** e **26**) utilizando uma solução hidroetanólica (etanol:água; 80:20)

como extrator. O método extrativo utilizado foi turbólise com o equipamento Ultra Turrax (T8 S8N-5G / IKA® WERKE) na velocidade 3, durante 5 minutos. Após este procedimento, as soluções foram filtradas sob vácuo, e seu volume retomado para 10 ml. Uma parte da solução foi filtrada com membrana hidrofílica de fluoreto de polivilideno (PVDF; Millipore; 0,45 µm; 13 mm) e diluída até concentração de 2,5 mg/ml com uma solução de água ultrapura (MilliQ® / Millipore):acetonitrila (grau analítico para CLAE / MERCK) (9:1). Procedeu-se a injeção de 10 µl das amostras, em triplicata, para verificação dos perfis cromatográficos.

Parâmetros cromatográficos

Após diversas tentativas para determinação de um sistema adequado para realizar a separação dos principais constituintes e quantificação do marcador químico, foram definidos os parâmetros descritos na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 Parâmetros cromatográficos para a análise das soluções extrativas das espécies *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltld..

Características	Descrição
Cromatógrafo	Waters Alliance 2695
Detector	Fotodiodos Waters PDA 996 Waters UV/VIS 2487
Coluna	Symmetry® C18 Waters ¹
Pré-coluna	Lichrospher® Merck ²
Sistema de eluição	Gradiente linear
Fase móvel	A) ACN ³ : Água ⁴ : TFA ⁵ (5:95:0,01) B) ACN ³ : TFA ⁵ (100:0,01)
Vazão	0,7 ml/min
Volume de injeção	10 µl
Comprimento de onda	200-400 nm (CLAE/DAD) 357 nm (CLAE/UV)
Sensibilidade de detecção	0,05 AUFS

¹ Dimensões da coluna / Tamanho de partícula: 4,6 x 75 mm / 3,5 µm

² Dimensões da pré-coluna / Preenchimento: 10 x 4 mm / Bondapak® Waters C18 (37-55 µm)

³ ACN – Acetonitrila

⁴ Água ultrapura

⁵ Ácido Trifluoroacético (NUCLEAR)

A fase móvel utilizada para a análise, constituída de solventes com alto grau de pureza como acetonitrila, água ultrapura e ácido trifluoroacético (TFA), foi filtrada previamente através de membrana (Millipore; 0,45 μm) e desaerada durante 10 minutos em banho de ultra-som. O sistema utilizado foi gradiente linear e encontra-se descrito na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 Sistema em gradiente linear utilizado para desenvolvimento do método de CLAE.

Tempo (minutos)	A (%)	B (%)
0	90	10
7	70	30
8	0	100
11	0	100
12*	90	10
15*	90	10

* O intervalo de 12 a 15 minutos foi inserido no sistema para ocorrer o restabelecimento das condições iniciais de análise.

A eluição dos constituintes foi monitorada por *Software Empower* e foi feita coeluição das amostras e de substâncias químicas de referência, necessárias para identificação e determinação do composto utilizado como marcador químico, bem como para inferir a provável constituição flavonoídica das soluções extrativas. As substâncias de referência utilizadas foram rutina, isoquercitrina, quercitrina, hiperosídeo, quercetina e canferol, também responsáveis por algumas atividades biológicas indicadas na literatura.

Para a identificação dos compostos também foram realizadas comparações dos espectros de ultravioleta adquiridos pela utilização do CLAE/DAD e sobreposição dos cromatogramas.

Os valores máximos de absorção do pico do marcador químico identificado foram observados para a realização das análises de quantificação, que se deram em cromatógrafo com detector UV/VIS fixo.

2.4.6 Análise quantitativa

Curva de calibração para a substância química de referência (SQR)

A construção da curva de calibração foi elaborada com a SQR relativa ao marcador químico identificado previamente pela análise preliminar dos cromatogramas obtidos com as soluções extrativas das plantas elaboradas como indicado no item 2.4.5.2, utilizando o método cromatográfico descrito no mesmo item.

Foi preparada uma solução-mãe com a SQR com concentração final de 50 µg/ml, e construída uma curva de calibração utilizando oito níveis de concentração. A faixa linear selecionada foi suficiente para conter os dados necessários para posterior quantificação das análises das soluções extrativas provenientes do teste de estabilidade para ambas espécies. Todas as soluções preparadas foram filtradas com membrana em PVDF (0,45 µm) e injetadas em triplicata utilizando os parâmetros cromatográficos descritos no item 2.4.5.2. Este experimento foi realizado em três dias consecutivos.

Após a integração das áreas dos picos referentes à SQR, foram calculadas as médias das injeções. Estas foram utilizadas para a construção de um gráfico de área *versus* concentração das soluções preparadas com a substância referência, obtendo-se três curvas respostas para a SQR. Posteriormente, através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, foi determinada a equação da reta e o coeficiente de regressão (r^2) para cada curva e para a média das três curvas verificando sua validade através da análise estatística de variância (ANOVA).

Preparo das soluções extrativas

Após a definição da técnica de análise cromatográfica com um extrato preliminar, foram realizados alguns testes para verificação da melhor proporção planta:solvente, avaliação do solvente extrator (proporção de solvente orgânico) e da equivalência do método de extração (turbólise / maceração), utilizando as amostras

10 e 26, a fim de obter um extrato adequado para a quantificação dos constituintes presentes nas amostras. Todas as soluções finais preparadas a seguir foram filtradas com membrana em PVDF (0,45 μm), injetadas em triplicata no cromatógrafo, utilizando o método analítico descrito no item 2.4.5.2.

Para o primeiro aspecto foram pesadas diferentes quantidades do material vegetal de ambas espécies submetendo-as, em duplicata, à metodologia de extração descrita no item 2.4.5.2 para preparação das soluções extrativas.

No que se refere ao segundo aspecto, foram testadas diferentes proporções do solvente extrator etanol:água (0:100, 20:80, 50:50, 80:20, 100:0), utilizando ambas espécies com a metodologia empregada (item 2.4.5.2), cabe salientar, o resultado de quantidade de planta ideal obtido com a análise anterior para preparação das soluções extrativas.

Para verificação do último objetivo foram comparados os métodos de turboextração (velocidade 3, durante 5 minutos) e maceração estática durante 7 dias (pesou-se a planta seca e pulverizada, submetendo-a ao solvente, durante o período estabelecido). Foram utilizadas, para a realização do teste, as condições pré-estabelecidas após a realização dos testes para massa e solventes ideais, somente para a espécie *Sambucus nigra*.

Todos os resultados obtidos com os testes foram observados através da diferenciação da integração das áreas do pico selecionado como marcador químico, bem como pela comparação dos teores encontrados para esta substância, utilizando a equação da reta da curva de calibração construída com a SQR.

2.4.6.1 Validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência

Para a validação do método de análise cromatográfica para as soluções extrativas das espécies foram utilizados os parâmetros cromatográficos estabelecidos no item 2.4.5.2, porém fazendo-se uso do cromatógrafo Waters Alliance 2695 com detector UV/VIS Waters 2487. O comprimento de onda

selecionado para a leitura das amostras foi obtido após a definição do marcador químico.

A elaboração das soluções extrativas, utilizadas para a realização da validação da metodologia, foi feita de acordo com os resultados finais obtidos com o item 2.4.6, com concentrações teóricas finais de 25 mg/ml (**SN** e **SA**) e, partindo destas foram realizadas todas as diluições pertinentes a cada parâmetro validado.

Parâmetros para validação

Os parâmetros utilizados para a validação do método de CLAE foram fundamentados nas normas estabelecidas pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 1996), HONG & SHAH (2000), Farmacopéia Americana (USP, 2005) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) resolução n.º 899 (BRASIL, 2003), descritos a seguir:

Especificidade

A especificidade foi determinada após a injeção de diluições das amostras de **SN** e **SA** (25 mg/ml), denominadas **SNN** e **SAA** (concentrações teóricas finais de 2,5 mg/ml), previamente filtradas com membrana em PVDF (0,45 µm), em cromatógrafo Waters Alliance 2695 com detector de fotodiodos Waters PDA 996, para verificar a pureza do pico selecionado como marcador químico, utilizado como referência.

Linearidade

Foi construída, para cada amostra das espécies, uma curva de linearidade, contendo sete níveis de concentrações em cada uma, contemplando a faixa de 70% a 130% em relação à concentração teórica das amostras diluídas **SNN** e **SAA**. Foram realizadas três determinações para cada ponto das curvas, sendo as soluções previamente filtradas com membrana em PVDF (0,45 µm).

O resultado da média das três determinações foi analisado construindo uma curva de concentração *versus* área do pico do marcador químico, sendo observados o coeficiente de regressão (r^2), a equação da reta, obtida pelo método de mínimos quadrados e realizou-se a análise estatística de variância da regressão (ANOVA).

Exatidão

Foi determinada através do teste de recuperação. Foram preparadas diluições a partir de **SNN** e **SAA** com concentrações teóricas finais de 1,25 mg/ml, denominadas **SNN1** e **SAA1**. Nestas, foram adicionadas alíquotas de uma solução de 50 µg/ml preparada com a SQR (item 2.4.6), em três níveis de concentração, obtendo assim extratos fortificados. Concomitantemente foram injetadas as soluções **SNN1** e **SAA1**, sem a presença da SQR, a fim de obter os dados necessários para a realização dos cálculos de percentual de recuperação.

Todas as soluções foram preparados em triplicata, previamente filtradas com membrana em PVDF (0,45 µm) e, cada uma, injetada em triplicata.

Os resultados obtidos após a realização dos testes de recuperação foram submetidos a equação 2.1 descrita abaixo:

Equação 2.1 Cálculo utilizado para determinação do percentual de recuperação do marcador químico.

$$R\% = \frac{[(C_F - C_A)]}{C_P} \cdot 100$$

Onde:

C_F = concentração do marcador químico no extrato fortificado (µg/ml);

C_A = concentração do marcador químico na solução extrativa (SNN e SAA) (µg/ml);

C_P = concentração da alíquota da solução da SQR adicionada (µg/ml).

Precisão

- Repetibilidade

Para realização deste teste, foram feitas seis determinações a 100% preparando as soluções **SNN** e **SAA**, em triplicata, previamente filtradas com membrana em PVDF (0,45 μm), e injetadas em um mesmo dia. O valor para este resultado pode ser considerado também como a avaliação da precisão intermediária intra-dia onde a média e o DP foram calculados, avaliando finalmente o DPR entre as seis diluições.

- Precisão Intermediária

Este procedimento foi realizado durante cinco dias consecutivos onde, a cada dia, foram preparadas três diluições de **SNN** e **SAA**. Estas soluções foram filtradas com membrana em PVDF (0,45 μm) e injetadas em triplicata. Para a obtenção dos resultados para a precisão intra-dia (avaliado também com a repetibilidade), a média, o DP e o DPR para cada dia foram calculados. Para a avaliação da precisão entre-dias, partiu-se dos valores das médias dos resultados para cada dia da precisão intra-dia, obteve-se uma média geral e calculou-se o DP, obtendo-se também o DPR.

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Estes dados foram obtidos após a construção da curva de calibração para a substância referência (item 2.4.6), sendo determinados pelas equações 2.2 (ICH, 1996; USP 28, 2005; BRASIL, 2003):

Equação 2.2 Cálculo para determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

$$LD = \frac{(3,3 \cdot S)}{I}$$

$$LQ = \frac{(10 \cdot S)}{I}$$

Onde:

S = desvio padrão médio do intercepto;

I = inclinação média.

Robustez

As amostras **SNN** e **SAA** foram preparadas, filtradas com membrana em PVDF (0,45 µm) e injetadas em triplicata. Os parâmetros avaliados para constatar a susceptibilidade do método frente a variações nas condições cromatográficas sobre a determinação quantitativa do marcador químico foram:

Tabela 2.5 Parâmetros analíticos modificados para a realização do teste de robustez.

Parâmetros	Atual	Alterado
Coluna Cromatográfica	Symmetry® C18 Waters (3,5µm; 4,6 x 75 mm)	Nova Pak® C18 Waters (4µm; 3,9 x 150 mm)
Fluxo	0,7 ml / min.	0,9 ml / min.
Fase móvel	A) ACN : Água : TFA (5:95:0,01)	A) ACN : Água : TFA (10:90:0,01)

2.4.7 Determinação do teor de flavonóides totais

A técnica descrita a seguir foi utilizada a fim de determinar o teor de flavonóides totais, após hidrólise, calculados como quercetina. As amostras foram preparadas em triplicata, avaliando o DP e o DPR.

Cerca de 0,1 g de cada amostra das flores pulverizadas foram inseridas em balão de fundo redondo, juntamente com 0,25 ml de metanamina (MERCK), 0,5 ml de ácido clorídrico concentrado (SYNTH) e 10 ml de acetona P.A. (QUIMEX), volumetricamente adicionados, e submetidas a refluxo, em banho-maria durante 30 minutos. Após este período as amostras foram filtradas utilizando funil de vidro e

algodão, para balão volumétrico de 25 ml, retornando o algodão com o resíduo, juntamente com 7 ml de acetona P.A., para o refluxo por mais 10 minutos. Este último procedimento foi repetido duas vezes. Após as três filtrações para o balão volumétrico, o volume de 25 ml foi completado com acetona. Uma alíquota volumétrica de 10 ml desta solução acetônica, 10 ml de água destilada e 10 ml de acetato de etila P.A. (NUCLEAR) foram transferidos para funil de separação onde foi retirada a fração de orgânica e reservada. O procedimento foi repetido duas vezes, porém adicionando-se 6 ml de acetato de etila P.A. para cada extração. A fração orgânica total foi transferida para o funil de separação onde foram adicionados 15 ml de água destilada (repetido por duas vezes), transferindo a fração de orgânica final para um balão volumétrico de 25 ml, completando o volume com o mesmo solvente, obtendo-se uma solução final de acetato de etila (**SAE**).

Análise por espectrofotometria na região do ultravioleta

Complexação com Cloreto de Alumínio

Transferiu-se, volumetricamente, 10 ml da **SAE** para um balão volumétrico de 25 ml, adicionando-se volumetricamente 1 ml de uma solução metanólica de cloreto de alumínio 2% (p/v) e seu volume final completado com uma solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v), previamente preparados, obtendo-se a **SL**. Simultaneamente, foi preparada uma solução comparativa (**SC**), transferindo-se volumetricamente 10 ml da **SAE** para um balão volumétrico de 25 ml, completando o volume com a solução metanólica de ácido acético a 5%.

Leitura das Amostras

Decorridos 30 minutos, procedeu-se a leitura, em triplicata, das amostras, em espectrofotômetro UV/vis Hewlett Packard, modelo 84151A Diode Array Spectrophotometer, utilizando a **SC** como branco, no comprimento de onda de 425 nm. O resultado obtido foi relativo ao teor de quercetina ($A^{1\%}_{1\text{cm}} = 500$) encontrado, de acordo com a equação 2.3.

Equação 2.3 Cálculo para determinação do teor percentual de quercetina.

$$Q = \frac{A \cdot 15625}{500 \cdot m \cdot (100 - t)} (\%, m / m)$$

Onde:

A= absorvância (nm);

m = massa da amostra (g);

t = perda por dessecação (%).

Análise da solução final de acetato de etila (SAE) utilizando CLAE

Transferiu-se 3 ml de cada **SAE** obtida para tubos de vidro a fim de eliminar o solvente em evaporador rotatório. Após este procedimento, os resíduos obtidos foram retomados em 2 ml de acetonitrila e a 0,4 ml foi adicionado 1,8 ml de uma solução previamente preparada de água deionizada ultrapura e acetonitrila (9:1). A solução final obtida foi filtrada com membrana em PVDF (0,45 μ m) e injetada em CLAE/DAD (parâmetros analíticos descritos no item 2.4.5.2).

Esta avaliação foi realizada para verificar se ocorreu a hidrólise total da amostra analisada após o processo de determinação de flavonóides totais, bem como os comprimentos de onda dos picos observados.

2.4.8 Estudo preliminar da estabilidade acelerada

Para a realização do estudo da estabilidade acelerada foi utilizada câmara climática Nova Ética modelo 420LCD, com controle de temperatura e umidade (50°C \pm 2°C / 90% \pm 5% U.R.) durante um período de 90 dias.

Amostras de flores secas e inteiras de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*, inseridas em embalagens de papel de cor pardo, foram inseridas na câmara climática, em triplicata para cada ponto de análise. Foram determinados 4 pontos para amostragem, seguindo a legislação vigente para a realização deste estudo.

Foram estes: Ponto Zero (não sofreu ação de temperatura e umidade), Ponto 1 (após 30 dias), Ponto 2 (após 60 dias), Ponto 3 (após 90 dias).

Além da determinação quantitativa do marcador químico através do método de CLAE validado, também foi observada a ocorrência de alterações nas características organolépticas.

Tratamento das amostras

As triplicatas de cada ponto de análise foram reunidas em um recipiente e homogeneizadas. Posteriormente, parte da amostra foi pulverizada com moinho de facas (IKA A11 basic / IKA®-WERKE).

Inicialmente, determinou-se o teor de umidade das amostras, em triplicata, utilizando a metodologia selecionada após a realização do item 2.4.2 e o resultado foi expresso em percentual de perda por dessecação.

Para quantificação do marcador químico e análise dos cromatogramas, a amostra pulverizada foi dividida em três partes, que originaram três soluções extrativas preparadas de acordo com o estabelecido após a realização do item 2.4.6, com concentrações finais teóricas de 25 mg/ml (**SN** e **SA**). A partir destas, foram feitas três diluições **SNN** e **SAA** para cada amostra (total de 9 soluções), que foram filtradas com membrana em PVDF (0,45 µm) e injetadas em triplicata utilizando o método de análise cromatográfica validado.

2.4.9 Análises das amostras coletadas, adquiridas no comércio ou fornecidas pelo laboratório de Farmacognosia (UFRGS)

As 13 amostras de *Sambucus nigra* adquiridas no comércio local e / ou fornecidas pelo laboratório de Farmacognosia desta Faculdade e 18 amostras de *Sambucus australis* coletadas em diversas localidades (Tabela 1.1) foram analisadas quanto a perda por dessecação, teor de flavonóides totais e quanto à

concentração do marcador químico presente nas plantas (Espectrofotometria UV/VIS e CLAE, respectivamente).

Além da verificação quantitativa para a espécie *Sambucus australis*, devido ao fato de ter sido coletada em diversas localidades, também foram comparadas as amostras por região, visualizando os perfis cromatográficos para identificar possíveis variações, além da avaliação ao passar de um ano.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Determinação da perda por dessecação

A estabilidade dos constituintes químicos presentes na matéria-prima vegetal seca está relacionada, muitas vezes, com a quantidade de água presente. Neste sentido, a ação de bactérias e fungos podem comprometer a conservação das plantas secas, bem como enzimas que provocam reações de degradação no interior da célula vegetal. Entre essas reações, destacam-se as oxidações de ácidos graxos insaturados e compostos fenólicos, isomerização de certos tipos de alcalóides e reações de hidrólise, principalmente em compostos heterosídicos (LIST & SCHMIDT, 1989; FARIAS, 2002). A determinação do teor de umidade indica a quantidade de substâncias voláteis na droga e a umidade residual, servindo para a avaliação das condições de estocagem.

Os resultados obtidos com a análise gravimétrica e utilizando a balança de infravermelho estão apresentados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 Teor de umidade de amostras de *Sambucus nigra* L. para diferenciação das análises por gravimetria e utilizando balança de infravermelho.

Método	Teor médio (%) ± DP	DPR (%)
Gravimetria*	11,32 ± 0,22	1,92
Balança Infravermelho**	10,48 ± 0,05	0,43

* n=2 **n=3

Após a análise estatística dos resultados, verificou-se que, apesar dos valores apresentados serem muito próximos entre si, a diferença entre os métodos foi significativa ($t_{\text{calc}} = 27,05$; $t_{\text{tab}} = 3,182$), porém isto torna-se irrelevante do ponto de vista tecnológico, uma vez que freqüentemente o processo de secagem do material é desconhecido e a variabilidade intrínseca do material vegetal é grande.

Após a determinação, optou-se pela utilização do método que emprega a termobalança, pois apresentaram valores de desvio padrão relativos mais baixos,

demonstrando a homogeneidade entre os resultados, além da praticidade de manipulação do equipamento.

Com a realização da perda por dessecação para todas as amostras de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*, em triplicata, verificou-se um teor médio de umidade para as flores secas da primeira espécie de 11,68% e 10,90% para as amostras de *Sambucus australis*. Os resultados obtidos para todas as amostras estão apresentados na Tabela B1 em Anexo.

Encontra-se estabelecido em Farmacopéias (BRITISH, 1996; EUROPEAN, 2000; WHO, 2001; FARMACOPEIA, 2002) o limite de 10% de perda por dessecação para a espécie *Sambucus ebulus*, apesar da monografia citada ser para a espécie *Sambucus nigra*. Os resultados encontrados para algumas das amostras comerciais e / ou coletadas, bem como os valores médios, extrapolaram este limite indicado pelos compêndios, assim como o valor de 11,3% encontrado em um estudo realizado em 1998, para *Sambucus australis* (MACIEL & BRANDÃO, 1998). Porém, um relato da OMS (ZHI-CHEN, 1980), citado em diversos estudos (ABOY, 1999; SENNA, 1999; SILVA, 1999; SOARES, 2002), estabelece uma faixa de variação para espécies vegetais entre 8 e 14 %, que inclui os valores obtidos com as amostras.

O fato dos teores apresentarem-se superiores ao limite de 10 % pode ser relacionado à procedência das amostras e época de coleta, bem como as condições de umidade ambiente no dia em que foi realizada a análise. Porém, é válido utilizar o limite da OMS já que a capacidade das matérias-primas vegetais em reter umidade não é pequena.

2.5.2 Determinação de materiais estranhos (contaminantes)

A especificação encontrada na Farmacopéia Brasileira 4 ed. (1988) estabelece a utilização de 250 g de inflorescências para a realização do quarteamento. Porém, na monografia de *Sambucus nigra* encontrada na Farmacopéia Européia (2002) este valor é reduzido para 10 g.

Em geral, as monografias de *Sambucus nigra* encontradas (EUROPEAN, 2002; FARMACOPÉIA, 2002) apresentam a especificação de, no máximo, 8% de pedicelos e outros materiais estranhos e, no máximo, 15% da amostra com cor alterada (enegrecida).

Os resultados médios obtidos foram de 5% para os pedicelos e outros materiais, e 9% para flores enegrecidas, para a espécie *Sambucus nigra*. Para a espécie nativa os resultados foram semelhantes, apresentando 7% de pedicelos e outros materiais e 11% de flores de cor acastanhada. Entre os materiais estranhos presentes nas amostras avaliadas foram encontrados fragmentos de folhas, galhos, flores de outras espécies não identificadas, e para *Sambucus australis* encontraram-se também pequenos aracnídeos (ácaros).

Com isto, observou-se que os valores obtidos no ensaio encontram-se dentro da faixa estabelecida pela Farmacopéia Européia (EUROPEAN, 2002) para *Sambucus nigra*, sendo válida a aplicação destes valores como limite para ambas as espécies.

2.5.3 Determinação de cinzas totais

O método de determinação de cinzas é feito para verificar a quantidade de impurezas inorgânicas não-voláteis nas amostras e, de acordo com a Farmacopéia Herbária Britânica (BRITISH, 1996), Farmacopéia Alemã (DAB 10, 1999), Organização Mundial da Saúde (WHO, 2001), Farmacopéia Européia (EUROPEAN, 2002) e Farmacopéia Portuguesa (FARMACOPEIA, 2002), o resultado deve ser de, no máximo, 10% para *Sambucus nigra*. A média, o DP e o DPR dos resultados obtidos para as três amostras analisadas para cada espécie encontram-se na Tabela 2.7.

Tabela 2.7 Teor de cinzas totais para amostras de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltdl..

Amostras*	Cinzas Totais	
	Teor médio (%) ± DP	DPR (%)
<i>Sambucus nigra</i>	8,95 ± 0,58	1,96
<i>Sambucus australis</i>	9,39 ± 0,23	2,42

* n=3 em ambas amostras.

Observou-se que ambas as espécies apresentaram valores para cinzas totais dentro do limite estabelecido pelos compêndios, demonstrando boa homogeneidade entre os resultados. Valores estes que concordam com os encontrados por MACIEL & BRANDÃO (1998), de 8,7% para *Sambucus nigra* e 9,59% para *Sambucus australis*.

2.5.4 Análise qualitativa

Avaliação do perfil cromatográfico utilizando cromatografia em camada delgada

Cromatografia em camada delgada é o método de escolha para análise qualitativa de plantas antes de serem empregados outros métodos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (LIANG *et al.*, 2004). Este método é simples e conveniente para determinar a qualidade e possível adulteração em produtos fitoterápicos, encontrando-o descrito em várias Farmacopéias para a caracterização da matéria-prima vegetal.

Para a análise cromatográfica, 10 µl da solução das amostras preparadas foram aplicadas na cromatofolha e submetidas ao sistema eluente com acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:27) juntamente com as SQR. O sistema selecionado permitiu a identificação de manchas muito similares entre as espécies a olho nu e nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.

Os valores de Rf obtidos (Tabela 2.8) puderam ser comparados com valores encontrados na literatura em experimentos realizados com utilização das mesmas condições cromatográficas.

Tabela 2.8 Valores de Rf obtidos com observação das amostras em CCD de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schldl. analisadas e dados da literatura encontrados para *Sambucus nigra* L.

SQR	Rf Amostras	Rf (WAGNER & BLADT, 1996)	Rf (MALEŠ & MEDIC-ŠARIĆ, 1999)
Flavonóide N.I.	-	-	0,35
Rutina	0,49	0,4	0,44
Ácido clorogênico	0,53	0,5	0,51
Ácido fenólico N.I.	-	-	0,57
Hiperosídeo	0,68	0,6	0,62
Isoquercitrina	0,72	~0,6	0,67
Quercitrina	N.V.	~0,75	-
Ácido fenólico N.I.	-	-	0,67
Ácido caféico	N.V.	-	0,94
Ácido ferúlico	~ 0,98	-	0,98
Quercetina	fronte	fronte	-
Canferol	fronte	fronte	-

N.V. – não foi possível visualização.

N.I – substância não identificada

Além das manchas identificadas, foram observadas algumas de menor intensidade ao longo do percurso das amostras. No comprimento de onda de 366 nm, foi identificada uma mancha fluorescente de fraca intensidade com Rf ~ 0,96, localizada apenas na amostra de *Sambucus australis*, podendo ser equivalente ao ácido caféico.

Após a revelação da placa com anisaldeído sulfúrico, observaram-se manchas de coloração violeta correspondentes aos compostos rutina, hiperosídeo, isoquercitrina, quercetina, e uma banda azulada na altura do ácido clorogênico, não sendo, novamente, percebidas diferenças significativas para as espécies.

Avaliação do perfil cromatográfico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e determinação do marcador químico

Identificação do marcador químico

Cromatografia líquida de alta eficiência já era considerada a técnica mais empregada para separação e análise de flavonóides em 1989. Neste ano PIETROGRANDE e colaboradores (1989) consideraram o método rápido e sensível para separar as mais complexas misturas fenólicas que ocorressem nas plantas.

A determinação do *fingerprint* das plantas por CLAE tornou-se um método conveniente para o controle de qualidade e padronização de matérias-primas e preparações vegetais. Para isto, são necessárias uma boa separação e resolução das misturas complexas que constituem as plantas, bem como o controle da pureza do pico para prevenir sobreposições, detecção de contaminantes e produtos de degradação (REHWALD *et al.*, 1994; PETRY, 1999; LIANG *et al.*, 2004).

Durante o desenvolvimento de um sistema cromatográfico adequado para a análise da composição química das soluções extrativas de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*, foram testados diversos de sistemas eluentes isocráticos e gradientes, utilizando água deionizada, acetonitrila, metanol e ácido trifluoroacético (TFA).

A fase móvel e a opção pelo sistema gradiente linear, descrito no item 2.4.5.2 foi o mais adequado de acordo com a complexidade da matriz, utilizando-se TFA como auxiliar na resolução do cromatograma (DONDI *et al.*, 1989).

Os perfis cromatográficos obtidos após a injeção das soluções extrativas de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis* no cromatógrafo com o detector de fotodiodos, bem como os valores dos tempos de retenção e os máximos de absorvância para os picos selecionados e integrados no comprimento de onda de 357 nm (selecionado após a integração do pico majoritário) podem ser observados nas Figuras 2.1 e 2.2.

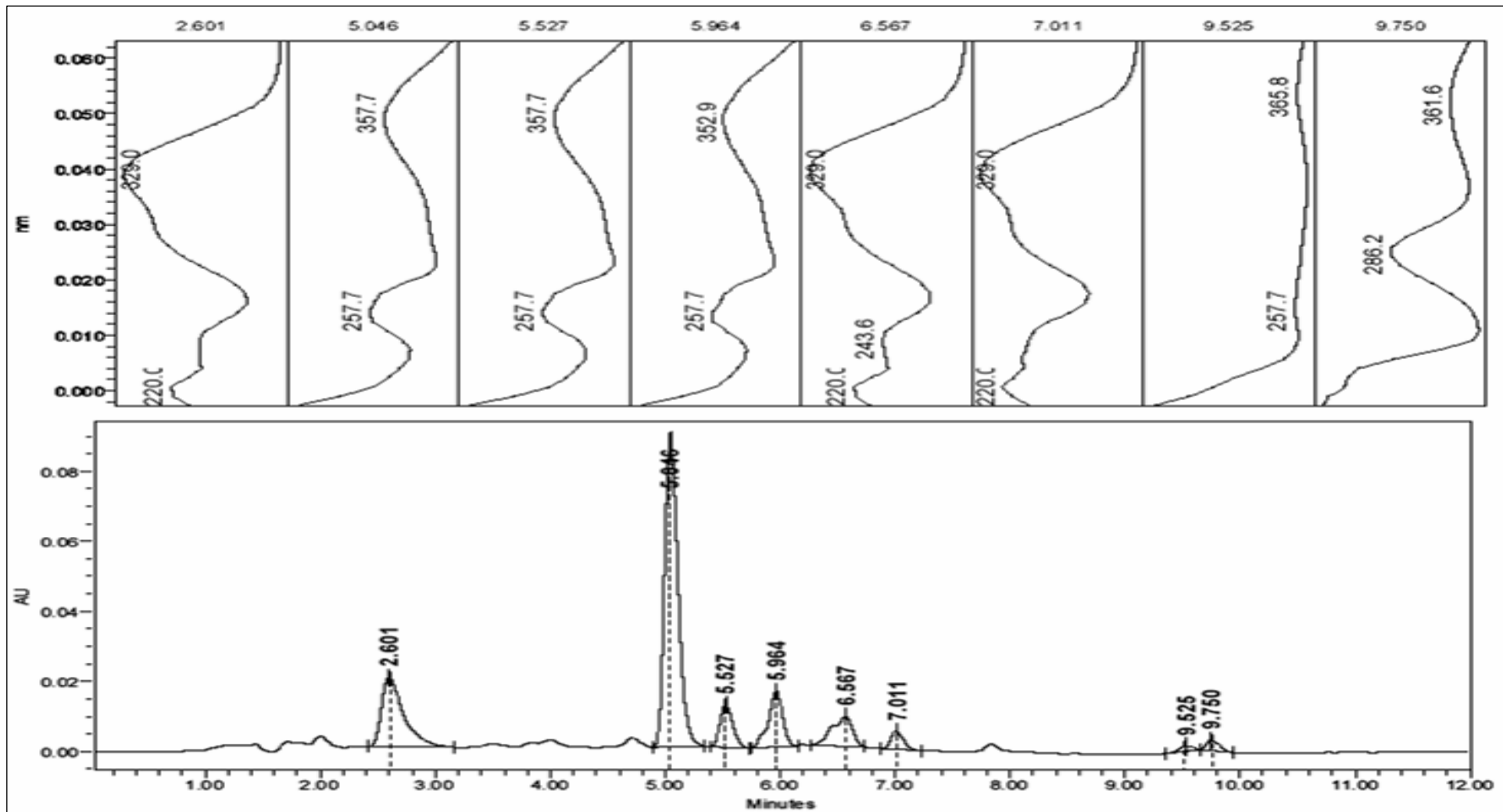


Figura 2.1 Cromatograma de *Sambucus nigra* L. obtido com o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descrita no item 2.4.5.2, observados no comprimento de onda de 357 nm.

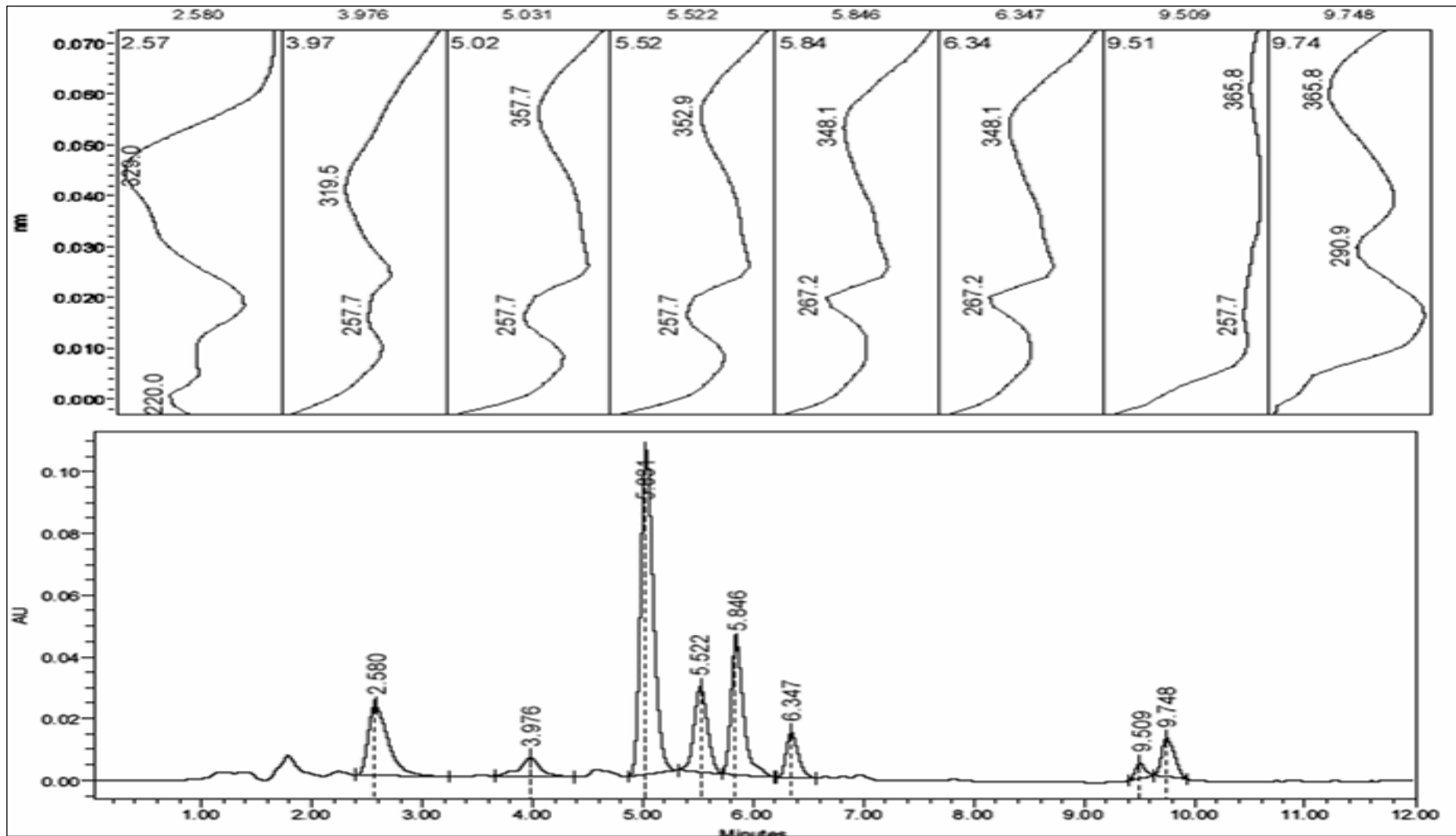


Figura 2.2 Cromatograma de *Sambucus australis* Cham. & Schldl. obtido com o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descrita no item 2.4.5.2, observados no comprimento de onda de 357 nm.

Também foi feita sobreposição dos cromatogramas para visualizar a existência de algum pico que pudesse diferenciar as amostras analisadas (Figura 2.3)

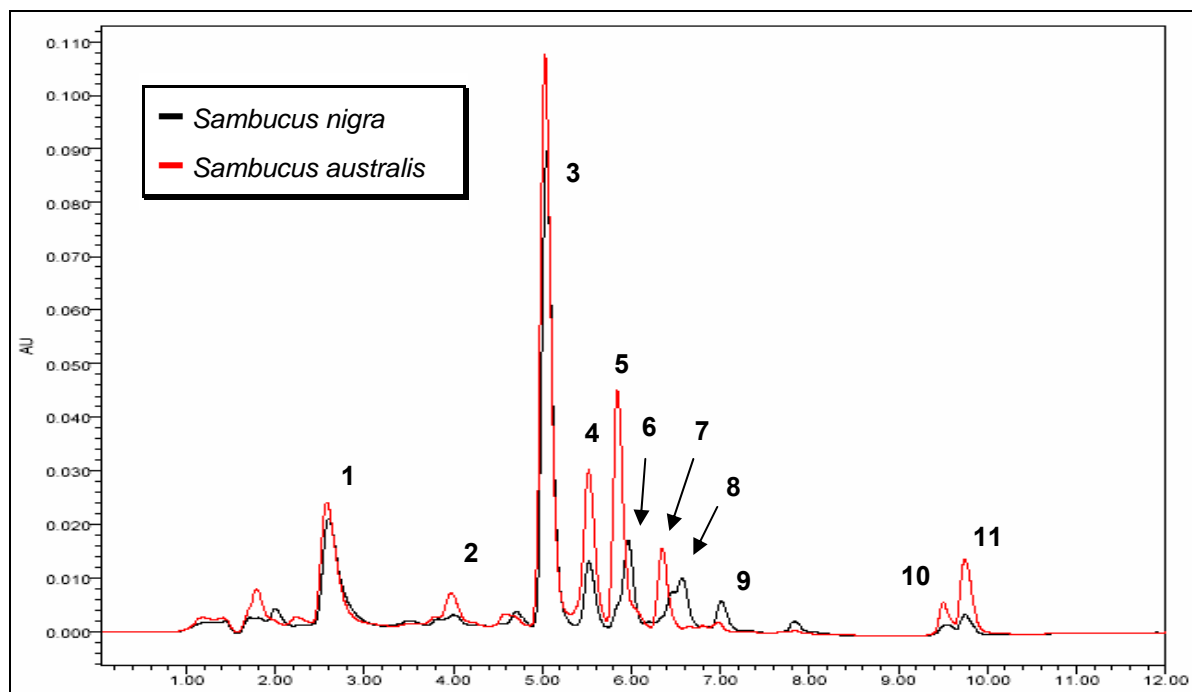


Figura 2.3 Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE que mostram os perfis de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltidl.

Verificou-se grande similaridade no perfil cromatográfico das espécies. Entre os picos visualizados nos dois cromatogramas, estão indicados os majoritários (pico **3**) e aqueles onde foi possível realizar a integração. Apesar de similares, pequenas diferenças foram identificadas nos tempos de retenção em torno de 5,0 a 7,0 minutos (picos **5**, **6**, **7** e **8**).

Na Tabela 2.9 encontram-se os valores dos tempos de retenção e os máximos de absorvância observados nas Figuras 2.1 e 2.2 para os picos selecionados, apresentados na Figura 2.3.

Tabela 2.9 Tempos de retenção e absorvâncias obtidas com CLAE/DAD dos picos observados nos cromatogramas de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham & Schltdl..

Picos	Tempo de Retenção (minutos)		Absorvância (nm)	
	<i>S. nigra</i>	<i>S. australis</i>	<i>S. nigra</i>	<i>S. australis</i>
1	2,601	2,580	220.0 / 329.0	220.0 / 329.0
2	-	3,976	-	257.7 / 319.5
3	5,046	5,031	257.7 / 357.7	257.7 / 357.7
4	5,527	5,522	257.7 / 357.7	257.7 / 352.9
5	-	5,846	-	267.2 / 348.1
6	5,964	-	257.7 / 352.9	-
7	-	6,347	-	267.2 / 348.1
8	6,567	-	220.0 / 329.0	-
9	7,011	-	220.0 / 329.0	-
10	9,525	9,509	257.7 / 365.8	257.7 / 365.8
11	9,750	9,748	286.2 / 361.6	290.9 / 365.8

Analisando os dados da Tabela 2.9, bem como os cromatogramas das Figuras 2.1 e 2.2, observou-se que, apenas três picos entre os selecionados para as duas plantas (pico **1**, **3** e **10**) coincidiram o tempo de retenção e os valores de absorvância do espectro na região do ultravioleta. Outros dois picos (**4** e **11**) foram equivalentes somente quanto ao tempo de retenção, apresentando uma pequena variação nas bandas conforme pode ser verificado nos espectros de absorção.

Substâncias de referência como rutina, isoquercitrina, quercitrina, hiperosídeo, luteolina, quercetina, canferol e ácido clorogênico foram injetadas no mesmo dia que as amostras e coinjetadas, a fim de realizar a comparação dos seus tempos de retenção e espectros na região do ultravioleta, observando o aumento nas áreas dos picos. Os cromatogramas das substâncias referência estão apresentados na Figura 2.4. A Tabela 2.10 apresenta os tempos de retenção, bem como os máximos de absorvância para as substâncias de referência.

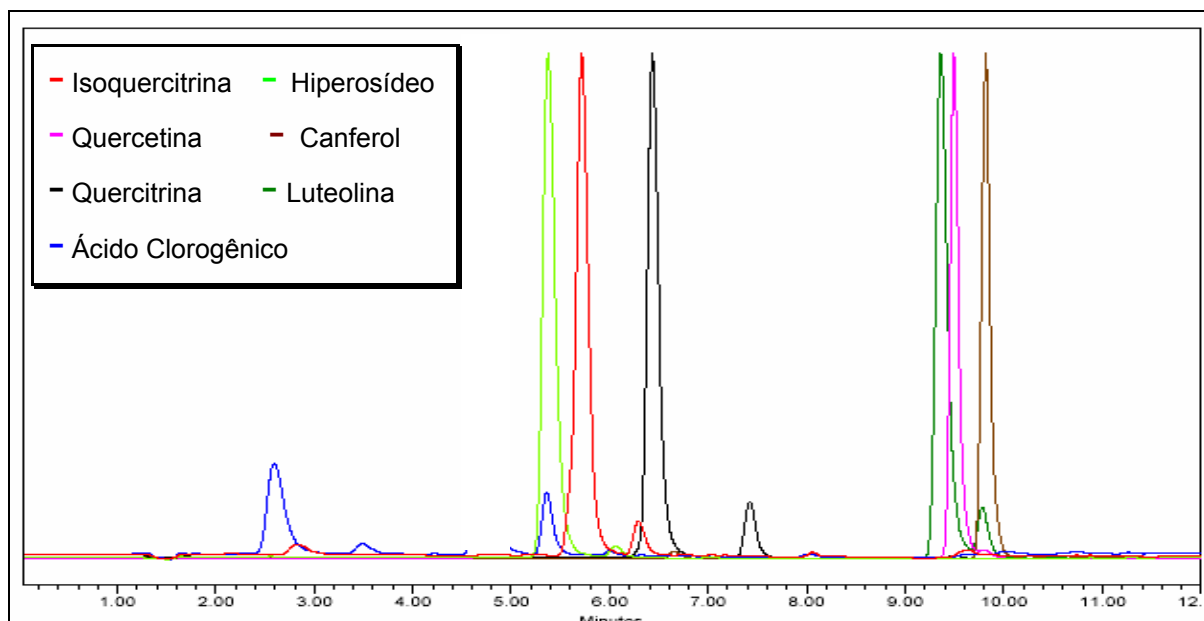


Figura 2.4 Sobreposição dos cromatogramas das substâncias de referência disponíveis no laboratório.

Tabela 2.10 Valores de tempo de retenção e absorvância para as substâncias de referência disponíveis no laboratório, após análise utilizando CLAE/DAD.

Substância referência	Tempo de Retenção (minutos)	Absorvância (nm)
Ácido Clorogênico	2,593	220.0 / 329.0
Rutina	5,032	257.7 / 357.7
Hiperosídeo	5,374	257.7 / 357.7
Isoquercitrina	5,470	257.7 / 352.9
Quercitrina	6,433	257.7 / 348.1
Luteolina	9,376	253.2 / 348.1
Quercetina	9,497	257.7 / 370.6
Canferol	9,817	267.2 / 365.8

O pico majoritário, observado nos cromatogramas de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis* com tempo de retenção 5,046 e 5,031 minutos, respectivamente, foi identificado como rutina através da comparação dos espectros de ultravioleta visualizados com a utilização do CLAE/DAD, coeluição com a substância referência e sobreposição dos cromatogramas (Figuras 2.5 e 2.6), confirmando os relatos da literatura que indicavam esta substância como majoritária para a espécie de *Sambucus nigra*. O pico 1 também apresentou informações que possibilitaram sua provável indicação como sendo ácido clorogênico.

Figura 2.5

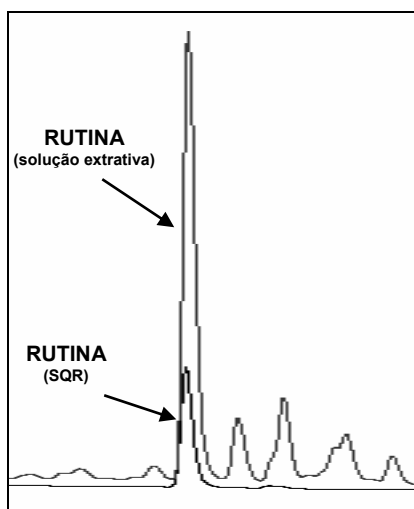


Figura 2.6

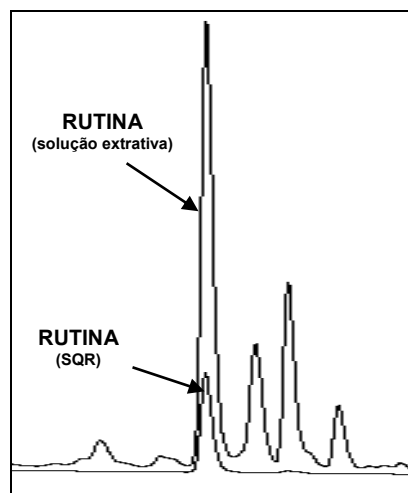


Figura 2.5 e 2.6 Sobreposições dos cromatogramas obtidos com as soluções extrativas de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. com o cromatograma da substância referência rutina.

Analisando os demais picos encontrados nos cromatogramas não foi possível definir suas estruturas ao compará-los com as referências, mesmo realizando coinjeções. Na região de 5,5 à 7,5 minutos pode ser observada a presença de picos com absorvâncias características de flavonóides glicosilados e ácidos fenólicos para *Sambucus nigra* e, para *Sambucus australis*, apenas picos de flavonóides glicosilados.

Na região de 9,0 a 10,0 minutos foram observados dois picos (**10** e **11**) nos cromatogramas das soluções extrativas das duas plantas. Quando foram realizadas sobreposições com quercetina e canferol, bem como na coinjeção, estes foram sobreponíveis e apresentaram-se aumentados para o segundo caso. Porém, observou-se que os valores de comprimento de onda na região ultravioleta visualizados para as amostras apresentaram-se diferenciados dos valores encontrados para as referências.

Com a possibilidade de realizar a varredura de todos os picos encontrados nos cromatogramas pelo cromatógrafo CLAE/DAD, utilizando o software adequado, foi verificou-se que, exceto para os picos **1**, **3** (rutina) e **10**, todos os outros apresentaram algum tipo de impureza, encontrando, algumas vezes, nos tempos de

retenção indicados, os máximos de absorvância referendados para as SQR. Esta condição permitiu inferir a presença de hiperosídeo, isoquercitrina, quercetina e canferol.

Através dos resultados destas análises determinou-se que a substância química de referência mais adequada para análise quantitativa para ambas espécies foi a rutina. O comprimento de onda selecionado para realização das análises cromatográficas foi 357 nm, além de ser também o ponto em que os cromatogramas apresentaram um maior número de picos bem resolvidos.

2.5.5 Análise quantitativa

A metodologia selecionada para a realização das análises quantitativas das amostras obtidas foi CLAE pela sua grande capacidade de fornecer resultados rápidos, com precisão, exatidão e alto poder de separação para matrizes complexas.

Curva de calibração para a substância química de referência

Após a avaliação qualitativa das soluções extrativas e a definição de rutina como marcador químico para a realização das análises quantitativas, três curvas de calibração foram preparadas a partir da solução-mãe indicada no item 2.4.6.1 (50 µg/ml). As diluições propostas apresentaram concentrações finais de 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45 µg/ml.

Encontram-se na Tabela 2.11 os valores da análise de variância para média das três curvas obtidas. O gráfico da média das curvas de calibração está representado na Figura 2.7, bem como o coeficiente de regressão (r^2) e a equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados. As Tabelas B2, B3 e B4 em Anexo, apresentam os valores obtidos na elaboração de todas as curvas de calibração utilizando rutina.

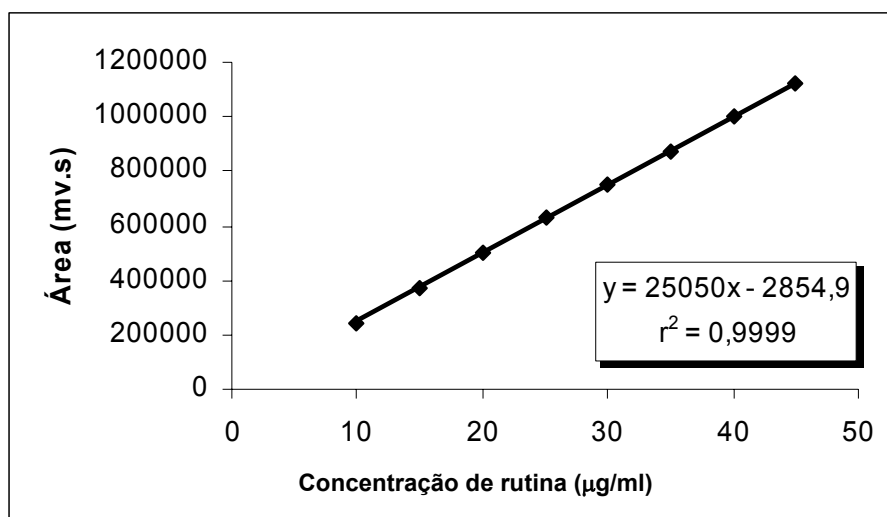


Figura 2.7 Representação gráfica curva de calibração de rutina obtido por CLAE, equação da reta e coeficiente de regressão.

Tabela 2.11 Análise de variância (ANOVA) para a curva de calibração de rutina.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F _{calc}
Entre	7	1976943957963,48	282420565423,35	4758,42*
A) Regressão	1	1976711485714,3	1976711485714,3	33305*
B) Desvio de Linearidade	6	232472249,1	38745374,86	0,653
Dentro	16	949628588,7	59351786,8	
Total	23	1977893586552,18		

* significativo para $p < 0,01$

Os valores obtidos com a análise de variância demonstraram que existe regressão linear significativa ($p < 0,01$) e, que o desvio de linearidade não foi significativo na faixa de concentração trabalhada. Sendo assim, foi possível, através da equação da reta, a realização da análise quantitativa do teor de rutina nas amostras de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*.

Preparo das soluções extrativas

Para a obtenção de um extrato cujos constituintes apresentem melhor resolução cromatográfica e áreas que possibilitem uma análise quantitativa coerente, foram realizados testes para determinação de condições ótimas de extração.

Os resultados foram calculados utilizando a equação da reta, obtida com a construção da curva de calibração para rutina (Figura 2.7). A Tabela 2.12 e a Tabela 2.13 apresentam os valores obtidos após a realização dos ensaios para escolha do método extrativo utilizado para as análises das amostras e validação da metodologia CLAE.

Tabela 2.12 Ensaios para determinação das condições ideais de extração para *Sambucus nigra* L. utilizando os parâmetros: proporção planta:solvente, teor de orgânico no solvente extrator e método extrativo.

Teste para avaliação de quantidade de planta a ser utilizada*			
Amostras	Peso (mg)	Área (mv.s)	Teor de rutina (%)
150 mg	152,4	348686,5	1,03
250 mg**	250,7	670670	1,20
350 mg	351,5	659595	1,18
Testes para avaliação do solvente (etanol:H₂O)*			
0 : 100	253,7	324543	0,57
20 : 80	251,7	482603	0,86
50 : 50	255,1	623793	1,10
80 : 20**	250,7	670670	1,20
100 : 0	250,1	374008,5	0,67
Turboextração x Maceração *			
Turboextração**	250,7	670670	1,20
Maceração	254,2	654657,5	1,15

*realizado em 3 determinações

** condição selecionada.

Tabela 2.13 Ensaios para determinação das condições ideais de extração para *Sambucus australis* Cham. & Schldl. utilizando os parâmetros: proporção planta:solvente, teor de orgânico no solvente extrator e método extrativo.

Teste para avaliação de quantidade de planta a ser utilizada*			
Amostras	Peso (mg)	Área (mv.s)	Teor de rutina (%)
150 mg	155,8	357055,5	1,03
250 mg**	252,1	737759	1,33
350 mg	352,6	722222,7	1,30
Testes para avaliação do solvente (etanol:H₂O)*			
0 : 100	251,8	422076	0,75
20 : 80	252,3	514593	0,92
50 : 50	251,7	787467	1,23
80 : 20**	252,1	737759	1,33
100 : 0	252,4	357769	0,64

*realizado em 3 determinações

** condição selecionada.

Conforme pode ser verificado nos resultados, a quantidade de planta e o solvente extrator de escolha foi o mesmo para ambas as espécies. Para a quantidade ideal de planta pode-se inferir que houve saturação dos 5 ml do líquido extrator utilizados com a quantidade de 250 mg de planta. Em relação ao solvente

extrator, a condição selecionada foi a mistura de etanol e água na proporção de 80:20 (v/v). Isto provavelmente deveu-se pela solubilidade e polaridade do constituinte majoritário, já que os heterosídeos são geralmente solúveis em água e em álcoois diluídos e, especificamente os flavonóis pouco solúveis em água (ZUANAZZI, 2002). A seleção deste solvente extrator concordou com métodos já descritos na literatura (MASCOLO *et al.*, 1987; DAWIDOWICZ *et al.*, 2005).

Quanto ao processo extrativo, comparando os métodos de maceração e turboextração, verificou-se que este último foi selecionado por utilizar menor período de tempo com maior eficácia. A turbólise é um processo em que, ao mesmo tempo em que promove o contato do solvente com a droga por agitação, também causa a cominuição das partículas da amostra, aumentando a superfície de contato, resultando em melhor extração dos constituintes em menor tempo.

Assim, foi determinado que as soluções extrativas das flores pulverizadas deveriam ser realizadas a partir de 250 mg de material, utilizando como extrator 5 ml de uma solução hidroetanólica 80% (água destilada : etanol P.A.; 20:80) e o método de turbólise (Ultra Turrax T8 S8N-5G / IKA®-WERKE) na velocidade 3, durante 5 minutos. Após este procedimento as soluções foram filtradas à vácuo, o volume retomado com 10 ml do mesmo solvente utilizado na extração, a fim de obter uma concentração teórica final de 25 mg/ml, e armazenadas sob refrigeração até o momento do seu uso.

Este procedimento de preparação das soluções extrativas foi utilizado para todas as amostras analisadas, bem como para realizar a validação do método de CLAE.

2.5.5.1 Validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência

Para o preparo das soluções extrativas a serem utilizadas em todo o processo de validação, utilizou-se o método determinado com o item 2.5.5.2, que foi o mesmo para as duas plantas, no qual a concentração teórica final das amostras foi de 2,5 mg/ml (**SN** e **SA**).

Especificidade

Uma vez que as amostras são consideradas matrizes complexas por possuírem inúmeros constituintes, a especificidade do método foi determinada pela análise da pureza do pico verificada nos cromatogramas obtidos utilizando o CLAE/DAD.

Foram obtidas as soluções **SNN** e **SAA** partindo de **SN** e **SA**. Estas foram injetadas utilizando o método definido no item 2.4.5.2. Os cromatogramas estão apresentados nas Figuras 2.8 e 2.9, sendo observados também os espectros do pico majoritário na região do ultravioleta (357 nm) e ausência de interferentes no pico em três regiões diferentes.

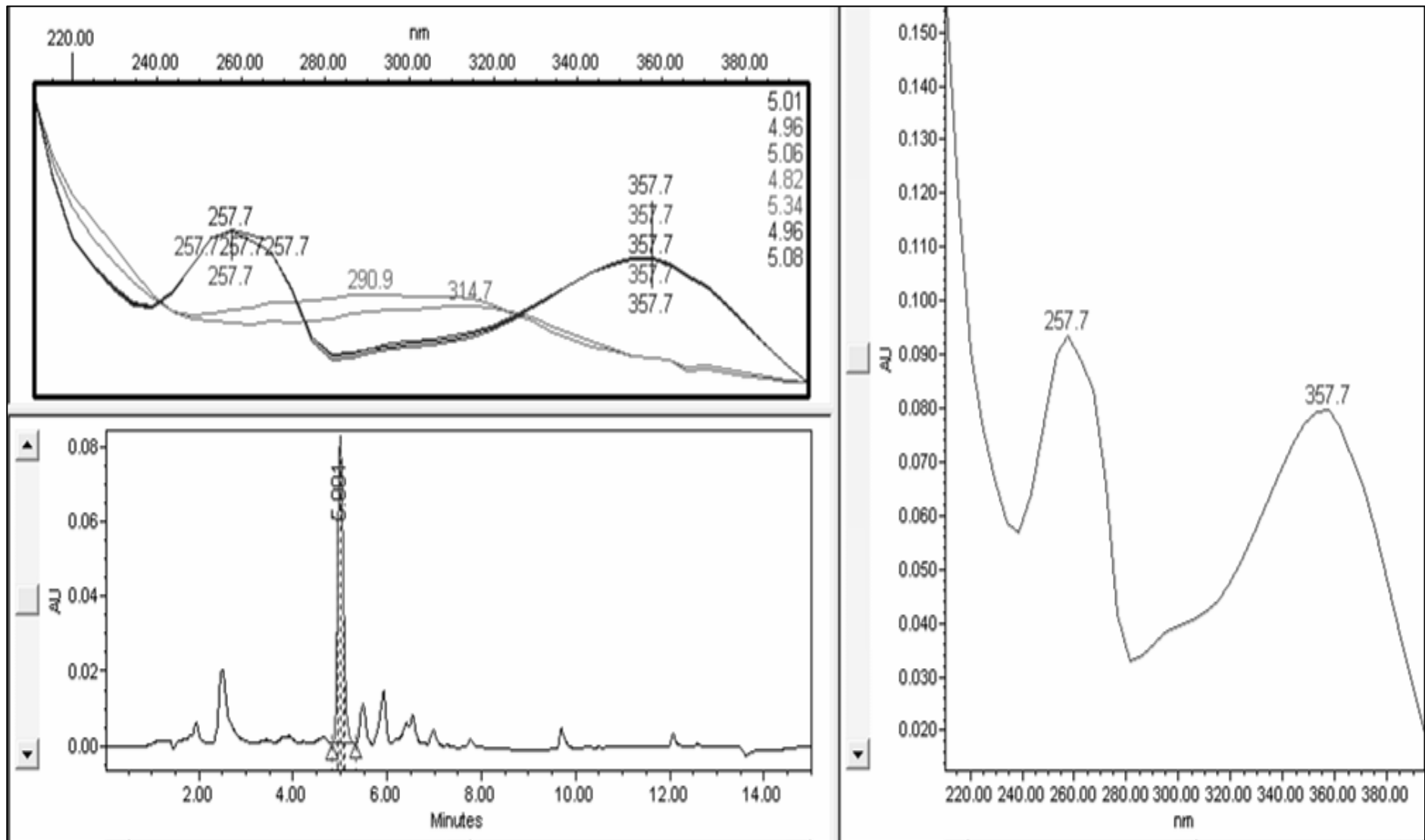


Figura 2.8 Cromatograma relativo a pureza do marcador químico da amostra de *Sambucus nigra* L..

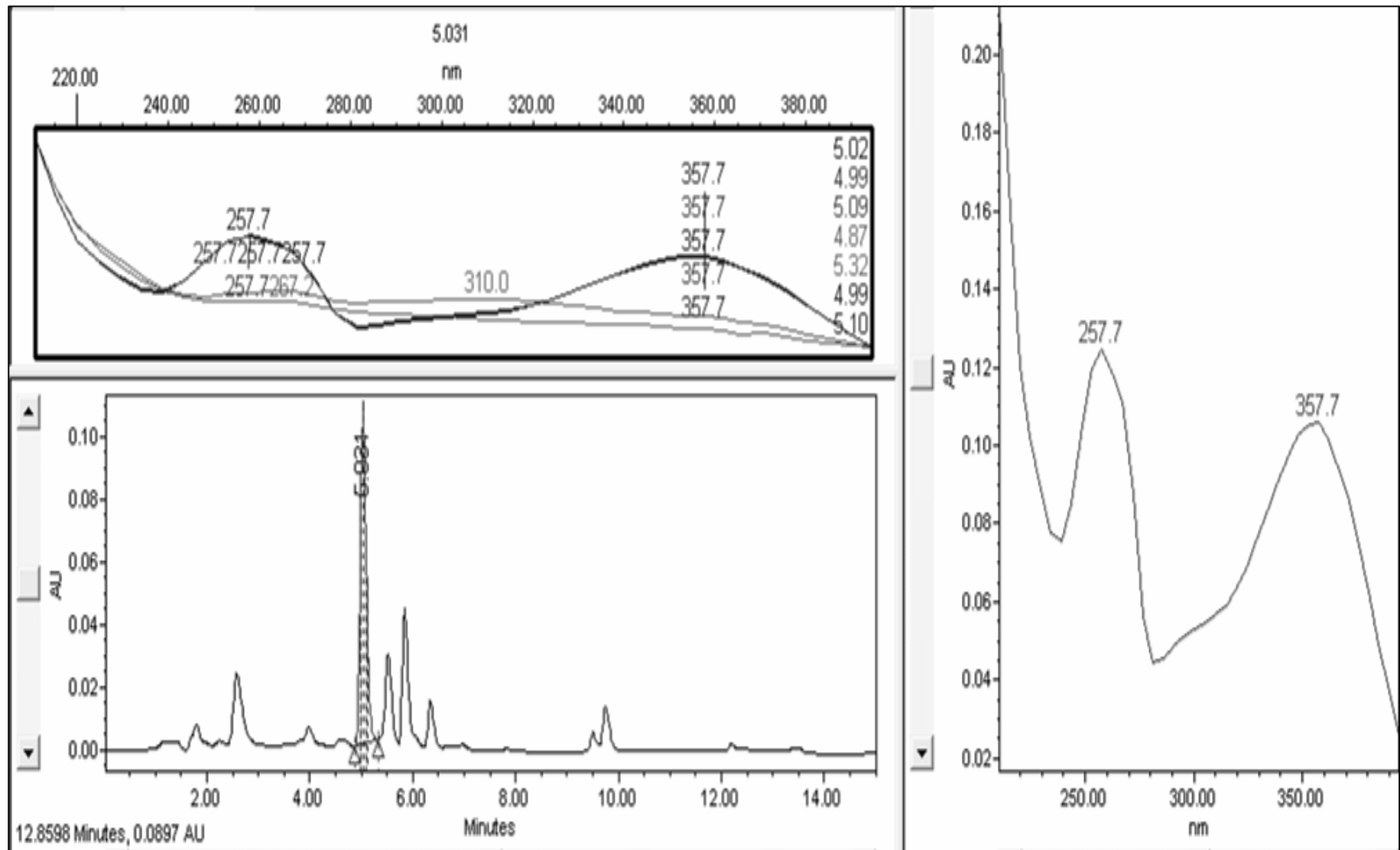


Figura 2.9 Cromatograma relativo a pureza do marcador químico da amostra de *Sambucus australis* Cham & Schldl.

De acordo com os resultados encontrados nos cromatogramas, o método pode ser considerado específico para a análise de rotina em amostras de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*, isto é, em todas as faixas analisadas o pico majoritário não apresentou variação nos máximos de absorvância indicada no CLAE/DAD, indicando a ausência de interferentes.

Linearidade

O estudo de linearidade para cada espécie foi realizado com diluições feitas a partir das **SN** e **SA**, atingindo concentrações teóricas de 1,75; 2,0; 2,25; 2,5; 2,75; 3,0; 3,25 mg/ml, com três determinações para cada nível de concentração.

O valor do coeficiente de regressão bem como a equação da reta e o gráfico de linearidade estão apresentados na Figura 2.10.

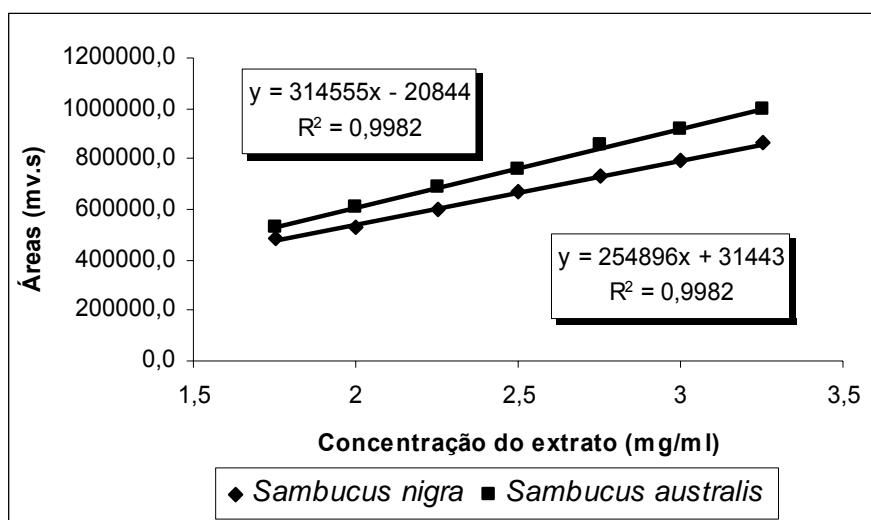


Figura 2.10 Curva de linearidade apresentando as equações da reta e os coeficientes de regressão para as amostras de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltdl.

A análise de variância dos resultados do estudo de linearidade para as amostras de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis* estão apresentados nas Tabelas 2.14 e 2.15. A faixa de concentração frente às áreas obtidas demonstra linearidade, com regressão significativa ($p < 0,01$), e ausência de desvios de linearidade, além de

permitir a verificação da integridade da rutina, isto é, não houve interferência de outros constituintes no sinal principal.

Tabela 2.14 Análise de variância (ANOVA) para os dados de linearidade de *Sambucus nigra* L.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F _{calc}
Entre	6	333770154916,809	55628359152,9	385,85*
A) Regressão	1	333144181082,609	333144181082,609	2310,7*
B) Desvio de Linearidade	5	625973834,2	125194766,8	0,868
Dentro	14	2018398070	144171290,7	
Total	20	335788552986,809		

* significativo para $p < 0,01$

Tabela 2.15 Análise de variância (ANOVA) para dados de linearidade de *Sambucus australis* Cham. & Schltdl.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F _{calc}
Entre	6	512823749256,953	85470624874,7	108,78*
A) Regressão	1	511880330545,853	511880330545,853	651,48*
B) Desvio de Linearidade	5	943418711,1	188683742,2	0,24
Dentro	14	1,1 x 10 ¹⁰		
Total	20	523823749256,953		

* significativo para $p < 0,01$.

Exatidão

Para a realização deste ensaio foi estabelecida uma faixa de concentração específica para o procedimento empregado, uma vez que os parâmetros de precisão, linearidade e especificidade do método já foram determinados (ICH, 1996).

Com as análises prévias do teor de rutina nas amostras, verificou-se que as soluções extrativas **SNN** e **SAA**, de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*, respectivamente, apresentaram teores de, aproximadamente, 25 µg/ml e 30 µg/ml de rutina.

Foram preparadas as diluições **SNN1** e **SAA1**, acrescentando-se alíquotas de 3,5, 3,9 e 4,3 ml para **SNN1** (denominadas **SN1**, **SN2** e **SN3**, respectivamente) e

3,6, 4,2 e 4,8 ml para **SAA1** (denominadas **S1**, **S2** e **S3**, respectivamente) da solução de rutina preparada no item 2.4.6 (50 µg/ml).

A equação 2.1 foi utilizada para obtenção dos percentuais de recuperação da rutina e os resultados podem ser observados na Tabela 2.16.

Tabela 2.16 Resultados para o parâmetro de exatidão para as amostras de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltdl..

Identificação		Concentração de Rutina				Teor de Recuperação (%)	
		Adicionada (µg/ml)*		Recuperada (µg/ml)*			
<i>S. nigra</i>	<i>S. australis</i>	<i>S. nigra</i>	<i>S. australis</i>	<i>S. nigra</i>	<i>S. australis</i>	<i>S. nigra</i>	<i>S. australis</i>
SN 1	S1	30,0	33,0	29,71	33,84	96,27	99,44
SN 2	S2	32,0	36,0	32,45	36,58	100,41	98,3
SN 3	S3	34,0	39,0	33,75	40,07	97,12	100,5
Teor Médio da Recuperação (%)						97,9	99,41

* Médias para a análise de três amostras com injeções em triplicata

O método de CLAE mostrou ser exato quanto ao teor de rutina recuperado exibindo um valor médio de 97,9 % para a espécie *Sambucus nigra* e 99,41% para *Sambucus australis*.

Precisão

A precisão do método analítico empregado foi verificada através das análises de repetibilidade e precisão intermediária.

A análise da média das seis determinações para a repetibilidade estão apresentadas na Tabela 2.17, bem como os resultados da precisão intra e entre-dias.

Tabela 2.17 Valores experimentais obtidos para o parâmetro de precisão da metodologia de CLAE aplicada às soluções extrativas das amostras de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltdl.

	Teor de rutina (%; m/m) ± DP		DPR %	
	<i>S. nigra</i>	<i>S. australis</i>	<i>S. nigra</i>	<i>S. australis</i>
Repetibilidade*	1,16 ± 0,02	1,34 ± 0,02	1,75	1,28
Precisão Intra-dia				
Dia 1	1,15 ± 0,001	1,34 ± 0,0021	0,09	0,15
Dia 2	1,14 ± 0,02	1,31 ± 0,02	1,76	1,24
Dia 3	1,14 ± 0,01	1,32 ± 0,003	1,15	0,21
Dia 4	1,15 ± 0,01	1,34 ± 0,003	0,55	0,23
Dia 5	1,15 ± 0,01	1,36 ± 0,001	0,19	0,07
Precisão Inter-dias	1,17 ± 0,002	1,34 ± 0,02	1,28	1,51

* Resultados da média de seis diluições, cada uma injetada em triplicata.

Para validação de metodologia de análise de matéria-prima vegetal, mesmo para produtos fitoterápicos, não existem limites máximos estabelecidos para precisão, entretanto, como possuem matrizes complexas, os valores de coeficiente de variação podem ser maiores do que aqueles permitidos para medicamentos ($\leq 5\%$) (BRASIL, 2003). Porém, analisando os resultados obtidos percebeu-se que os valores de DPR obtidos indicaram uma boa precisão do método de análise estabelecido para quantificação de rutina em amostras de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*.

Adicionalmente a estes resultados obtidos para a precisão, partindo de três pesagens, foram preparadas três soluções extrativas **SNN** e **SAA** de cada planta utilizadas para a validação, filtradas com membrana em PVDF (0,45 μm) e injetadas em triplicata no cromatógrafo. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 2.18.

Tabela 2.18 Análise de amostras de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. para verificação de precisão e repetibilidade entre as soluções extrativas.

<i>Sambucus nigra</i>	Massa (mg)	Teor de rutina (%; m/m)*	Teor de rutina médio (%)*	DPR (%)
1	250,7	1,20 ± 0,001	1,18 ± 0,013	1,10
2	251,7	1,17 ± 0,01		
3	252,0	1,19 ± 0,02		
<i>Sambucus australis</i>				
1	252,1	1,33 ± 0,019	1,33 ± 0,0035	0,26
2	251,9	1,33 ± 0,018		
3	250,3	1,34 ± 0,013		

* média de 3 determinações (%; m/m) ± desvio padrão.

Observou-se, após análise dos resultados, que diferentes pesagens e preparação das soluções extrativas exibem precisão e repetibilidade nos resultados, fortalecendo a confiabilidade no método de análise empregado.

Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para a substância utilizada como referência, de acordo com os parâmetros obtidos com as equações das retas, foram calculados com a média dos coeficientes de regressão linear (25050,67) e com o desvio padrão médio dos interceptos (3303,95), utilizando a equação 2.2.

Os resultados obtidos foram: LD = 0,44 µg/ml e LQ = 1,32 µg/ml, indicando que o método cromatográfico utilizado apresenta boa sensibilidade com baixos valores de LD e LQ.

Robustez

Com a finalidade de verificar a suscetibilidade do método à variações nos parâmetros de fluxo, proporção de solvente orgânico na fase móvel e variação de tamanho de coluna e enchimento, este ensaio foi realizado.

Os resultados do teor médio de rutina obtidos estão apresentados na Tabela 2.19, bem como os DP e DPR observados e os tempos de retenção.

Tabela 2.19 Avaliação do parâmetro de robustez para soluções extrativas de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schldl..

Parâmetros	<i>Sambucus nigra</i>			<i>Sambucus australis</i>		
	T.R.**	Teor* ± DP	DPR (%)	T.R.**	Teor* ± DP	DPR (%)
Coluna Cromatográfica	4.992	1,15 ± 0,015	1,30	4.983	1,32 ± 0,011	0,83
Fluxo	5.318	1,14 ± 0,029	2,54	5.312	1,33 ± 0,02	1,50
Fase Móvel	3.600	1,17 ± 0,01	0,85	3.590	1,35 ± 0,009	0,66

* Calculada em percentual de rutina (m/m).

** Tempo de Retenção

As modificações estabelecidas não alteraram significativamente os cromatogramas, observando-se maior variação somente no tempo de retenção do marcador químico, permanecendo, os teores de rutina semelhantes aos encontrados para as análises de precisão. Assim, afirmou-se que os métodos desenvolvidos são capazes de suportar mudanças bruscas e suaves no método selecionado.

Com o término da avaliação de todos os parâmetros propostos para a validação do método de cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de rutina em soluções extrativas preparadas utilizando flores de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*, afirma-se que o método foi validado, admitindo confiabilidade nos resultados obtidos.

2.5.6 Determinação do teor de flavonóides totais

O método de determinação espectrofotométrica de flavonóides totais para a espécie *Sambucus ebulus*, em monografia de *Sambucus nigra*, utilizando hidrólise ácida é preconizado em códigos oficiais como a Farmacopéia Alemã (DAB 10, 1992), Farmacopéia Européia (EUROPEAN, 2002) e Farmacopéia Portuguesa (FARMACOPEIA, 2002).

A hidrólise ácida deste método, considerando os compostos flavonoídicos O-glicosilados (rutina, isoquercitrina, entre outros) presentes nas espécies em estudo, é responsável pelo rompimento da ligação C3 – O – *glicosídeo* das estruturas químicas citadas, possibilitando a formação de hidroxilas fenólicas que são importantes no processo de complexação com o agente complexante de escolha, cloreto de alumínio.

A capacidade destes compostos de formarem complexos e emitirem fluorescência com a solução metanólica de cloreto de alumínio é devido a presença das hidroxilas fenólicas e da função cetônica dos flavonóides. Este fenômeno possibilita a leitura e quantificação destas agliconas formadas utilizando espectrofotômetro UV/VIS no comprimento de onda de 425 nm, calculando os teores, na maioria das vezes, como quercetina (MABRY *et al.*, 1970; SWAIN, 1976).

Pelo fato deste método de doseamento com hidrólise ser utilizado desde 1960 (CHRIST & MÜLLER, 1960) e encontrado nas monografias da espécie *Sambucus nigra*, optou-se pela sua utilização.

Os teores médios de flavonóides totais encontrados nas amostras *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*, calculados como quercetina, estão apresentados na Tabela 2.20, juntamente com os valores médios obtidos após a aplicação deste ensaio nas demais amostras de *Sambucus* obtidas comercialmente, fornecidas pelo laboratório e/ou coletadas. Os demais valores médios obtidos para as amostras estão apresentados na Tabela B1 em Anexo.

Tabela 2.20 Análise do teor de flavonóides totais calculados como quercetina para as amostras de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltldl.

Amostras	Massa (g)	Teor (%) ± DP*	DPR (%)
<i>Sambucus nigra</i>	0,1026	1,72 ± 0,03	1,74
Média para 13 amostras*		1,66 ± 0,37	22,50
<i>Sambucus australis</i>	0,1021	2,72 ± 0,017	0,63
Média para 15 amostras*		2,31 ± 0,55	23,70

* Média de três determinações para cada amostra, calculados como quercetina.

O teor médio de flavonóides totais encontrado para a totalidade de 28 amostras analisadas de *Sambucus nigra* (1,66%) e *Sambucus australis* (2,31%) apresentou diferença estatisticamente significativa para $p < 0,05$ ao aplicar o teste “t” de Student ($t_{\text{calc}} = 3,81$; $t_{\text{tab}} = 2,056$) e, os resultados apresentaram uma variação muito grande dentro das próprias espécies, podendo ser confirmado pela visualização do desvio padrão relativo apresentado na Tabela 2.19. Este fato pode estar relacionado com a integridade da amostra, as diferenças edafoclimáticas, o processo de secagem, entre outros fatores que são inerentes ao processo como o material em questão é de origem vegetal. Porém, o fato do método apresentar várias etapas até a obtenção do resultado e não ser muito específico para a classe de flavonóides desejada, ocorrendo a complexação do cloreto de alumínio com outros grupos de substâncias que contenham a função cetônica e hidroxila fenólicas nas estruturas que porventura estejam presentes nas soluções analisadas, também poderiam contribuir para esta variação.

Em compêndios oficiais europeus (EUROPEAN, 2002; FARMACOPÉIA, 2002) os valores para flavonóides totais não devem ser menores que 0,80 %, calculados como isoquercitrina. Sendo assim, verificou-se que o valor de absorvidade molar encontrado para tal substância ($A^{1\%}_{1\text{cm}} = 500$) é igual ao citado para o cálculo do teor de flavonóides como quercetina, diferindo apenas no modo de expressão dos resultados. Com isso, os valores mínimos de flavonóides totais calculados como quercetina, 0,99% para a espécie *Sambucus nigra* concordam com o limite mínimo estabelecido para isoquercitrina pelos compêndios europeus (0,8%) e o valor de 1,46% encontrado para *Sambucus australis* apresentou-se superior ao encontrado para a espécie européia.

Após a determinação do teor de flavonóides totais, verificou-se o sucesso da hidrólise, realizando injeções em CLAE/DAD do resíduo final de acetato de etila não complexado, para todas as amostras hidrolisadas.

Os cromatogramas obtidos apresentaram dois picos (**A** e **B**) na região entre 9,4 e 9,8 minutos que, quando comparados com os cromatogramas das amostras não hidrolisadas coincidiram com a região identificada pela provável presença de agliconas (Figura 2.11).

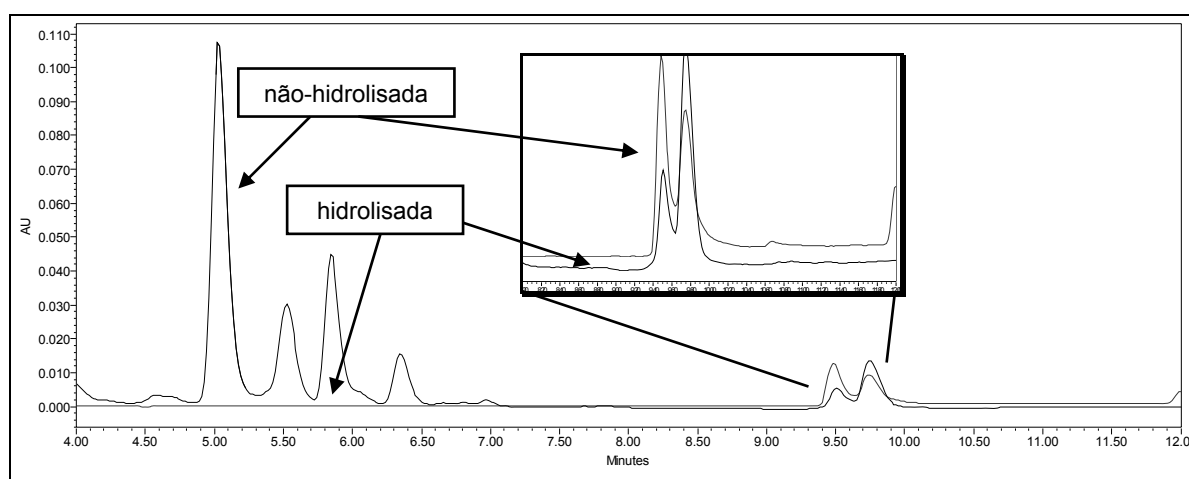


Figura 2.11 Sobreposição de cromatograma obtido com amostra de *Sambucus* não hidrolisada e hidrolisada, evidenciando a presença de agliconas de flavonóides na primeira amostra.

Ao realizar a integração dos picos do cromatograma da amostra hidrolisada, observou-se que os espectros na região do ultravioleta registrados pelo CLAE/DAD

foram, para o pico **A**, 257,7 e 370,6 nm e, para o pico **B**, 267,2 e 365,8 nm, como pode ser observado na Figura 2.12. Estes valores de absorvância máxima concordaram com àqueles obtidos anteriormente para os padrões quercetina e canferol (Tabela 2.10), respectivamente, confirmando as suas identidades pela sobreposição dos cromatogramas obtidos com as substâncias referência e por coinjeção. Neste sentido, inferiu-se que as amostras de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis* possuem glicosídeos de flavonóides derivados de quercetina e canferol, bem como as próprias agliconas (Figura 2.13).

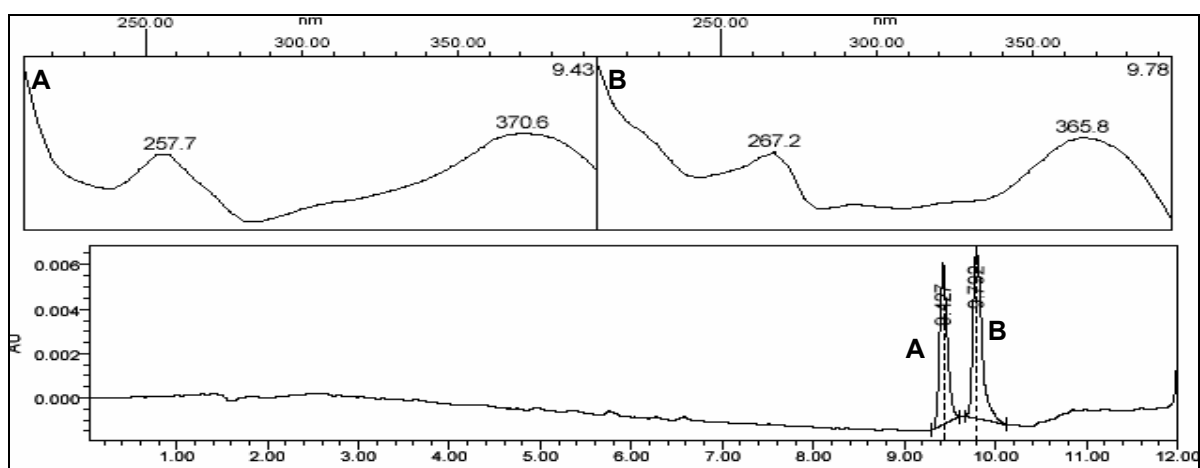


Figura 2.12 Cromatograma de amostra de *Sambucus* hidrolisadas, utilizando o sistema cromatográfico indicado no item 2.4.5.2, onde **A** apresenta o mesmo espectro de absorção identificado para a substância referência quercetina e **B**, para a substância referência canferol.

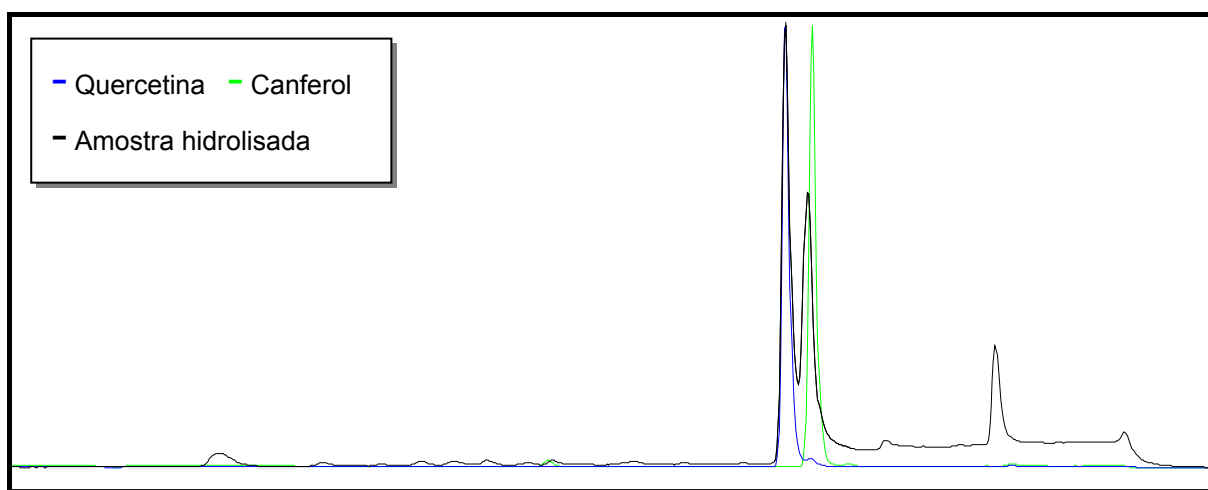


Figura 2.13 Sobreposição dos cromatogramas das substâncias referência quercetina e canferol e cromatograma da amostra de *Sambucus* hidrolisada.

2.5.7 Estudo preliminar da estabilidade acelerada

Testes de estabilidade representam uma parte crucial dos programas de ensaios para medicamentos porque a instabilidade de um produto modifica três requisitos essenciais: qualidade, eficácia e segurança (BILIA *et al.*, 2001). A indústria farmacêutica reconhece a importância dos estudos da estabilidade no desenvolvimento de formas farmacêuticas a fim de assegurar a identidade de um produto até o momento de seu uso (NUDELMAN, 1976; LACHMAN *et al.*, 2001).

Do ponto de vista teórico, podem ser desenvolvidos estudos da estabilidade baseados no conhecimento exato da cinética de degradação química das moléculas, que permitem prever com maior precisão o processo de deterioração de um produto, assim como estudos baseados no método de Arrhenius, onde é necessário o emprego de várias temperaturas de estudo (MINISTÉRIO, 2003).

Os estudos preliminares da estabilidade são utilizados para determinar quais os principais fatores, por exemplo, o conteúdo de substância ativa, a toxicidade, a efetividade e as características farmacotécnicas e organolépticas de um produto, que são afetados pelos parâmetros estabelecidos para a realização do teste. Para efeitos práticos de registro de medicamentos estes estudos acelerados são aceitos porque através do uso de temperatura e umidade constantes podem sustentar um período de validade tentativo para a comercialização do produto no máximo em 2 anos. Este tipo de estudo é preferido pela indústria farmacêutica pela sua sensibilidade e baixo custo. Porém, não deve ser esquecido que, de acordo com o estabelecido pela resolução n.º. 398 (BRASIL, 2004b) também devem ser juntamente apresentados estudos da estabilidade a longo prazo, dependendo da condição escolhida para a realização do ensaio da estabilidade acelerada.

Utilizando as condições preconizadas pela resolução n.º. 398 (BRASIL, 2004b) para estudos da estabilidade acelerada para estabelecimento do prazo de validade provisório ($50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $90\% \pm 5\%$ U.R.), foram analisadas as amostras das espécies *Sambucus nigra* (amostra **26**) e *Sambucus australis* (amostra **10**).

Todas as amostras submetidas às variações de temperatura e umidade apresentaram modificações de coloração, passando de amarelo claro à amarelo escuro e o odor, que era levemente adocicado, acentuou-se.

Os resultados obtidos nas análises de quantificação de rutina nas soluções extrativas das amostras submetidas ao teste de estabilidade, utilizando metodologia validada de CLAE, encontram-se na Tabela 2.21. Cabe salientar que o valor dos fatores de diluição da solução extrativa para as amostras da espécie *Sambucus nigra* foram 100, bem como para o ponto zero e 1 das soluções extrativas das amostras de *Sambucus australis*. Porém, para as amostras relativas ao ponto 2 e 3 de *Sambucus australis* o fator de diluição foi igual a 50 pelo fato dos valores das áreas obtidas inicialmente não se encontrarem na faixa linear obtida com a curva de linearidade.

Nas Figuras 2.14 e 2.15, estão apresentadas sobreposições dos cromatogramas obtidos após a injeção das soluções extrativas relativos a cada ponto da análise, das amostras de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis* e, na Figura 2.16, estão apresentados graficamente os perfis de decaimento dos teores percentuais de rutina.

Tabela 2.21 Análise da estabilidade acelerada para as amostras das espécies *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham & Schldl..

Amostras	<i>Sambucus nigra</i>			<i>Sambucus australis</i>		
	Áreas médias*	T. R. ± DP*	DPR (%)*	Áreas médias*	T. R. ± DP*	DPR (%)*
P0	665667,37	1,18 ± 0,013	1,10	747987,37	1,33 ± 0,0035	0,26
P1	595743,78	1,05 ± 0,02	1,90	514890,92	0,95 ± 0,013	1,37
P2	536203,07	0,95 ± 0,01	1,05	757906,72**	0,66 ± 0,0068	1,03
P3	495554,67	0,88 ± 0,01	1,14	663167,61**	0,57 ± 0,01	1,75

T. R. ± DP – Teor de rutina (% m/m) ± desvio padrão.

* Para cada ponto da análise foram tomadas três amostras e feitas três determinações para cada, totalizando 9 determinações.

** Diluição diferenciada, fator de diluição = 50.

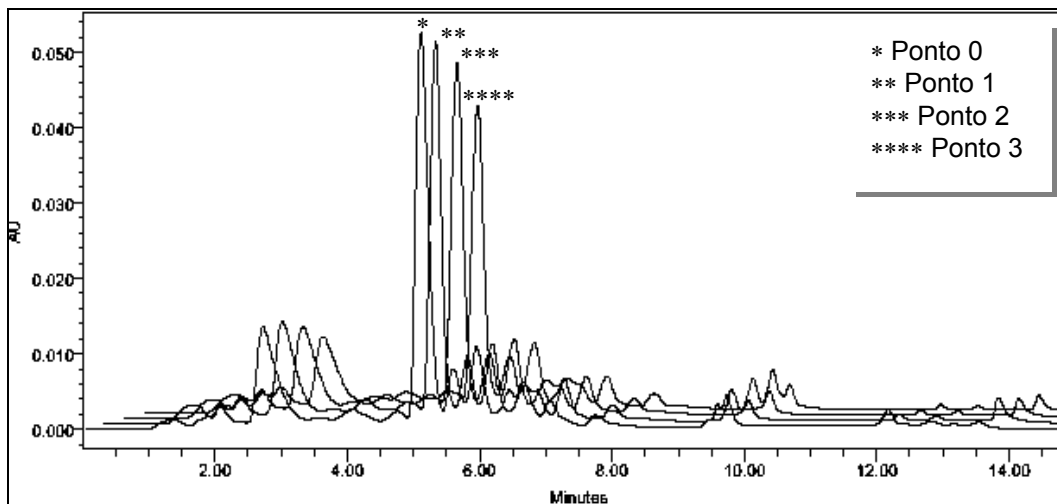


Figura 2.14 Cromatogramas das soluções extrativas de *Sambucus nigra* L. submetidas à análise da estabilidade acelerada ($50^{\circ}\text{C} \pm 90\%$).

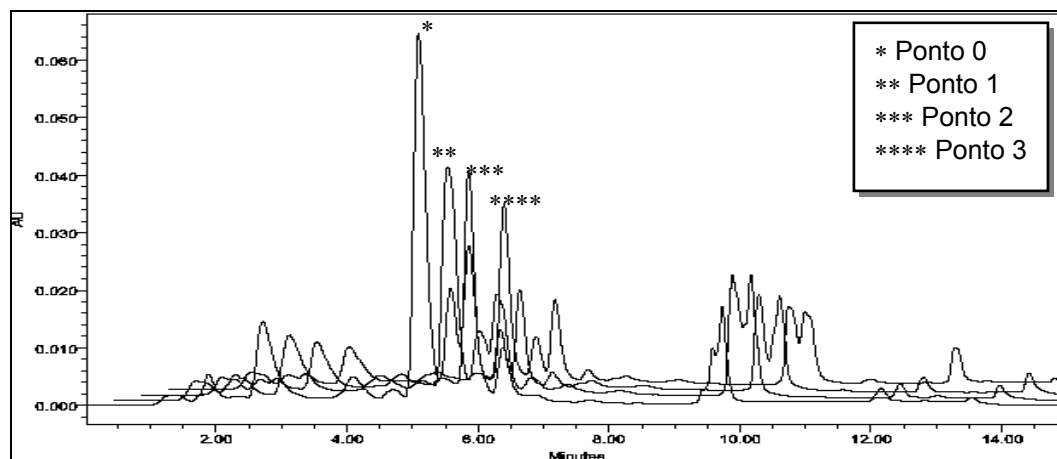


Figura 2.15 Cromatogramas das soluções extrativas de *Sambucus australis* Cham. & Schltidl submetidas à análise da estabilidade acelerada ($50^{\circ}\text{C} \pm 90\%$).

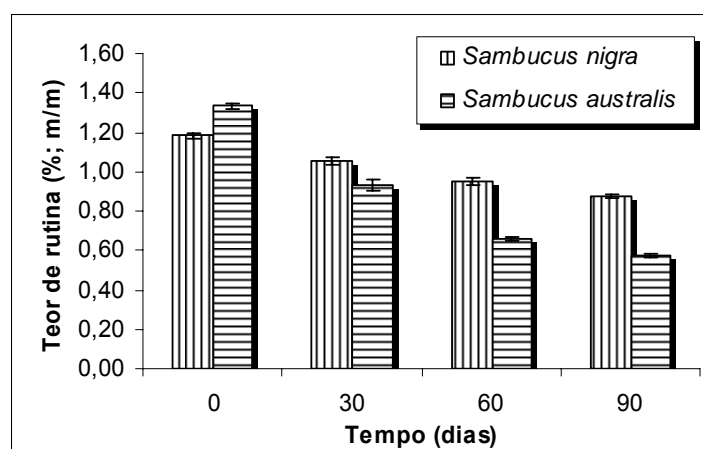


Figura 2.16 Perfil da redução do teor percentual de rutina obtido a partir das análises cromatográficas das soluções extrativas obtidas de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltidl..

Analisando os resultados apresentados na Tabela 2.21 e visualizando as Figuras 2.14, 2.15 e 2.16, percebeu-se um decaimento dos valores para o teor de rutina em ambas amostras.

Resolveu-se então determinar a ordem das reações de degradação utilizando os valores obtidos com os coeficientes de correlação calculados através da regressão linear dos dados observados (Tabela 2.22 e 2.23) após a análise das amostras.

Reação de ordem zero – a velocidade da reação é independente da concentração dos reativos, o fator limitante não é a concentração.

Reação de primeira ordem – a velocidade de reação é proporcional à concentração de um de seus reativos.

Reação de segunda ordem – a velocidade de reação é proporcional à concentração dos reativos ou à segunda potência de um deles.

Tabela 2.22 Valores experimentais dos teores de rutina obtidos no estudo da estabilidade acelerada com as amostras de *Sambucus nigra* L., através do método proposto de cromatografia a líquido de alta eficiência, considerando-se as diferentes ordens de reação.

Tempo (dias)	Reação de ordem zero Teor em rutina (%) ^{(1)*}	Reação de primeira ordem log C ^{(2)*}	Reação de segunda ordem 1/C ^{(3)*}
0	1,184	0,0733	0,8447
30	1,053	0,0229	0,9488
60	0,948	-0,0234	1,0554
90	0,877	-0,0566	1,1393

* Média de todas as determinações feitas com a triplicata das amostras (9 determinações).

(1) coeficiente de correlação (r) = -0,9917

(2) coeficiente de correlação (r) = -0,9958

(3) coeficiente de correlação (r) = 0,9810

Tabela 2.23 Valores experimentais dos teores de rutina obtidos no estudo da estabilidade acelerada com as amostras de *Sambucus australis* Cham. & Schltdl., através do método proposto de cromatografia a líquido de alta eficiência, considerando-se as diferentes ordens de reação.

Tempo (dias)	Reação de ordem zero Teor em rutina (%) ^{(1)*}	Reação de primeira ordem log C ^{(2)*}	Reação de segunda ordem 1/C ^{(3)*}
0	1,334	0,125	0,750
30	0,935	-0,029	1,070
60	0,657	-0,182	1,522
90	0,575	-0,241	1,741

* Média de todas as determinações feitas com a triplicata das amostras (9 determinações).

(1) coeficiente de correlação (r) = -0,9634

(2) coeficiente de correlação (r) = -0,9829

(3) coeficiente de correlação (r) = -0,9923

De acordo com os resultados apresentados para os coeficientes de correlação observou-se que a cinética da reação de degradação encontrada para a espécie *Sambucus nigra* foi de primeira ordem, por outro lado, para a espécie nativa a reação foi de segunda ordem. Os gráficos obtidos com os valores que determinaram a cinética das reações estão apresentados nas Figuras 2.17 e 2.18.

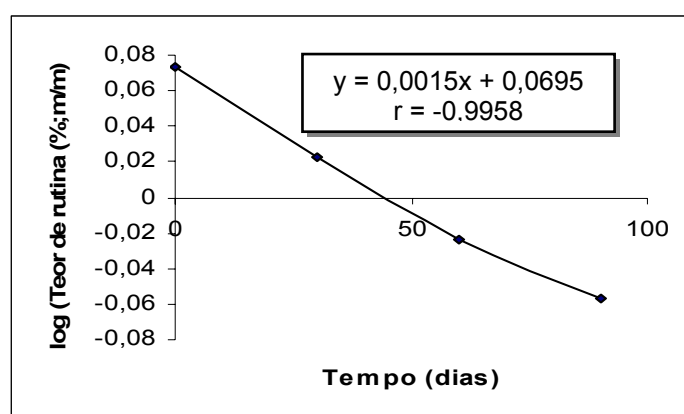


Figura 2.17 Representação gráfica da curva de degradação, com reação de primeira ordem para a amostra *Sambucus nigra* L.

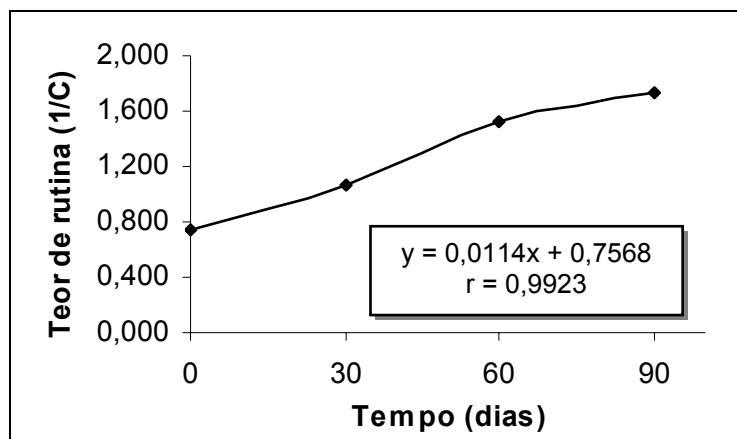


Figura 2.18 Representação gráfica da curva de degradação, com reação de segunda ordem para a amostra *Sambucus australis* Cham. & Schltldl.

Com os valores das Tabelas 2.22 e 2.23 também foi possível determinar a constante da velocidade de degradação (**k**) e o tempo de vida útil ($t_{90\%}$ = tempo em que a concentração da droga é 90% do valor inicial) através das equações 2.4:

Equação 2.4 Equações de primeira e de segunda ordem utilizadas para o cálculo da velocidade de degradação (**k**) e tempo que a substância leva para reduzir a 10% em concentração, relativo à sua concentração inicial (NUDELMAN, 1976):

Primeira ordem

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{C_0}{C}$$

$$t_{90\%} = \frac{0,106}{k}$$

Segunda ordem

$$k = \frac{1}{t} \left(\frac{1}{C} - \frac{1}{C_0} \right)$$

$$t_{90\%} = \frac{1}{9k C_0}$$

Onde:

C_0 = Concentração inicial da substância ativa;

C = Concentração da substância ativa no tempo “t”;

k = Constante da velocidade de reação;

t = Tempo, em dias.

A constante da velocidade de degradação encontrada para a reação de primeira ordem nas análises de *Sambucus nigra* foi de $0,0033 \text{ dias}^{-1}$ e o tempo para

que o marcador reduza 10% de sua concentração inicial é de aproximadamente 32 dias para 50°C e 90 % U.R.. Para a reação de segunda ordem determinada após as análises de *Sambucus australis*, os valores encontrados para k foram 0,0109 dias⁻¹ e o $t_{90\%}$ é aproximadamente 8 dias nas condições indicadas.

Segundo NUDELMAN (1976) é necessário que, para avaliação da cinética da reação, a degradação deve estar em estágio avançado de, no mínimo 50%, pois os valores obtidos para a velocidade de reação podem ser pouco precisos e geralmente maiores que o valor real. Valores de degradação acima de 20% já podem predizer a real ordem cinética.

Quando calculados os percentuais médios de degradação do teor de rutina, evidenciaram-se reduções superiores a 10% e 28% para *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*, respectivamente, nas análises feitas após os primeiros 30 dias, aumentando o valor da degradação para as demais amostras analisadas, atingindo até 27% e 57%, após os 90 dias do estudo.

Conforme descrito acima e baseado nos resultados obtidos para *Sambucus nigra*, onde a redução do teor de rutina inicial foi inferior ao mínimo indicado, resolveu-se eliminar os dados referentes ao ponto 1 de análise para verificar se houve mudança na ordem da reação, passando para um valor de degradação inicial de aproximadamente 20%.

Os coeficientes de correlação obtidos para os novos gráficos de ordem zero, primeira e segunda ordem foram -0,9941, -0,9964 e 0,9985, respectivamente. Com isso percebeu-se uma modificação na ordem de reação para a degradação de rutina, sendo agora, de segunda ordem, mais fidedigna, segundo a teoria de NUDELMAN (1976). O novo gráfico e o coeficiente de correlação obtido estão apresentados na Figura 2.19.

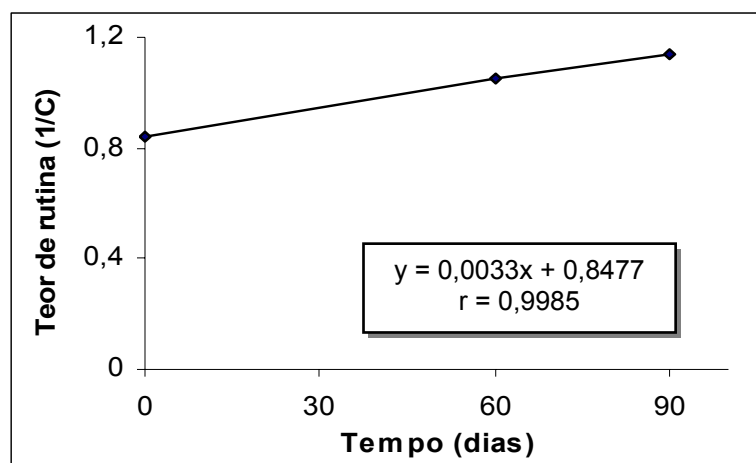


Figura 2.19 Representação gráfica da curva de degradação, com reação de segunda ordem para a amostra *Sambucus nigra* L.

Foram calculados também a constante de degradação (**k**) e o $t_{90\%}$ para esta nova cinética de degradação. Os valores encontrados foram de $0,0032 \text{ dias}^{-1}$ para o valor de **k** e para o $t_{90\%}$ aproximadamente 30 dias.

Ao serem analisados todos os picos passíveis de integração dos cromatogramas obtidos com as soluções extrativas provenientes das amostras do estudo de estabilidade para *Sambucus nigra*, foi feita a média das triplicatas analisadas, plotando em gráfico estes valores (Figura 2.20). Foi possível realizar o agrupamento dos picos por classes de compostos de acordo com a observação das absorvâncias na região do ultravioleta apresentadas, registradas em CLAE/DAD, e pela comparação com os valores dos padrões encontrados na Tabela 2.10.

Os picos indicados como **1** podem pertencer à classe dos ácidos fenólicos (possivelmente ácido clorogênico e / ou ácido caféico, entre outros), como **2** os glicosídeos de flavonóides (possivelmente hiperosídeo e isoquercitrina) e no grupo **3** provavelmente os flavonóides aglicosilados (quercetina e canferol).

Analisando dados de área utilizados na construção da Figura 2.10, observou-se que 2 dos 3 picos, do grupo **2**, apresentaram seus valores de área média aumentados após os primeiros 30 dias na câmara climática, seguidos do decaimento destes valores com o passar dos dias. Também foram visualizados nesta figura, dois

picos pertencentes ao grupo 1 (6,9 e 7,7 minutos) que surgiram no primeiro ponto de análise e um sensível aumento no primeiro pico do grupo 3.

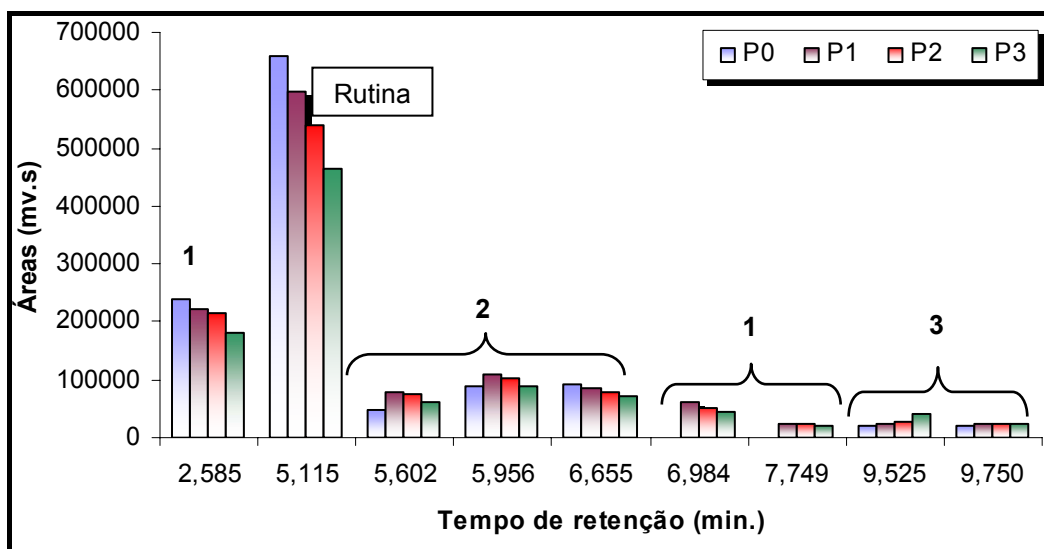


Figura 2.20 Análise da área dos principais picos encontrados nos cromatogramas de *Sambucus nigra* L. obtidos com a análise das amostras provenientes do estudo de estabilidade.

Com a mesma análise realizada para os picos presentes no cromatograma de *Sambucus australis* (Figura 2.21) observou-se, a formação de 4 grupos de compostos: 1, ácidos fenólicos, 2 glicosídeos de flavonóide (sem possíveis indicações), 3 glicosídeos de flavonóides (possivelmente hiperosídeo, isoquercitrina e derivado de canferol) e 4 flavonóides aglicosilados (quercetina e canferol).

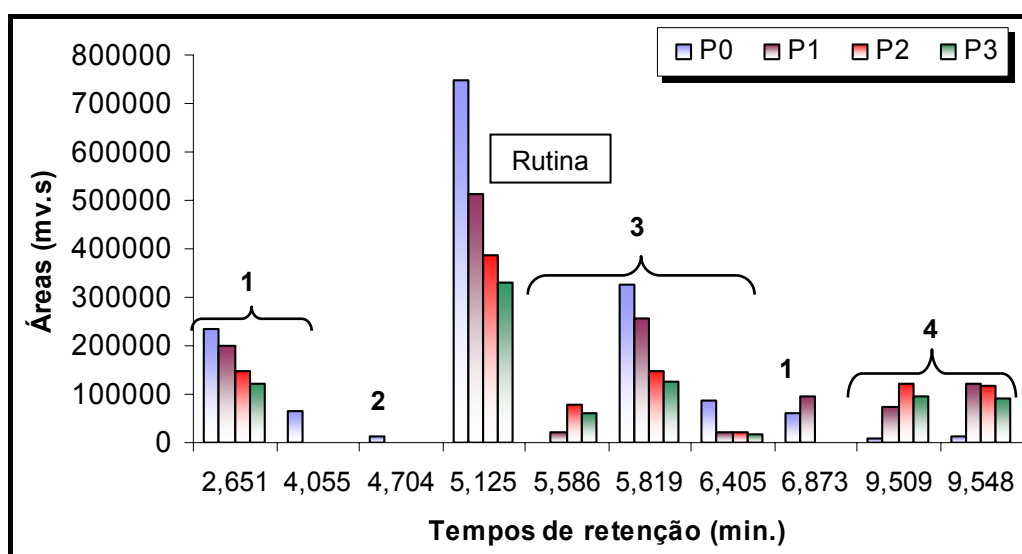


Figura 2.21 Análise da área dos principais picos encontrados nos cromatogramas de *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. obtidos com a análise das amostras provenientes do estudo de estabilidade.

Observou-se, visualizando a Figura 2.21, que o pico do grupo **2** desapareceu após 30 dias de permanência das amostras na câmara climática. Para um dos picos do grupo **1** (2,6 minutos) e dois picos do grupo **3** (5,8 e 6,4 minutos) percebeu-se uma gradual diminuição nos valores das áreas integradas nas análises cromatográficas feitas em todos os pontos. Os picos contidos no grupo **4** e um dos picos do grupo **3** (5,586 minutos) apresentaram gradativo aumento no valor das áreas nas análises referentes ao ponto 1 (após 30 dias) e ponto 2 (após 60 dias), seguido de uma diminuição quando avaliados após decorridos os 90 dias de estudo. E, finalmente o pico do grupo **1**, em 6,8 minutos, não pode ser mais visualizado nas análises referentes aos 60 e 90 dias.

Realizando avaliação global dos resultados, verificou-se para ambas as amostras que houveram maiores degradações dos compostos do que o surgimento ou aumento de outros constituintes, principalmente para a rutina, indicando a possibilidade de pequena, mas não total hidrólise dos glicosídeos de flavonóides em suas agliconas.

2.5.8 Análise das amostras coletadas, comerciais ou fornecidas pelo Laboratório de Farmacognosia (UFRGS).

Os resultados do teor de flavonóides totais obtidos para as 13 amostras de *Sambucus nigra* adquiridas no comércio e / ou fornecidas pelo laboratório de Farmacognosia desta Faculdade e 15 das 18 amostras de *Sambucus australis* coletadas em diferentes localidades encontram-se apresentados resumidamente na Tabela 2.20, constatando-se diferença estatisticamente significativa entre as médias dos resultados quando aplicado o teste “t” de *Student*.

Todos os resultados dos teores de quercetina obtidos, bem como os resultados das análises cromatográficas para quantificação do teor de rutina encontram-se em Anexo (Tabela B1).

A Tabela 2.24 apresenta as médias para os teores de rutina encontrados nas 31 amostras analisadas através de CLAE.

Tabela 2.24 Teores médios de rutina encontrados nas amostras comerciais e/ou fornecidas pelo laboratório, de *Sambucus nigra* L. e nas amostras coletadas de *Sambucus australis* Cham. & Schldl..

Amostras	Teor de rutina (%;m/m) ± DP*	DPR (%)
<i>Sambucus nigra</i>	1,03 ± 0,28	27,0
<i>Sambucus australis</i>	1,20 ± 0,43	35,0

*Para cada ponto da análise foram tomadas três amostras e feitas três determinações.

Observando os resultados verificou-se que as amostras de *Sambucus nigra* apresentaram valores percentuais de rutina de 0,68 a 1,64%, enquanto que para a outra espécie foram de 0,63 a 2,18%. Para os teores de quercetina encontrados com as análises de flavonóides totais foram obtidos os valores de 0,99 a 1,95% para a primeira espécie e de 1,46 a 3,30% para *Sambucus australis*. Sendo assim, cabe ressaltar que nestas análises realizadas a espécie nativa apresentou conteúdo flavonoídico superior à espécie de origem bastante comercializada e estudada. Porém, realizando a análise estatística do teste “t” de *Student* para os teores médios de rutina ($t_{\text{calc}}=1,126$; $t_{\text{tab}}= 2,045$), observou-se que não existe diferença significativa ($p < 0,05$).

Ao serem estabelecidos os limites mínimos de rutina e quercetina para utilizá-los no controle de qualidade destas matérias-primas vegetais, percebeu-se a existência de grande similaridade para os valores mínimos de rutina encontrados. Também verificou-se que o valor máximo desta substância em *Sambucus nigra* encontrou-se dentro da faixa verificada para a outra espécie, dificultando a diferenciação das mesmas. Desta forma, na análise espectrofotométrica calculada como quercetina, quando os valores para *Sambucus nigra* ultrapassam 1,5%, estes já coincidem com o valor mínimo encontrado para *Sambucus australis*.

Ao analisar a data de aquisição das amostras de *Sambucus nigra*, observou-se a existência de amostras adquiridas no ano de 2001 até o ano de 2004. Os teores de quercetina encontrados com a análise de flavonóides totais não apresentaram variações significativas, bem como nas análises do teor de rutina e os perfis cromatográficos visualizados apresentaram grande similaridade (Figura 2.22). Com isso percebeu-se a estabilidade relativa destas amostras em um período de 3 anos estocadas em condições não controladas.

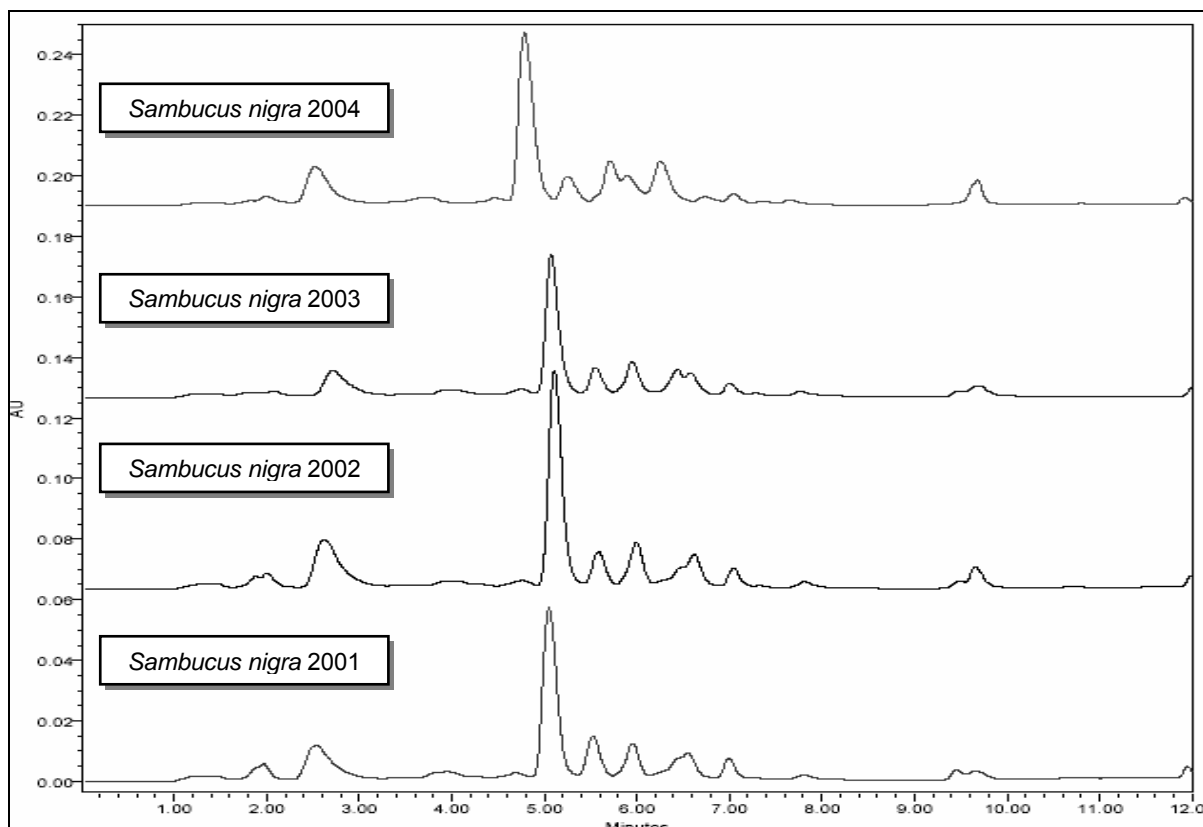


Figura 2.22 Cromatogramas das soluções extrativas das amostras de *Sambucus nigra* L. adquiridas nos anos de 2001 até 2004.

Para algumas amostras de *Sambucus australis* (amostras 10 a 15 / Tabela B1 em Anexo) foi possível realizar a coleta das flores de um mesmo indivíduo nos anos de 2003 e 2004. Após as análises espectrofotométricas e cromatográficas, observou-se que houve uma variação no teor de quercetina (amostras 10 a 15) e no teor de rutina (amostras 14 e 15) e grande similaridade nos perfis cromatográficos (Figura 2.23), certificando-se que um mesmo indivíduo pode apresentar variação nos valores dos constituintes encontrados ao ser coletado em anos diferentes, mesmo na mesma época, uma vez que tratam-se de flores.

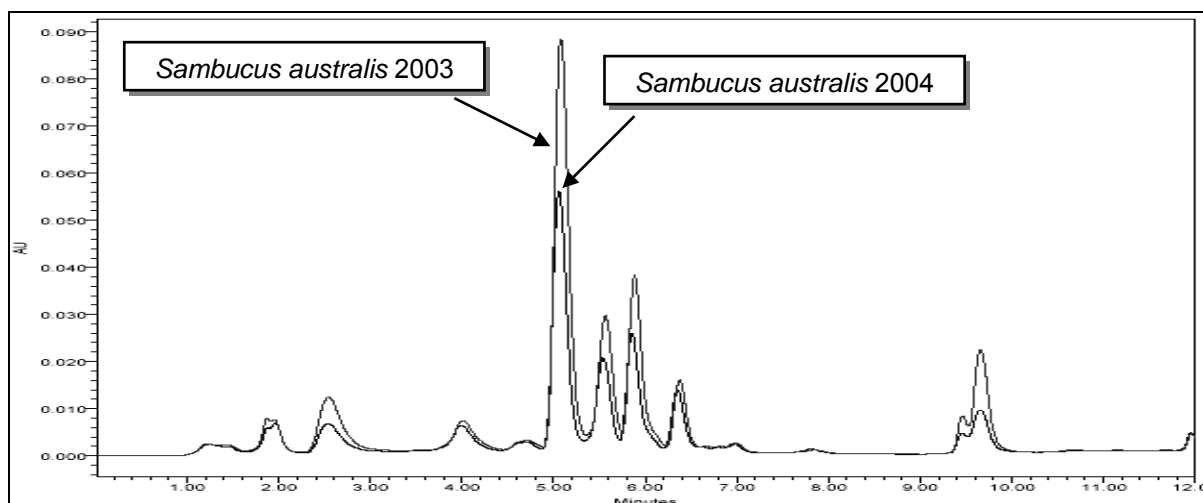


Figura 2.23 Cromatogramas das soluções extrativas das amostras de *Sambucus australis* Cham. & Schltl. adquiridas nos anos de 2003 e 2004.

A fim de realizar comparações edafoclimáticas, a espécie *Sambucus australis* foi coletada em diferentes localidades como Porto Alegre, Viamão, Caxias do Sul (Cidade e Interior), Veranópolis, Santa Maria no estado do Rio Grande do Sul e Praia da Guarda do Embaú, Município de Palhoça no estado de Santa Catarina.

Em Anexo, estão apresentados todos os cromatogramas das amostras analisadas através de CLAE, nas Figuras B1 até Figura B31. A análise dos resultados foi feita inicialmente por localidades e posteriormente entre as localidades.

Região 1 - Viamão e Porto Alegre – observaram-se 5 picos principais nos cromatogramas, bem como a região equivalente às agliconas, apresentando muita semelhança entre si. É importante salientar a presença de um pico com tempo de retenção em torno de 6,0 minutos que, no cromatograma da Figura B3, apresenta-se com área maior do que a substância selecionada como marcador químico.

Região 2 – Caxias do Sul (Cidade e Interior) – na maioria das amostras coletadas, foram observados 5 picos principais e a região referente às agliconas, algumas muito semelhantes entre si. Em todas elas o pico majoritário foi a rutina e os picos seguintes variaram no sentido quantitativo, não significativamente. Não foi possível determinar um padrão que diferenciasse as duas localidades.

Região 3 – Veranópolis – os cromatogramas apresentaram 7 picos passíveis de integração, sendo rutina o majoritário.

Região 4 – Santa Maria – as duas amostras apresentaram diferenças quantitativas entre si, nos picos subseqüentes ao majoritário.

Região 5 – Praia da Guarda do Embaú – observou-se 7 picos principais, com rutina como marcador e uma quantidade significativa do pico visualizado em torno de 10 minutos.

A Figura 2.24 apresenta os cromatogramas referentes às cinco regiões indicadas.

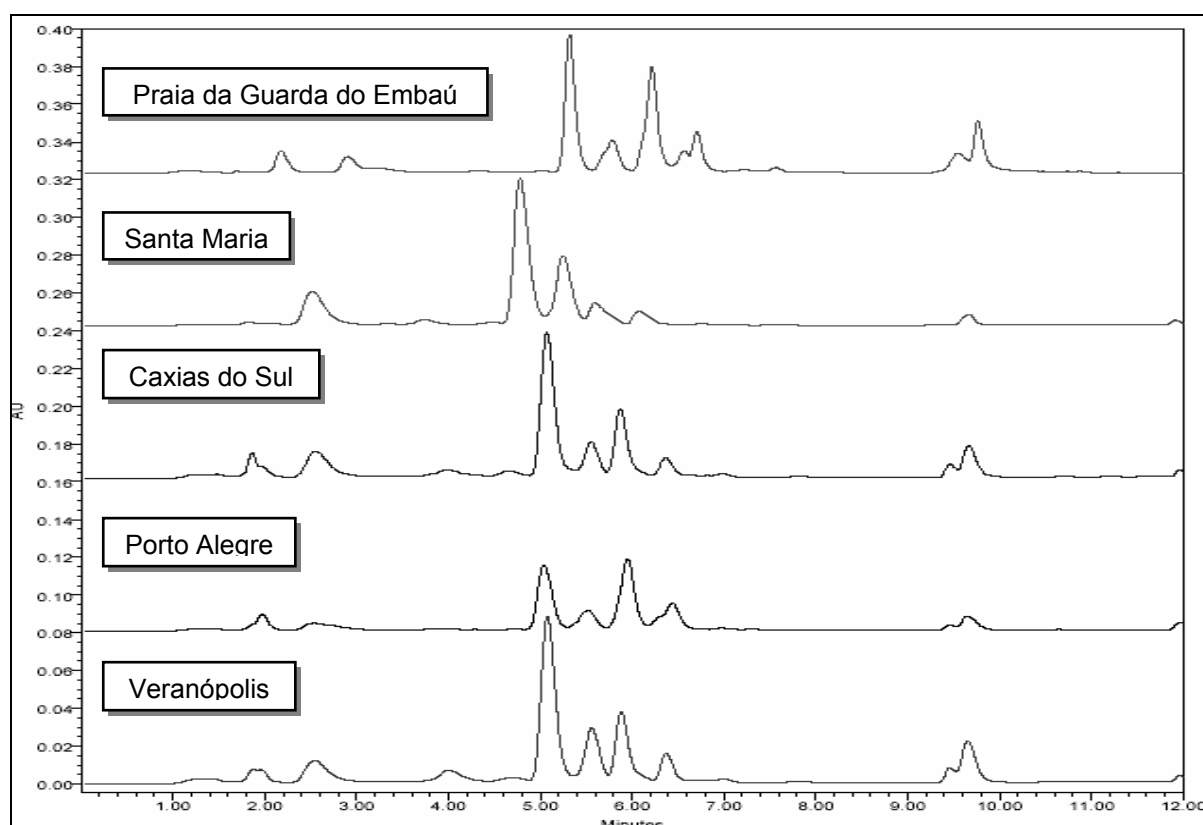


Figura 2.24 Cromatogramas referentes a amostras de *Sambucus australis* Cham. & Schldl. coletadas nas localidades de Veranópolis, Porto Alegre, Caxias do Sul, Santa Maria e Praia da Guarda do Embaú (SC).

Percebeu-se que não existem diferenças qualitativas relevantes, e sim algumas quantitativas nas amostras das diferentes localidades, uma vez que, somente em uma delas (Porto Alegre), o pico majoritário não foi a rotina.

O cromatograma obtido para a amostra representante da região 3 assemelhou-se muito aos perfis observados para os cromatogramas da região 2. Para a região de Santa Maria um dos cromatogramas (Amostra16) apresentou perfil semelhante às amostras da região 1 e o outro (Amostra 17), semelhante as amostras da região 2. Finalmente, para a amostra obtida em Santa Catarina o perfil cromatográfico foi análogo aos apresentados na região 1.

Estas pequenas diferenças observadas provavelmente relacionaram-se com as condições climáticas gerais e o tipo de solo de cada região, como Caxias do Sul e Veranópolis que estão localizadas na região serrana, Porto Alegre, Viamão e a Praia da Guarda do Embaú, ao nível do mar e Santa Maria na região central do Estado.

Após a análise botânica (Capítulo 1) foi possível observar uma diferença dentro da espécie nativa, relativa ao tipo de estames presentes nas flores, caracterizando-as como estaminadas e pistiladas. Ao realizar a análise dos perfis cromatográficos (Figura 2.25) observou-se diferenças quantitativas visuais, porém na amostra considerada estaminada houve a ocorrência de um pequeno pico no tempo de retenção próximo à 4 minutos que não foi observado no cromatograma obtido para a amostra que apresentou a outra característica.

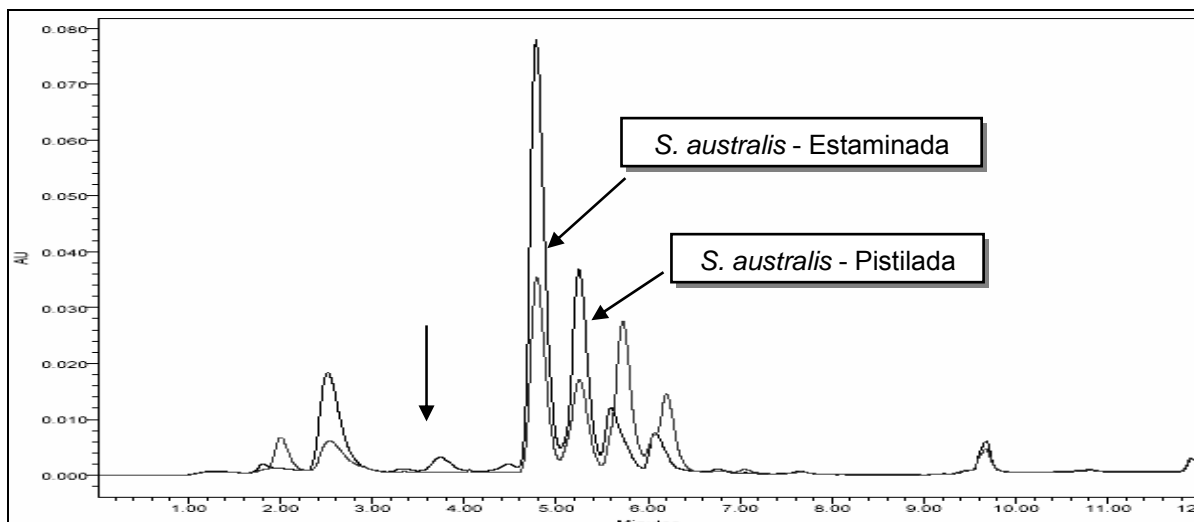


Figura 2.25 Sobreposição de cromatogramas referentes à diferença relativa ao comprimento dos estames encontrados em *Sambucus australis* Cham. & Schldl.. A seta indica uma pequena diferença entre os cromatogramas.

Pode-se inferir, então, que a constituição química da matéria-prima vegetal pode variar devido a fatores genéticos, clima, qualidade do solo, coleta, origem, processo de secagem e outros fatores externos e internos. Esses apontamentos demonstram que a padronização não é somente necessária para operações tecnológicas como também deve-se garantir uma composição química constante em parâmetros anteriores à essas operações, assegurando confiança e repetibilidade para investigações clínicas e farmacológicas (CAPASSO *et al.*,2000; LIANG *et al.*, 2004).

CAPÍTULO 3
AVALIAÇÃO BIOLÓGICA
ATIVIDADES ANTIINFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE

3.1 INTRODUÇÃO

Terapias medicamentosas convencionais estão sendo cada vez mais substituídas, pela população mundial, por outras que utilizem fitoterápicos ou preparados vegetais capazes de fornecer os mesmos efeitos benéficos, porém minimizando assim os indesejáveis efeitos colaterais.

O uso de plantas como medicamento está fundamentado em estudos etnofarmacológicos que, partindo do uso tradicional e do conhecimento popular sobre as propriedades farmacológicas (antiinflamatória, analgésica, antiespasmódica, antitérmica, laxativas, entre outras) de certas drogas vegetais, indicam o potencial para o desenvolvimento de novos fitoterápicos.

As atividades biológicas sugeridas pela população para espécies vegetais estão sendo constantemente comprovadas através de estudos científicos. Pesquisadores apontam alguns grupos de substâncias químicas, presentes nas plantas examinadas, como responsáveis por tais atribuições. Entre os principais grupos químicos destacam-se os flavonóides que apresentam grande variedade de efeitos farmacológicos, incluindo ação anticarcinogênica e antiproliferativa (HOLLMAN *et al.*, 1996; PELZER *et al.*, 1998), antibacteriana, antiviral, vasodilatadora, antialérgica, analgésica (PELZER *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1998; HARBORNE & WILLIAMS, 2000; LÓPEZ *et al.*, 2001), citotóxica, antil hipertensiva e hipolipidêmica (PELZER *et al.*, 1998).

Além destas atividades relatadas para os flavonóides, encontram-se também as propriedades antiinflamatória e antioxidante, que vêm sendo exaustivamente estudadas na última década (TOURNAIRE *et al.*, 1993; FORMICA & REGELSON, 1995; RICE-EVANS *et al.*, 1996; YOKOSAWA *et al.*, 1997; PELZER *et al.*, 1998; Di CARLO *et al.*, 1999; HARBORNE & WILLIAMS, 2000; NIJVELDT *et al.*, 2001; SUYENAGA, 2002; AMIĆ *et al.*, 2003; TSIMOGIANNIS & OREOUPLOU, 2004).

Em relação ao efeito antiinflamatório produzido por estes compostos, encontram-se relatos na literatura indicando seu mecanismo de ação, onde os

flavonóides podem interferir nas rotas das enzimas ciclo-oxigenase e / ou a 5-lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico (HARBORNE & WILLIAMS, 2000), aumentando a permeabilidade capilar, inibindo a exudação protéica e migração de leucócitos (PELZER *et al.*, 1998), entre outros.

Por outro lado os flavonóides podem também agir como quelantes do radical oxigênio (1O_2) e seqüestradores de várias espécies de radicais, como o ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxila e peroxila (TOURNAIRE *et al.*, 1993; HARBORNE & WILLIAMS, 2000; AMIĆ *et al.*, 2003) e, efetivamente suprimir a peroxidação lipídica em tecidos biológicos e frações subcelulares como mitocôndrias, microsomos, lipossomos, lipoproteínas de baixa densidade e membrana eritrocitária (YOKOSAWA *et al.*, 1997; NG *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2001; GEORGETTI *et al.*, 2003; TSIMOGIANNIS & OREOUPLOU, 2004), demonstrando assim, sua potencial atividade antioxidante.

A atividade antiinflamatória pode ser avaliada por modelos *in vitro* (ex: quimiotaxia) e *in vivo* (ex: edema em pata de ratos, pleurisia e microcirculação *in situ*). Um dos métodos *in vivo* mais utilizados é o ensaio de edema em pata de ratos induzido por carragenina, relatado por WINTER e colaboradores (1962). A obtenção dos resultados neste experimento é feita com auxílio de pletismômetro, do qual as patas são imersas em uma solução, e o volume deslocado (ml) corresponde ao inchaço provocado pelo agente flogístico, quando comparado com um controle. O edema produzido pelo mesmo agente flogístico também pode ser avaliado pela determinação do diâmetro (mm) da pata do rato na altura da articulação tíbio-társica.

Para a avaliação da ação antioxidante, diversos são os métodos relatados. Entre estes encontram-se o ensaio de peroxidação lipídica, método colorimétrico com β -caroteno e métodos fotolorimétricos utilizando β -caroteno, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) e hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Este último é considerado um ensaio válido e fácil para avaliar o potencial dos flavonóides como seqüestradores de radicais livres através da rápida doação de um átomo de hidrogênio, estabilizando o radical (MENSOR *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2003; DAWIDOVICZ *et al.*, 2005).

3.2 OBJETIVOS

Com relação à avaliação das atividades biológicas, os objetivos deste trabalho consistem em verificar a atividade antiinflamatória *in vivo* através do ensaio de edema em pata de rato e a atividade antioxidante *in vitro* através do método de doseamento colorimétrico do radical hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) para as soluções extrativas hidroetanólicas e aquosas das flores das espécies *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*.

3.3 REVISÃO DA LITERATURA

3.3.1 Gênero *Sambucus* sp.

O gênero *Sambucus* é composto por diversas espécies que apresentam importantes atividades biológicas. Entre os principais farmacógenos utilizados para a realização destes ensaios estão as folhas e rizomas, e alguns estudos estão descritos a seguir.

Para uma espécie de sabugueiro encontrada na Argentina (*Sambucus peruviana*), HERNÁNDEZ e colaboradores (2000) demonstraram que extratos das partes aéreas apresentaram atividade antibacteriana frente à cocos gram positivos como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* quando comparados ao padrão cloranfenicol. Outro relato para esta espécie, porém, nativa do Peru, foi relacionado à significativa atividade encontrada para extratos etanólicos de folhas e brotos para *Staphylococcus conhii*, *Streptococcus bovis*, *Clostridium histolyticum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacterioides fragilis* e *Bacillus megaterium* (NETO *et al.*, 2002).

Estudando uma espécie iraniana de *Sambucus ebulus*, AHMADIANI e colaboradores (1998) realizaram testes para a avaliação da atividade antiinflamatória aguda, atividade antinociceptiva e a toxicidade aguda dos extratos metanólicos obtidos de folhas, raízes e rizomas. Quanto aos resultados obtidos, o extrato metanólico dos rizomas apresentou-se efetivo para todos os experimentos citados e os autores atribuíram à presença de flavonóides e esteróides na planta.

Encontrada também na Turquia, a espécie mencionada anteriormente apresentou considerável atividade para três cepas de *Helicobacter pylori*, utilizando extratos em clorofórmio das folhas (YESILADA *et al.*, 1999).

Compostos isolados de folhas da espécie *Sambucus formosana*, identificados como palmitato de α - e β - amirina, β - amirina e β -sitosterol, e um novo composto

como o éster triterpênico sambuculina A, têm sido citados por exibir forte atividade antihepatotóxica contra danos no fígado produzidos experimentalmente por tetracloreto de carbono (LIN & TOME, 1988).

Para a espécie *Sambucus mexicana*, coletada na Guatemala, algumas atividades foram relatadas, principalmente, para suas folhas, como a atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* e *Shigella flexneri* (CACERES *et al.*, 1990), antimicótica em cepas de *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *algodonosa*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *granulare* e *Trichophyton rubrum* (CACERES *et al.*, 1991) e sua ação frente cepas da enterobactéria *Vibrio cholerae* (ESPAÑA *et al.*, 1994).

O extrato aquoso das raízes de *Sambucus williamsii* exibiu atividade analgésica e antiinflamatória em modelos experimentais de inflamação aguda e crônica em ratas, pela indução de carragenina (TUNÓN *et al.*, 1985). Os mesmos resultados foram descritos para o extrato bruto das folhas de *Sambucus mexicana* (ALONSO, 1998).

O único relato encontrado utilizando flores como material de partida foi descrito por MECKES-LOZOYA & CAMPOS (1985), onde utilizaram a espécie *Sambucus mexicana* para o preparo de infusões a 100 mg/ml e posterior avaliação *in vitro* sobre os efeitos de contração ou relaxamento produzidos em músculo liso (tecidos da aorta, traquéia, intestino e útero) de algumas espécies de animais (porcos da guiné, ratos, coelhos e cachorros). Os extratos produziram alteração da atividade muscular em quase todos os tecidos, exceto para os traqueais. Também foram estudados os parâmetros respiratórios, cardiovasculares e os efeitos sobre a glicemia em cachorros anestesiados (realizados simultaneamente), e ainda a atividade eletroencefalográfica em coelhos. Estes últimos testes não apresentaram atividade para a infusão das flores desta espécie relatada.

Além das espécies anteriormente citadas, cabe enfatizar os relatos populares e biológicos encontrados para as espécies *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*, objetos deste trabalho.

3.3.2 *Sambucus nigra* L. x *Sambucus australis* Cham. & Schltdl.

Usos populares

As aplicações terapêuticas modernas aprovadas no *British Herbal Compendium* (BRITISH, 1992) e pela Comissão E (HERBAL, 2000) para as flores de *Sambucus nigra* estão baseadas em uma combinação de fatores, incluindo sua longa história de utilização em sistemas da medicina tradicional bem estabelecidos, estudos pré-clínicos e investigações fitoquímicas.

Popularmente, infusões e decoctos das flores de *Sambucus nigra* em questão são utilizadas principalmente como diaforéticas em quadros febris (CORREA, 1984; MARTINS, 1989; ROMBI, 1991; BRITISH, 1992; QUER, 1993; ALONSO, 1998; MOERMAN, 1998; SIMÕES *et al.*, 1998; HERBAL, 2000; PDR, 2000; WHO, 2000; BRUNETON, 2001; CZYGAN *et al.*, 2001; EVANS, 2002; NEWALL *et al.*, 2002), também para debelar sarampo e escarlatina (CRUZ, 1979; CORREA, 1984), onde freqüentemente são combinadas com outras espécies, em bebidas quentes. Este farmacógeno supostamente aumenta a resposta das glândulas sudoríparas estimulando a produção de calor corporal, provavelmente tal efeito deva-se aos seus constituintes (flavonóides e ácidos fenólicos) ou pela simples ingestão de líquidos (BRITISH, 1992; PEIRCE, 1999; HERBAL, 2000; CZYGAN *et al.*, 2001).

São relatados também que infusões das flores atuam como diuréticas (SIMÕES *et al.*, 1998; PEIRCE, 1999; REVIEW, 2002; EVANS, 2002; BRITISH, 1992; NEWALL *et al.*, 2002), laxativas leves (ALONSO, 1998; SIMÕES *et al.*, 1998; PEIRCE, 1999; WHO, 2000; CZYGAN *et al.*, 2001; NEWALL *et al.*, 2002; REVIEW, 2002), antiinflamatórias (antireumática) (ALONSO, 1998; MOERMAN, 1998; SIMÕES *et al.*, 1998; D'AMÉLIO, 1999; WHO, 2000; NEWALL *et al.*, 2002), afecções nas vias respiratórias (tosses, bronquites, sinusites) (ALONSO, 1998; SIMÕES *et al.*,

1998; PEIRCE, 1999; HERBAL, 2000; PDR, 2000; WHO, 2000; CZYGAN *et al.*, 2001; NEWALL *et al.*, 2002), laringite (PDR, 2000), conjuntivite, dor de cabeça (WHO, 2000) e, ocasionalmente, usado para aumentar lactação (PDR, 2000; COIMBRA, 1958). Com as flores são preparadas pomadas e banhos utilizados em queimaduras, tônicos para erupções cutâneas (QUER, 1993; MOERMAN, 1998; SIMÕES *et al.*, 1998) e travesseiros herbais para inflamação e inchaço (PDR, 2000).

Quanto à espécie nativa *Sambucus australis*, foram encontrados relatos populares muito semelhantes a espécie anterior, sendo considerada “remédio do peito” pela eficiência contra problemas respiratórios (uso interno), além de ser descrita também como diurética, anti-séptica, cicatrizante e antiinflamatória (artrite e gota) (LORENZI & MATOS, 2002).

Desde o início do século XX o chá das flores desta espécie é indicado como antiálgico para dores em geral e como estimulante da sudorese (SILVA, 1929; CRUZ, 1979; CORREA, 1984; REITZ, 1985; SIMÕES *et al.*, 1998; JORGE *et al.*, 1999; LORENZI & MATOS, 2002). Possui indicações também para sarampo, catapora (CRUZ, 1979), como digestivo (ALICE *et al.*, 1995) e purgativo (SILVA, 1929). O farmacógeno também é utilizado externamente contra irritação dos olhos, dermatoses (erisipela, erupções cutâneas, pruridos, eczemas e reações alérgicas), queimaduras leves, úlceras bucais e pequenas injúrias, na forma de gargarejos, compressas e cataplasmas, aplicadas diretamente sobre as áreas afetadas (REITZ, 1985; LORENZI & MATOS, 2002).

Levantamentos etnobotânicos e etnofarmacológicos relacionados à *Sambucus nigra* foram realizados em países do hemisfério Norte, principalmente na Europa, indicando os principais usos para o seu farmacógeno, flores (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Descrição dos relatos etnobotânicos e etnofarmacológicos encontrados para *Sambucus nigra* L.

Localidade	Atividades relacionadas ao farmacógeno	Referência
L'Àlt Empordà e Lès Guilleries (Espanha)	Infusão e decocção – anticatarral, anticefálgico, anti-séptico ocular e digestivo.	BONET <i>et al.</i> , 1999.
Província de Lucca (Itália)	Infusão – digestiva.	PIERONI, 2000.
Território de Fluminimaggiore (Sardenha/ Itália)	Decocção - alívio de dores.	BALLERO <i>et al.</i> , 2001
Leste do Azerbaijão (Irã)	Infusão – antiinflamatória (reumatismo), utilizado para resfriados e bronquites e diaforéticas.	MIRALDI <i>et al.</i> , 2001
Província de Chieti (Abruzzo/Itália)	Infusão – para resfriados e asma, antipirético e promove diurese.	LEPORATTI & CORRADI, 2001.
Distrito de Sarrabus (Sardenha/ Itália)	Cataplasma – analgésico em dores de cabeça.	PALMESE <i>et al.</i> , 2001
Basilicata do Norte (Itália)	Decocção - dores de garganta.	PIERONI <i>et al.</i> , 2002
Marche, Abruzzo e Latium (Itália Central)	Infusão ou decocção – resfriados, asma e inflamação nos olhos.	GUARRERA, 2005.

Atividades farmacológicas

Foram apenas encontradas atividades farmacológicas cientificamente comprovadas para as flores da espécie *Sambucus nigra*.

Dentre os efeitos observados, está o efeito diurético. REBUELTA e colaboradores (1983) verificaram que uma infusão preparada com as flores de sabugueiro (200 ml/kg) causou diurese em ratos, apresentando maior eficácia do que a teofilina (5 mg/kg). Esta atividade foi atribuída à presença de flavonóides e sais de potássio presentes nos extratos (REBUELTA *et al.*, 1983; WHO, 2000). Segundo *The American Pharmaceutical Association* (PEIRCE, 1999), o efeito diurético pode ser explicado pelo extensivo uso do farmacógeno em pílulas para emagrecer e em outras fórmulas dietéticas, produzindo uma perda transitória de fluido corporal.

Outro efeito farmacológico foi apresentado por MASCOLO e colaboradores (1987) utilizando o ensaio de indução de edema em pata de rato por carragenina para verificar a atividade antiinflamatória das flores desta espécie. Extratos hidroetanólicos (80%) apresentaram atividade antiinflamatória moderada (27% de

inibição do edema em ratos Wistar machos) em doses de 100 mg/kg via oral quando comparados com o padrão indometacina (inibição de 45%). Alguns autores atribuíram a atividade apresentada por esta espécie, provavelmente à presença de ácido ursólico (LAWRIE *et al.*, 1964; MASCOLO *et al.*, 1987; WHO, 2000).

Extrato metanólico de flores inibiu a biossíntese das citocinas inflamatórias interleucina 1- α e 1- β e fator de necrose α (TNF- α) na concentração de 30 μ g/ml em células mononucleares periféricas *in vitro* (YESILADA *et al.*, 1997).

SERKEDJIEVA e colaboradores (1990), investigaram a atividade antiviral de uma infusão composta por flores de *Sambucus nigra* L., raiz de *Saponaria officinalis* L. e partes aéreas de *Hypericum perforatum* L., frente a cepas de vírus influenza tipos A e B (*in vitro* e *in vivo*) e herpes vírus tipo 1 (*in vitro*). Esta infusão inibiu a reprodução viral em diferentes cepas, sendo que tal atividade foi atribuída à presença de flavonóides, saponinas, ácidos fenólicos e polissacarídeos que atuam sinergicamente (BERGHE *et al.*, 1986; SERKEDJIEVA *et al.*, 1990; WHO, 2000). Outros estudos também relataram a atividade antiviral de extratos aquosos (liofilizados) e etanólicos contra o vírus HIV frente a diversas plantas. Todos os extratos etanólicos deste experimento apresentaram-se tóxicos frente às células humanas linfocíticas MT-2, porém os liofilizados de *Sambucus nigra* e *Sambucus ebulus* demonstraram baixa toxicidade (BEDOYA *et al.*, 2001).

GIAMPIERI e colaboradores (2003) observaram que o óleo obtido das flores de *Sambucus nigra* em aparelho de Clevenger possuiu fraca atividade antioxidante (29%) e quando obtido da extração etanólica (95%), foi praticamente inativo (3,6%), quando comparados ao controle positivo (timol-70%) e com o padrão BHT (3,5-di-terc-butil-4-hidroxitolueno) (100%). A ausência, no óleo, de constituintes que possuíssem atividade antioxidante, principalmente eugenol, foi a conclusão dos autores para o estudo (GIAMPIERI *et al.*, 2003).

Outro relato que descreve a atividade antioxidante, porém utilizando flores, folhas e frutos de *Sambucus nigra*, foi realizado por DAWIDOWICZ e colaboradores (2005). Os extratos hidroetanólicos (80%), obtidos a 20 e 100°C, bem como a

temperaturas crescentes de 20 a 200°C foram submetidos aos métodos utilizado DPPH (2,2-difenil-1-fenilhidrazila) e β -caroteno. Verificou-se que as flores apresentaram maior capacidade em neutralizar os radicais livres, ao passo que aos demais extratos, observou-se potencial atividade aos obtidos na temperatura de 100°C. Segundo os autores esta propriedade antioxidante está ligada à presença de flavonóides, que estão presentes em maiores quantidades nas flores. Quando avaliados os resultados obtidos utilizando temperaturas crescentes, foi observado que o aumento de temperatura na extração foi diretamente proporcional ao aumento de atividade para os extratos, sendo que isto ocorreu pelo fato de que em temperaturas elevadas, os flavonóides glicosilados podem sofrer hidrólise originando suas agliconas, para as quais é relatada sua pronunciada atividade antioxidante.

Constatou-se ausência de estudos farmacológicos para a espécie *Sambucus australis*, em relatos científicos, apesar das indicações populares encontradas. Frente aos relatos de atividades farmacológicas de *Sambucus nigra* e a escassez de informações referentes à espécie *Sambucus australis*, realizou-se estudo comparativo entre estas plantas, através da avaliação da atividade antiinflamatória pelo modelo de inibição de edema em pata de rato induzido pela carragenina e investigação do potencial efeito antioxidante, utilizando hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 Determinação da atividade antiinflamatória *in vivo*

Preparo das amostras

Para execução deste ensaio, foram preparados extratos hidroetanólicos a 80%, pelo fato destes apresentarem uma quantidade mais elevada de compostos fenólicos (como identificado no Capítulo 2) e, extratos aquosos sob forma de infusão, simulando o preparo de uso popular.

Os extratos hidroetanólicos para *Sambucus nigra* (amostra número **26** / Tabela 1.1) e *Sambucus australis* (amostra número **10** / Tabela 1.1) foram preparados utilizando 1,5 g de flores pulverizadas em 30 ml da mistura, previamente preparada, etanol : água (80:20), empregando, como método extrativo, turbólise. A solução, filtrada sob vácuo apresentou concentração final de 50 mg/ml após retomado o volume inicial. Este extrato foi evaporado sob pressão reduzida e, no momento da realização do experimento, foram adicionados 30 ml de água destilada.

A infusão foi preparada utilizando 1,5 g das flores secas e inteiras do material vegetal e cerca de 30 ml de água destilada em ebulição (acima de 90°C). Ainda quente, procedeu-se a filtração por gravidade, utilizando algodão. O volume de 30 ml foi retomado com água, atingindo assim, a concentração final de 50 mg/ml. Estes extratos foram armazenados sob refrigeração até o momento de seu uso.

Animais de experimentação

Ratos Wistar machos pesando de 180 a 200 g, provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa da Saúde (FEPPS), após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética desta Universidade, foram utilizados para a realização deste experimento. Estes animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia –

UFRGS, com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), controle de claro / escuro de 12 horas, umidade monitorada e acesso livre à água e ração.

Edema em pata de rato

O método de indução de edema em pata de rato utilizando carragenina como agente flogístico, descrita por Winter e colaboradores (1962) foi utilizado para avaliar a atividade antiedematogênica do extrato aquoso e hidroetanólico das flores das espécies *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*.

Os animais foram divididos em 3 grupos e administrou-se oralmente solução salina para o grupo controle (GC), solução de indometacina (SIGMA) na dose de 10 mg/kg para o grupo referência (GR) e os extratos aquosos e hidroetanólicos na dose de 250 mg/kg de peso corporal no grupo denominado tratado (GT).

Decorrida 1 hora após aos tratamentos, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, utilizando-se pentobarbital sódico na dose de 40 mg/kg de peso corporal, e mantidos sedados durante as medidas. A indução do edema foi realizada através da injeção de 0,1 ml de uma suspensão de carragenina em solução salina (5 mg/ml) na aponervose subplantar da pata traseira esquerda dos ratos. Na pata direita dos animais, utilizada como controle, foi injetado 0,1 ml de solução salina. O volume de ambas as patas de todos os animais foi medido, em triplicata, nos tempos de zero, 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção do agente flogístico utilizando o pletismômetro Ugo Basile modelo 7140. A atividade antiedematogênica foi expressa como percentual de inibição da formação do edema pelos extratos em relação aos grupos controle (média \pm erro padrão da média (epm) calculados antes e após a injeção do agente flogístico, através da análise estatística utilizando teste “t” de *Student*.

Solução utilizada no pletismômetro

- Solução utilizada no pletismômetro:

Cloreto de sódio	0,4 g
Solução de lauril sulfato de sódio*	4,0 ml
Água destilada	q.s.p. 1000 ml

* Solução de lauril sulfato de sódio

Lauril sulfato de sódio	0,05 g
Álcool etílico	5,0 ml
Água destilada	q.s.p. 1000 ml

As duas soluções quando prontas, devem ser armazenadas sob refrigeração.

Método de eutanásia e descarte do material biológico

Após a realização dos experimentos, os animais foram sacrificados por atordoamento com éter etílico (SINTH), em capela de exaustão, e posterior deslocamento cervical. Estes animais foram envoltos em sacos plásticos, e armazenados em freezer (-20° C), especialmente destinado para este fim, até a coleta pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Porto Alegre.

3.4.2 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

O ensaio da atividade antioxidante foi realizado através do método de doseamento fotocolorimétrico do radical hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), segundo a técnica descrita por MENSOR e colaboradores (2001). O ensaio foi realizado em colaboração com o Departamento de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Preparo das amostras

Extratos aquosos e hidroetanólicos (etanol:água; 80:20) na concentração de 50 mg/ml foram preparados a partir de flores pulverizadas de *Sambucus nigra* (amostra número **26**) e *Sambucus australis* (amostra número **10**) utilizando o método

de turbólise para extração. As amostras foram evaporadas sobre pressão reduzida e refrigeradas até o momento e sua utilização.

Preparo dos padrões

Solução metanólica de rutina (MERCK) e extrato padronizado de folhas de *Ginkgo biloba* (EGb 761[®]) foram utilizados como soluções referência. Com estes, foram feitas as mesmas diluições utilizadas para o preparo das soluções das amostras a serem testadas, descritas a seguir.

Desenvolvimento do ensaio fotocolorimétrico

As amostras e as soluções padrão foram inicialmente solubilizadas com etanol para obtenção de soluções estoque com concentrações de 1,0 mg/ml. Cada solução estoque foi diluída até concentrações finais de 5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/ml, em etanol. Em seguida, para cada 2,5 ml solução nas concentrações finais adicionou-se 1 ml da solução etanólica de DPPH (0,3 mM), deixando-as reagir à temperatura ambiente durante 30 minutos.

Como branco, utilizaram-se as soluções amostra adicionadas de 1,0 ml de etanol, sem o agente colorimétrico. O controle negativo foi preparado com 1,0 ml da solução de DPPH (0,3 mM) adicionada de 2,5 ml de etanol e as soluções padrões foram utilizadas como controle positivo, acrescidas de DPPH.

Decorrido o tempo de reação indicado, utilizou-se espectrofotômetro Shimadzu UV-2200 para determinar a absorvâncias das soluções no comprimento de onda de 518 nm. Os valores obtidos foram convertidos em percentual de atividade antioxidante (AA%) utilizando a Equação 3.1:

Equação 3.1 Equação para determinação do percentual antioxidante para as amostras de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltl..

$$AA\% = 100 - \frac{(AAM - AAB) \times 100}{AC}$$

Onde:

AAM = Absorvância da amostra;

AAB = Absorvância do branco;

AC = Absorvância do controle.

Os valores de CE₅₀ (concentração suficiente para obter 50% do efeito máximo estimado em 100%) foram calculados por regressão linear das curvas construídas das concentrações das plantas testadas *versus* percentuais da atividade antioxidante.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Atividade antiinflamatória

O efeito da administração dos extratos aquosos e hidroetanólicos das plantas testadas neste trabalho foram observados pela inibição da formação do edema em pata de ratos induzido por carragenina (Tabelas 3.2 e 3.3, Figuras 3.1 e 3.2).

Tabela 3.2 Efeito da administração v.o. dos extratos de *Sambucus nigra* (n= 6 a 8 animais).

Tratamento	Volume de edema de pata de (ml) ± epm (% inibição)			
	1h	2h	3h	4h
Controle	0,58 ± 0,15	0,85 ± 0,088	2,0 ± 0,15	2,54 ± 0,25
Indometacina (10 mg/kg)	0,4 ± 0,16 (30,93 %)	0,6 ± 0,13 (29,88 %)	0,33± 0,054* (83,33 %)	0,75± 0,27* (70,32 %)
Extrato aquoso	0,31 ± 0,75 (45,71 %)	0,17 ± 0,041* (79,7 %)	0,37± 0,11* (81,75 %)	0,78± 0,19* (69,24 %)
Extrato hidroetanólico	0,38 ± 0,082 (33,56 %)	0,63± 0,16 (26,1 %)	0,43± 0,15* (78,6 %)	0,36± 0,14* (86,24 %)

* p < 0,01, em relação ao controle. Indometacina $t_{tab} = 3,11$ extrato aquoso $t_{tab} = 3,01$; extrato hidroetanólico $t_{tab} = 3,05$

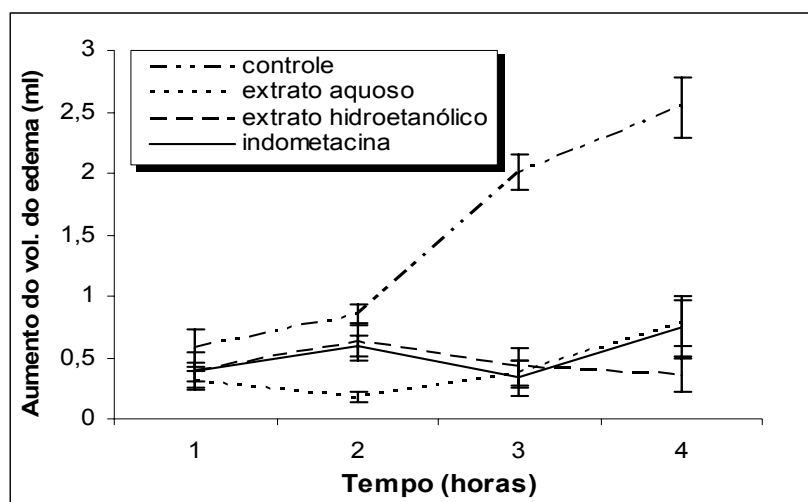


Figura 3.1 Efeito da administração v.o. do extrato de *Sambucus nigra* L. sobre o edema em pata de rato induzido por carragenina.

Analisando os resultados obtidos, constatou-se atividade antiedematogênica tanto para o extrato aquoso quanto para o hidroetanólico das flores de *Sambucus nigra*. Para o extrato aquoso observou-se inibição estatisticamente significativa ($p <$

0,01) a partir da segunda hora da administração do agente flogístico, até a quarta hora de avaliação. Este extrato apresentou inibição máxima (81,75 %) na terceira hora de análise.

Por outro lado, os resultados para o extrato hidroetanólico foram significativos ($p < 0,01$) somente na terceira e quarta horas, sendo que o máximo (86,24%) foi atingido na quarta hora.

Tabela 3.3 Efeito da administração v.o. dos extratos de *Sambucus australis* Cham. & Schltidl (n = 6 animais).

Tratamento	Volume de edema de pata de (ml) \pm epm (% inibição)			
	1h	2h	3h	4h
Controle	0,58 \pm 0,15	0,85 \pm 0,088	2,0 \pm 0,15	2,54 \pm 0,25
Indometacina (10 mg/kg)	0,4 \pm 0,16 (30,93 %)	0,6 \pm 0,13 (29,88 %)	0,33 \pm 0,053** (83,33 %)	0,75 \pm 0,27** (70,32 %)
Extrato aquoso	0,3 \pm 0,06 (48,80 %)	0,24 \pm 0,06** (71,96 %)	0,37 \pm 0,037** (81,70 %)	0,71 \pm 0,098** (72,11 %)
Extrato hidroetanólico	0,29 \pm 0,094 (49,1 %)	0,39 \pm 0,11* (54,51 %)	0,39 \pm 0,11** (80,37 %)	0,33 \pm 0,065** (86,14 %)

* $p < 0,05$ em relação ao controle. Extrato etanólico $t_{tab} = 1,51$

** $p < 0,01$ em relação ao controle. Indometacina $t_{tab} = 3,11$ extrato aquoso e hidroetanólico $t_{tab} = 3,05$

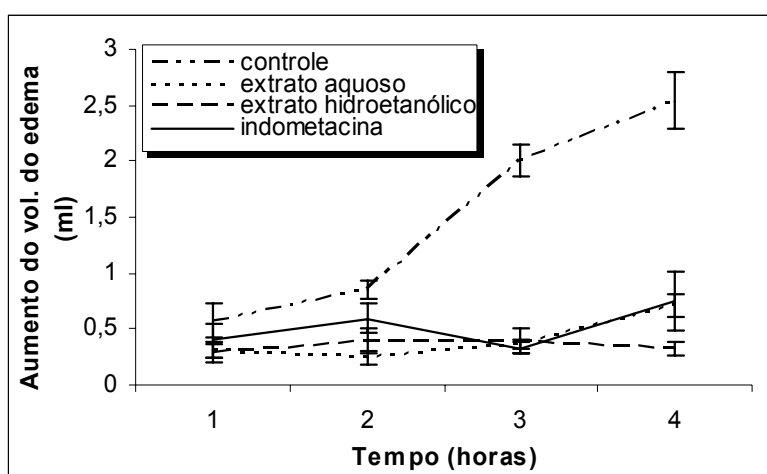


Figura 3.2 Efeito da administração v.o. do extrato de *Sambucus australis* Cham. & Schltidl. sobre o edema em pata de rato induzido por carragenina.

Para os extratos de *Sambucus australis* os resultados encontrados foram muito semelhantes aos obtidos para a outra espécie (Tabela 3.3 e Figura 3.2). Verificou-se significativa atividade antiedematogênica para o extrato aquoso ($p < 0,01$), a partir da segunda hora da administração do agente flogístico decaindo na

quarta hora de avaliação. Este extrato apresentou inibição máxima (81,70 %) na terceira hora de análise.

O extrato hidroetanólico também apresentou resultados significativos a partir da segunda hora, porém para $p < 0,05$, sendo que na terceira e quarta horas a diferença apresentada foi mais significativa ($p < 0,01$). O valor máximo de atividade inibitória atingida (86,14%) quando comparado com o controle coincidiu com o valor apresentado para a outra espécie (86,24%) e foram atingidos somente na quarta hora.

Realizando uma análise comparativa dos resultados encontrados para a atividade antiedematogênica para as duas espécies observou-se grande similaridade entre os valores encontrados nas terceira e quarta horas de avaliação e, para o extrato aquoso de ambas, também para as duas primeiras horas.

A atividade antiinflamatória revelada pelos extratos de ambas espécies está fortemente relacionada com seu conteúdo flavonoídico (principalmente rutina), como observado no Capítulo 2 deste trabalho. Segundo estudos de avaliação da atividade antiinflamatória de flavonóides utilizando o método de edema em pata de rato, realizados por SUYENAGA (2002), a rutina em doses de 10, 20 e 40 mg/ml v.o., apresentou inibição significativa do edema (73,33%), bem como a quercetina (77,62%) e o canferol (83,53%). Foi sugerido que a presença do grupo catecol observado na quercetina / rutina e da hidroxila no carbono 3 do canferol / quercetina contribuem para a inibição do edema e o açúcar presente na estrutura da rutina não potencializa sua atividade. Outros estudos relataram a inibição significativa de 42% para a quercetina em doses de 75 mg/kg (PELZER *et al.*, 1998) e de 53 e 59 % em pesquisa realizada por GUARDIA e colaboradores (2001) em animais tratados com rutina e quercetina, respectivamente, na dose de 80 mg/kg.

Pode ser ressaltado que os compostos químicos presentes nas espécies poderiam influenciar no fato de que os extratos aquosos demonstraramo máximo de inibição do edema de pata de rato na terceira hora, enquanto que os extratos hidroetanólicos somente na quarta hora. Este acontecimento pode ser explicado

devido ao extrato aquoso ter sido obtido através de infusão, cujo calor pode ter possibilitado a ocorrência de uma pequena hidrólise dos flavonóides glicosilados do extrato e estes, na forma de agliconas ou até uma maior extração destas, apresentam maior lipossolubilidade e atravessam a membrana celular dos tecidos mais rapidamente, permitindo sua distribuição e ação desde a segunda hora (SUYENAGA, 2002). Cabe salientar que outros compostos hidrossolúveis podem ter sido extraídos junto aos flavonóides, contribuindo sinergicamente para atividade.

3.5.2 Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método de extinção da coloração do agente colorimétrico DPPH, utilizando extratos aquoso e hidroetanólico de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*.

Utilizando espectrofotometria na luz UV, a descoloração do DPPH, que apresenta coloração violeta na sua forma radical livre e, ao passar para sua forma reduzida (recebendo um hidrogênio da substância antioxidante), desenvolve coloração amarela, podendo assim ser mensurado (Figura 3.3).

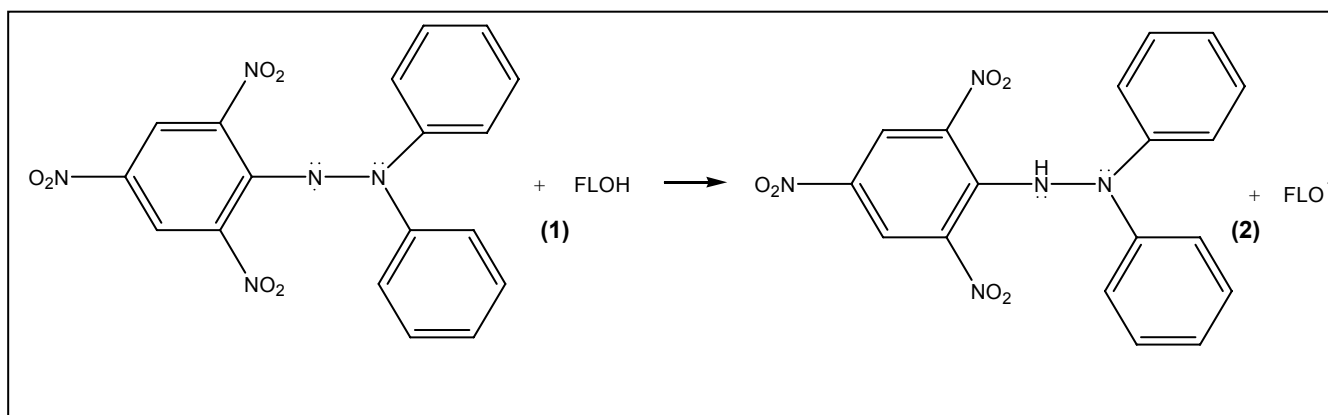


Figura 3.3 “Seqüestro” do hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH- radical livre) por um flavonóide (agente seqüestrante). (1) Flavonóide; (2) Flavonóide com radical peroxila (AMIC *et al.*, 2003).

Os flavonóides, por exemplo, são oxidados pelos radicais livres, resultando em um radical de menor reatividade, sendo capazes de estabilizar as espécies reativas do oxigênio. Pela alta reatividade do grupo hidroxila apresentada por essas substâncias, os radicais podem ser inativados (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos com este experimento estão apresentados na Tabela 3.4 e na Figura 3.4. Gráficos com valores de atividade antioxidante separadamente para cada espécie, também podem ser visualizados na Figura 3.5.

Tabela 3.4 Percentual de atividade antioxidante observado nos extratos aquosos e hidroetanólicos de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltl.

Concentração do extrato ($\mu\text{g/ml}$)	Atividade Antioxidante \pm DP (%)*			
	<i>Sambucus nigra</i>		<i>Sambucus australis</i>	
	Extrato hidroetanólico	Extrato aquoso	Extrato hidroetanólico	Extrato aquoso
5	7,64 \pm 0,197	4,07 \pm 0,050	16,32 \pm 0,448	9,03 \pm 1,457
10	14,82 \pm 0,972	9,23 \pm 0,000	31,36 \pm 0,486	17,54 \pm 0,013
25	37,39 \pm 0,63	24,15 \pm 0,36	76,69 \pm 0,86	47,95 \pm 0,34
50	71,45 \pm 0,34	39,38 \pm 1,24	88,45 \pm 0,01	86,21 \pm 0,38
125	91,45 \pm 0,04	84,56 \pm 0,13	89,75 \pm 0,01	89,35 \pm 0,13
250	92,09 \pm 0,08	88,02 \pm 0,03	88,77 \pm 0,06	87,67 \pm 0,09

• Média para três determinações.

•

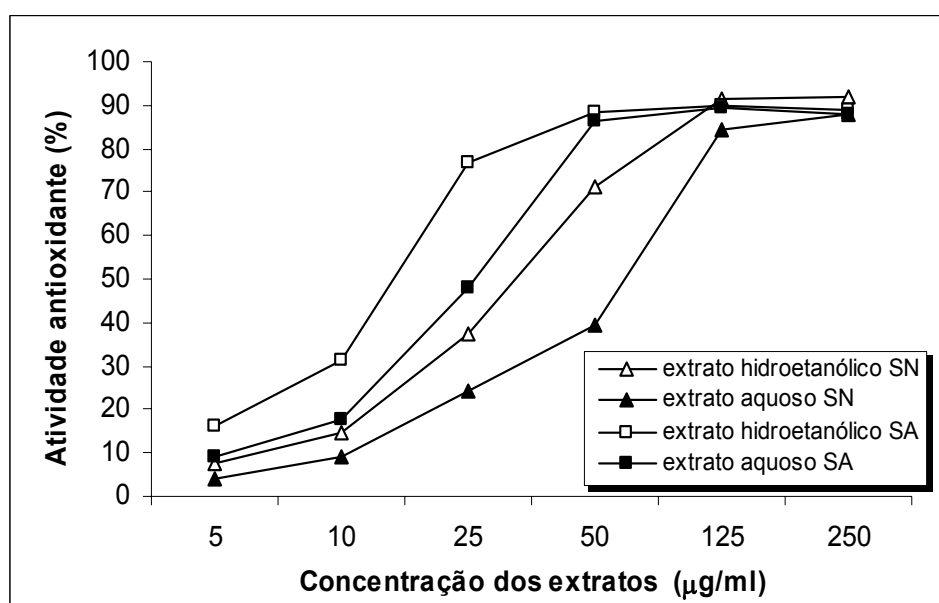


Figura 3.4 Representação gráfica comparativa de atividade antioxidante dos extratos aquoso e hidroetanólico de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltl.

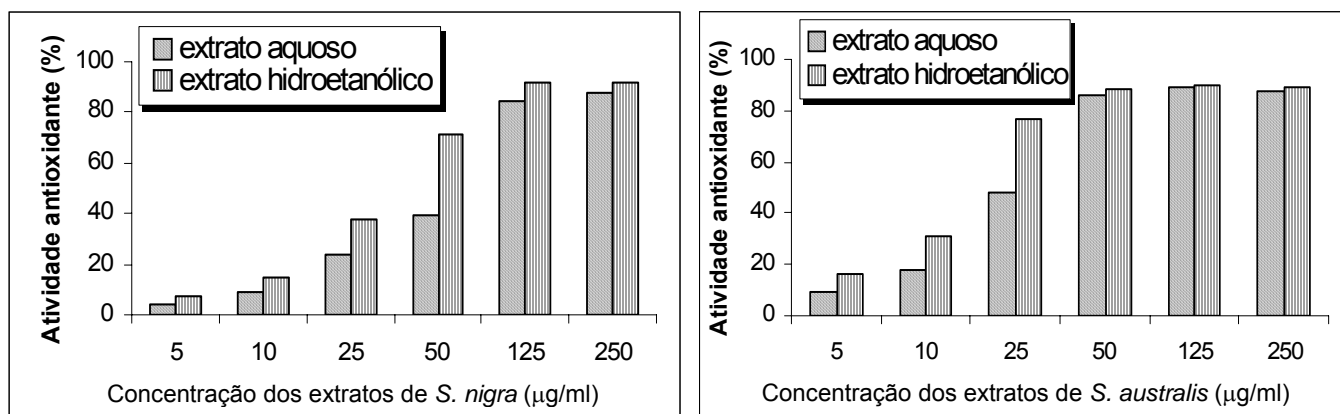


Figura 3.5 Demonstração de atividade antioxidante de extratos de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltl..

Além dos dados percentuais para atividade antioxidante, também foram calculados os CE_{50} , para os extratos aquoso e hidroetanólico de *Sambucus nigra* de 50,33 e 31,98 µg/ml, respectivamente; e 26,98 e 16,39 µg/ml para os extratos aquoso e hidroetanólico de *Sambucus australis*. Para a substância referência rutina e para o extrato padronizado de *Ginkgo biloba* os valores para CE_{50} encontrados foram de 14,16 e 40,72 µg/ml, respectivamente.

Assim, pela análise dos dados obtidos observou-se a maior atividade antioxidante para os extratos de *Sambucus australis* e dos extratos hidroetanólicos de ambas espécies, mais efetivos, inclusive, que o resultado de CE_{50} apresentado para o extrato padronizado de *Ginkgo biloba*. Esta atividade apresentada, do mesmo modo que para a atividade antiedematogênica, deveu-se provavelmente à presença de flavonóides em sua constituição química. Outra possibilidade estaria relacionada à sinergia dessas substâncias com outros metabólitos secundários que podem ter sido extraídos simultaneamente.

Segundo DAWIDOWICZ e colaboradores (2005), os flavonóides presentes nos extratos hidroetanólicos de *Sambucus nigra* neutralizam as atividades de radicais livres, corroborando com estudo realizado por SCHINELLA e colaboradores (2002).

Existem muitas discussões na literatura relacionadas aos mecanismos de ação antioxidante dos flavonóides, porém, estes não são muito bem compreendidos. Um destes seria referente a habilidade dos compostos polifenólicos em agir como antioxidantes pelo mecanismo de “seqüestro” de radicais livres com a formação de radicais fenoxila menos ativos. O alto potencial dos flavonóides para neutralizar radicais livres pode ser explicado pela sua habilidade de doar um átomo de hidrogênio do seu grupamento hidroxila neutralizando este radical (AMIC *et al.*, 2003). Quimicamente os flavonóides que apresentam a ligação heterosídica em C3 pode interferir na potência da atividade. O glicosídeo também pode determinar a atividade “seqüestrante” de radicais pela mudança da distribuição do elétron e participar na deslocalização do elétron no esqueleto estrutural ou pode existir outros mecanismos desconhecidos (YOKOSAWA *et al.*, 1997).

DISCUSSÃO GERAL

Devido ao seu crescente uso mundial, as plantas medicinais necessitam cada vez mais de um estabelecimento de normas que venham a contribuir para a garantia de sua qualidade, bem como em todas as etapas do desenvolvimento de fitoterápicos.

O trabalho com plantas medicinais inicia-se na identificação correta da espécie, coleta e armazenamento adequados, processamento e utilização terapêutica, produzindo assim resultados clínicos satisfatórios. O controle de qualidade nas etapas iniciais é fundamental para obter reprodutibilidade no material de partida a fim de minimizar a dificuldade de padronização do material estudado.

Assim, esta dissertação objetivou avaliar aspectos botânicos, químicos e biológicos comparativos entre duas espécies utilizadas na medicina popular e como matéria-prima na produção de fitomedicamentos, *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*.

No Capítulo 1 estão apresentadas descrições botânicas completas macro e microscópicas das espécies, e de seus pós, fundamentais na identificação correta destes vegetais, bem como para sua diferenciação e de relevante interesse para a padronização destas matérias-primas vegetais para a elaboração de monografias analíticas.

A dificuldade de distinção morfológica entre duas espécies do mesmo gênero, idênticas a olho nu, quando não é disponível material de referência para tal, muitas vezes necessita de um estudo profundo de todas as estruturas presentes no material a ser analisado. Outro aspecto que dificulta esta distinção é a presença de apenas material seco pelo fato de que este é mais frágil e frequentemente as características a serem observadas não se apresentam íntegras.

O estudo minucioso realizado neste trabalho demonstrou que as diferenças morfológicas existentes entre as flores de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis* são poucas e foram identificadas principalmente com as análises microscópicas. Entre elas encontram-se, por exemplo, idioplastos de areia cristalina, de oxalato de cálcio,

presentes somente nas flores de *Sambucus nigra* e a forma da parede das células fundamentais da epiderme das sépalas que é sinuosa nas sépalas de *Sambucus australis* e retilíneas na outra espécie. Macroscopicamente as diferenças mais evidentes foram quanto ao número de lóculos no ovário e o comprimento do filete nos estames. Somente a identificação destas observações citadas não é suficiente para distinguir uma espécie da outra, necessitando então a reunião do maior número de caracteres que o analista puder encontrar.

A análise dos contaminantes presentes nas amostras de flores adquiridas evidenciou a presença de pedicelos grosseiros, avaliados macro e microscopicamente e flores escurecidas. Também foi realizada a análise do material pulverizado, importante quando não é possível o contato com o material íntegro ou para a análise de cápsulas. Neste pó foi possível distinguir fragmentos de dentes marginais das sépalas de *Sambucus nigra*, bem como os idioblastos cristalíferos em pedaços de epiderme e uma grande quantidade de pólen. Todas estas características mencionadas na descrição do pó concordaram com as informações descritas por ESCHRICH (1988).

A segunda parte do trabalho contemplou o desenvolvimento de parâmetros para análises químicas quali e quantitativas para as flores das espécies em questão, visando também contribuir com o estabelecimento de alguns parâmetros farmacopéicos tais como determinação de perda por dessecação, materiais estranhos e cinzas totais.

As análises qualitativas iniciaram com a determinação do marcador químico, essencial para avaliar a qualidade e autenticidade das matérias-primas vegetais como, por exemplo, na identificação das plantas em preparações fitoterápicas ou chás compostos por mais de uma espécie vegetal, como é o caso dos produtos fitoterápicos combinando sene (*Sena Alexandrina* Miller), funcho (*Foeniculum vulgare* Miller) e erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), com os dois sabugueiros indistintamente. Entre as formas farmacêuticas encontradas para as flores de *Sambucus nigra* estão, principalmente, cápsulas, pó e elixir, mais freqüentes no mercado europeu, indicadas para auxiliar no aumento de imunidade em estados

gripais. No Brasil, flores das duas espécies são comercializadas na forma não rasurada, isoladas ou em misturas para chás.

Para caracterização do marcador, diversas técnicas cromatográficas são aplicadas para possibilitar e / ou auxiliar na sua identificação ou reconhecimento. Atualmente, entre os procedimentos mais empregados estão a CCD, para análises rápidas e auxiliares também na identificação de impurezas; e CLAE. Em geral, este último método analítico está se tornando um método de escolha na análise de plantas medicinais pela acessibilidade e uso que não é limitado pela estabilidade ou volatilidade de compostos químicos e pela possibilidade de acoplar outros métodos de análise que permitem pronta identificação do constituinte desejado (LIANG *et al.*, 2004).

Auxiliando esta investigação encontram-se os relatos científicos que são decisivos na identificação desta substância. Para a espécie *Sambucus nigra*, diversos autores citam, em análises cromatográficas, o flavonóide rutina como sendo majoritário, presente também em *Sambucus australis* e outros glicosídeos de flavonóides e suas agliconas como principais constituintes para ambas.

A partir dessa informação o próximo passo para um efetivo controle de qualidade das matérias-primas vegetais foi eleger o método mais adequado para análise quantitativa. Técnicas de CLAE e, quando este equipamento não está ao alcance dos laboratórios de análise, técnicas espectrofotométricas, determinando o teor de um conjunto de substâncias são as mais freqüentemente preconizadas. Optou-se então, pela quantificação por ambos métodos para possibilitar alternativas de análises para estas espécies.

Na busca de métodos de CLAE que promovam separações adequadas dos constituintes de interesse, alguns parâmetros podem ser variados para obter-se sucesso na análise cromatográfica como diversos tipos de colunas, detectores e solventes. Neste trabalho foi utilizada coluna cromatográfica em fase reversa com partículas simétricas e de menor tamanho do que as mais utilizadas pelo motivo de que, em análises preliminares, observou-se grande presença de glicosídeos de

flavonóides com comprimentos de onda máximos muito semelhantes quando observados com o CLAE/DAD, podendo estes ficar sobrepostos, mascarando o resultado. O uso desta coluna de melhor performance possibilitou uma melhor separação dos constituintes que, em sua maioria modificava somente o tipo de açúcar ligado ao C3 da estrutura principal. Acetonitrila, água ultrapura e TFA foram selecionados para compor a fase móvel, em sistema gradiente linear para facilitar também a separação dos constituintes durante a eluição.

Após a seleção dos parâmetros mais adequados, o método foi validado conforme estabelecido por órgãos internacionais como o ICH (1996) e a Farmacopéia Americana (USP, 2005) responsáveis pela normatização dos parâmetros analíticos, necessários para registro de medicamentos, produtos de origem vegetal e biológica. No Brasil a resolução RDC n. 899 (BRASIL, 2003) regulamenta este procedimento. Cabe salientar que não são definidos legalmente parâmetros para a validação de fitoterápicos ou matérias-primas vegetais. Então, muitas vezes são levados em conta os limites estabelecidos para a validação de amostras de origem biológica, que possuem faixas amplas para variação dos resultados, já que os vegetais possuem matriz complexa.

Neste trabalho, para a análise cromatográfica dos constituintes químicos presentes nas flores das duas plantas foi selecionado o mesmo método por elas apresentarem perfís similares. Porém apesar de ser o mesmo, este foi duplamente validado para garantir a confiabilidade nas análises quantitativas realizadas para o marcador químico de cada espécie, identificado como o flavonóide glicosilado rutina.

O outro ensaio analítico proposto de utilidade para laboratórios ou pequenas indústrias que realizam controle de qualidade destas matérias-primas vegetais, foi o método de quantificação de flavonóides totais, expressando os resultados em teor percentual de quercetina. Devido aos extratos serem constituídos por flavonóides, em sua maioria O-glicosilados, nesta técnica utilizou-se hidrólise ácida para promover o rompimento da ligação glicosídica, facilitando a identificação espectrofotométrica da aglicona formada, a quercetina.

Nas análises em CLAE, os resultados obtidos para as amostras analisadas não demonstraram diferenças estatisticamente significativas, o que não ocorreu quando utilizado o método espectrofotométrico. Este fato deveu-se provavelmente à pouca especificidade e sensibilidade da técnica empregada, além de introduzir erros de manipulação devido às várias etapas necessárias para a obtenção do resultado final, não esquecendo também a variação intra e interespecífica de cada planta. Também puderam ser observadas, com estas análises, a dificuldade no estabelecimento de valores para a diferenciação destas espécies quanto ao seu conteúdo flavonoídico por ambos os métodos empregados. Os valores mínimos obtidos para as soluções extrativas elaboradas com flores da espécie nativa cruzam-se com a faixa de valores obtidos para aquelas preparadas com flores da espécie europeia. Este fato pode estar relacionado com a origem das amostras, onde as variações edafoclimáticas podem interferir nos resultados mesmo tratando-se de um mesmo indivíduo.

Estas variações foram avaliadas para as flores de *Sambucus australis*, para as quais foram possíveis realizar comparações do teor do marcador químico, através de análises cromatográficas, entre coletas de diferentes regiões, dentro de uma mesma região e ainda, amostras com características botânicas diferenciadas. Em quase todos os casos foram observadas apenas diferenças quantitativas entre os constituintes químicos presentes. Em uma das plantas, coletada na região de Porto Alegre, foi constatada a presença de um composto em maior quantidade que o marcador rotina.

Aliado à identificação do marcador químico para análises quantitativas ou apenas para diferenciação de espécies, está o estudo da sua estabilidade ou do conjunto dos constituintes presentes nas plantas. A identificação dos produtos de degradação surgidos são importantes pela possibilidade destes artefatos serem tóxicos à saúde humana.

O estudo da estabilidade acelerada é utilizado por indústrias para o estabelecimento do prazo de validade provisório para a aquisição do registro dos

seus produtos destinados a comercialização. Concomitantemente, devem ser realizados estudos da estabilidade a longo prazo.

No ano de 2004 foi publicada pela ANVISA a resolução n. 398 (BRASIL, 2004b) referente realização de estudos de estabilidade, que revogou a resolução n. 560 de 2002 (BRASIL, 2002). As condições para a realização de estudos da estabilidade acelerada nesta resolução revogada incluía como opção de ensaio a realização dos testes a 50 ± 2 °C / $90 \pm 5\%$ de umidade relativa no período de 3 meses. A nova resolução instituiu a necessidade da apresentação de resultados referentes a 12 meses de estudo da estabilidade a longo prazo juntamente com os da estabilidade acelerada e ainda definiu as condições citadas na resolução n. 560 como sendo técnica de estudo alternativa.

A condição utilizada no presente trabalho foi a indicada na resolução revogada pelo fato dos testes já estarem ocorrendo no momento da publicação da nova resolução. Os resultados demonstraram que houve a degradação de diversos picos presentes nos cromatogramas para as duas espécies, sem surgimento de algum componente na mesma proporção de redução de massa observada para a rotina ou qualquer outro componente. O mesmo fato foi relatado por HEIGL & FRANZ (2003) em trabalho utilizando amostras de diversas espécies, incluindo *Sambucus nigra*. Em se tratando de matrizes complexas, como extratos vegetais, a interação entre componentes pode ser um fator importante nos resultados obtidos com este tipo de ensaio.

Também foi observado no ensaio da estabilidade acelerada, que a velocidade de degradação para as duas plantas foi diferenciada num primeiro momento, sendo mais suave para *Sambucus nigra*. Esta ocorrência pôde ter sido devido ao método de secagem do material utilizado, que não é conhecido, bem como a data exata de sua coleta e ainda a diversidade de constituintes que podem interagir no momento da exposição do material às condições estabelecidas de temperatura e umidade. Sendo assim, é correto afirmar que os estudos realizados para a espécie nativa, onde todo o processo de manipulação da planta até o momento de disposição das amostras na câmara climática foi controlado, é o de maior veracidade.

Neste estudo de estabilidade, após os 3 meses de exposição das amostras às condições de temperatura e umidade explicitadas, os valores percentuais médios de rutina encontrados no ponto 3 (60 dias) foram de 0,87% para *Sambucus nigra* e 0,57% para a outra espécie. Estes resultados encontrados foram similares ao teor de rutina determinados em algumas das amostras adquiridas ou coletadas. Este dado, juntamente com a análise dos resultados apresentados pelas amostras fornecidas pelo laboratório que datavam de 2001, armazenadas em condições não controladas de temperatura e umidade, analisadas em 2003, podem indicar estabilidade da rutina nas flores desta espécie.

Partindo-se destes resultados do estudo da estabilidade realizou-se a determinação da cinética de reação de degradação do marcador químico na tentativa de estabelecer o prazo de validade do material vegetal. Num primeiro momento, na avaliação dos valores obtidos com a análise de *Sambucus nigra*, obteve-se reação de primeira ordem e, para *Sambucus australis*, segunda ordem. De acordo com NUDELMAN (1976), devem ser considerados nestes estudos, valores superiores a 20% de degradação do marcador, para a determinação da ordem da reação ser mais fidedigna. Assim, como os valores encontrados para os primeiro 30 dias de exposição às condições 50°C e 90% U.R. das amostras de *Sambucus nigra* foram inferiores, descartou-se este valor. Com isto, obteve-se uma reação de degradação de segunda ordem.

Porém, mesmo com a determinação da constante de velocidade de reação e o valor de $t_{90\%}$ (valor em que a concentração da substância avaliada é 90% da concentração inicial), para maior confiabilidade nos resultados visando a determinação de um correto prazo de validade para uso destas matérias-primas, maior número de amostras devem ser avaliadas. Igualmente é necessária a realização de estudos em diferentes condições de temperatura e umidade juntamente com estudos a longo prazo em condições controladas.

Estudos das atividades antiinflamatória *in vivo* e antioxidante *in vitro* das flores das espécies também puderam ser realizados.

A escolha entre testes farmacológicos *in vitro* ou *in vivo* depende de inúmeros fatores, sendo o principal critério o domínio do modelo experimental pelo investigador e, naturalmente, do alvo a ser atingido. No entanto, os efeitos observados nos testes realizados *in vitro* com certa freqüência não são observados nos estudos realizados *in vivo*, devido a problemas de farmacocinética. Os testes *in vivo* podem confirmar o uso popular das plantas quando o modelo experimental é confiável e ainda podem fornecer informações preliminares a respeito dos efeitos tóxicos das plantas (CALIXTO, 2001b).

Estudos etnofarmacológicos e referentes à constituição química das plantas são de grande utilidade na seleção dos ensaios a serem realizados. Para os sabugueiros, devido a constituição majoritária em compostos flavonoídicos, as atividades antiinflamatória e antioxidante, extensivamente estudadas para estes compostos, foram escolhidas.

A atividade antiinflamatória observada com o ensaio de inibição do edema em pata de ratos induzida por carragenina, para extratos aquosos e hidroetanólicos das flores de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis* apresentou potência equivalente ao padrão indometacina. Este resultado não foi observado pelos autores MASCOLO e colaboradores (1987), onde a atividade do extrato hidroetanólico das flores de *S. nigra*, utilizando o mesmo método de avaliação, foi aproximadamente metade do valor obtido para o controle positivo. No entanto, para este relato não foi citada claramente a forma de preparação do extrato utilizado. A dose selecionada para avaliação desta atividade utilizando extratos aquosos e hidroetanólicos dos sabugueiros foi baseada em suposições levantadas após análise minuciosa do experimento realizado por MASCOLO e colaboradores (1987).

De acordo com a constituição química para as espécies, na sua maioria, glicosídeos de flavonóides, a atividade antiinflamatória torna-se quase que evidente, pois estes já foram estudados em outras plantas (HARBORNE & WILLIAMS, 2000) ou isoladamente (SUYENAGA, 2002) apresentando efeito significativo.

Para o ensaio de atividade antioxidante realizado, os resultados encontrados para as amostras de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis* foram bem distintos. Os extratos hidroetanólicos apresentaram atividade mais pronunciada do que os extratos aquosos, preparados em temperatura ambiente. Avaliação do teor de rutina demonstrou maior percentual no extrato hidroetanólico, sendo, portanto, possível de verificar que esta atividade pode estar diretamente relacionada com a presença de flavonóides conforme já descrito para *S. nigra* (DAWIDOWICZ *et al.*, 2005).

A atividade antioxidante mais pronunciada para a espécie *Sambucus australis* pode ser atribuída ao fato desta possuir maior quantidade de flavonóides glicosilados do que a outra espécie. Também pode ser salientada a presença de glicosídeos de canferol nestes extratos onde, segundo AMIC e colaboradores (2005) sua aglicona demonstrou ser mais efetiva como seqüestrante de radicais livres, que os derivados quercetínicos estudados.

Assim, este trabalho contribuiu para a confirmação do uso popular das flores das espécies como antiinflamatórias e antioxidantes. Sua validade também pode ser verificada comparando com relatos apresentados para a atividade antiinflamatória por MASCOLO e colaboradores (1987) e mais recentemente, para a ação antioxidante por DAWIDOWICZ e colaboradores (2005), para *Sambucus nigra*.

O conjunto de resultados botânicos e químicos forneceu o aporte necessário para o estabelecimento de parâmetros farmacopéicos para a garantia da qualidade de flores de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*, bem como permitiu realizar avaliação preliminar para a determinação do prazo de validade através do estudo da estabilidade acelerada.

Estes resultados representam uma contribuição para o conhecimento de matérias-primas para produção de fitomedicamentos com qualidade, os quais são escassos na literatura em especial, no que se refere a estudos de estabilidade. Pelo estudo comparativo foi possível verificar a similitude entre as espécies o que poderia indicar o uso comercial do vegetal nacional, implicando na redução de custos de importação.

CONCLUSÕES

✓ Descrição e análise botânica:

- As principais diferenças macroscópicas encontradas nas 18 amostras frescas de *Sambucus australis* coletadas nas cidades de Caxias do Sul, Porto Alegre, Santa Maria, Veranópolis e Praia da Guarda do Embaú / Palhoça / SC e Viamão, e 13 amostras de *Sambucus nigra* adquiridas no comércio e/ou fornecidas pelo laboratório de Farmacognosia desta Faculdade, foram o número de lóculos no ovário, três para as flores de *Sambucus nigra* e cinco para *Sambucus australis*; e o tamanho do filete dos estames, diferenciado em amostras de flores de *Sambucus australis*;
- As principais diferenças microscópicas encontradas foram: presença de idioblastos cristalíferos em brácteas, sépalas e pétalas, endoderme do pedicelo, dentes marginais e paredes das células fundamentais retilíneas na epiderme das sépalas nas flores de *Sambucus nigra*;
- Pedicelos grosseiros e flores acastanhadas foram identificados como contaminantes em ambas espécies.

✓ Quanto à avaliação química quali e quantitativa:

- O teor de perda por dessecação utilizando termobalança com infravermelho foi de 11,68% e 10,90% para *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*, respectivamente;
- O conteúdo de materiais estranhos encontrado respeitou os limites indicados pela Farmacopéia Européia, bem como o teor de cinzas totais;
- O flavonóide rutina foi identificado como marcador químico para as duas espécies de *Sambucus* estudadas;

- O método desenvolvido utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência foi validado, demonstrando ser linear, sensível, específico, preciso, exato e robusto para análise quantitativa de rutina em soluções extrativas hidroetanólicas de flores de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*;
 - A avaliação do teor de rutina verificada por CLAE apresentou médias de 1,04% e 1,20 % para *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*, respectivamente, e o teor de flavonóides totais, pelo método de espectrofotometria, com hidrólise ácida, apresentou valores médios de quercetina de 1,66% e 2,31% para *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*;
 - O estudo preliminar de estabilidade acelerada demonstrou uma degradação no teor de rutina de 27% e 57% para as flores de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*, respectivamente, após o período de três meses;
 - Sugere-se a segunda ordem para a cinética da reação de degradação dos teores de rutina para as duas espécies.
- ✓ Quanto à avaliação biológica:
- Os extratos aquosos e hidroetanólicos de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis* apresentaram significativa atividade antiinflamatória *in vivo*;
 - Os extratos aquosos e hidroetanólicos de *Sambucus australis* apresentaram atividade mais pronunciada que os mesmos extratos de *Sambucus nigra*.
- ✓ Sugere-se a elaboração de uma monografia para cada espécie para a inclusão na Farmacopéia Brasileira

REFERÊNCIAS

ABOY, A. L. *Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas de Mikania glomerata Sprengel (guaco) (Asteraceae)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 1999, Dissertação (Mestrado). 120 p.

AHMADIANI, A.; FEREDONI, M.; SEMNANIAN, S.; KAMALINEJAD, M.; SAREMI, S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Sambucus ebulus* rhizome extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 61, p. 229-235, 1998.

ALICE, C. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; HALBIG, J. C.; MENTZ, L. A.; SILVA, G. A. A. B.; GOETTEMS, E. I. Diagnose comparativa de compostos polifenólicos de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. Et Schlecht. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 71, n. 4, p. 88-90, 1990.

ALICE, C. B.; VARGAS, V. M. F.; SILVA, G. A. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; SCHAPOVAL, E. E. S.; GLEYDE, J.; HENRIQUES, J. A. P.; HENRIQUES, A. T. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, n. 35, p. 165-171, 1991.

ALICE, C. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; MENTZ, L. A.; SILVA, G. A. A. B. *Plantas Medicinais de Uso Popular: Atlas Farmacognóstico*. Canoas: Editora da Ulbra, 1995. 205 p.

ALONSO, J. R. *Tratado de Fitomedicina – Bases Clínicas y Farmacológicas*. Buenos Aires: ISIS, 1998. 1039 p.

AMIĆ, D.; DAVIDOVIĆ-AMIĆ, D.; BEŠLO, D.; TRINAJSTIĆ, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta CCACAA*. v. 76, n. 1, p. 55-61, 2003.

APG II – The Angiosperm Phylogeny Group. An Update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, n. 441, p. 399-436, 2003.

ARGÜESO, A. A. *Manual de Técnicas en Histología Vegetal*. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1986. 83 p.

BACIGALUPO, N. M. Caprifoliaceae. In: BURKART, A. *Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina)*. Buenos Aires: INTA, 1974. v. 6, pt. 6.

BALLERO, M.; POLI, F.; SACCHETTI, M.; LOI, M. C. Ethnobotanical research in the territory of Fluminimaggiore (south-western Sardinia). *Fitoterapia*, v. 72, p. 788-801, 2001.

BARROSO, G. M. *Sistemática das Angiospermas*. Viçosa: Imprensa Universitária UFV, 1986. v. 3. 328 p.

BEDOYA, L. M.; SANCHEZ-PALOMINO, S.; ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; ALCAMI, J. Anti-HIV activity of medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, p. 113-116, 2001.

BERGHE, D. A. V.; VLIETINCK, A. J.; van HOOFF, L. Plant products as potential antiviral agents. *Bulletin Institute Pasteur*, v. 84, p. 101-147, 1986.

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

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

BONET, M. A.; PARADA, M.; SELGA, A.; VALLÈS, J. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the regions of L'Alt Empordà and Les Guilleries (Catalonia, Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 68, p. 145-168, 1999.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 560, de 02 de abril de 2002. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. 03 abr. 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. 02 jun. 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 48, de 16 de março de 2004. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. 18 mar. 2004a.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 398, de 12 de novembro de 2004. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. 16 nov. 2004b.

BRITISH Herbal Compendium. A Handbook of scientific information on widely used plant drugs. Grã-bretanha: BHMA, 1992. v. 1, 239 p.

BRITISH Herbal Pharmacopoeia. 4 ed. Londres: BHMA, 1996. 212 p.

BRUNETON, J. *Farmacognosia: Fitoquímica – Plantas Medicinales*. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 2001. 1099 p.

CABRERA, A. L. Caprifoliaceae. In: CABRERA, A. L. *Flora de la Provincia de Buenos Aires*. Buenos Aires: INTA, 1965. v.4. pt.5.

CACERES, A.; CANO, O.; SAMAYOA, B.; AGUILAR, L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 30, p. 55-73, 1990.

CACERES, A.; LOPEZ, B. R.; GIRON, M. A.; LOGEMANN, H. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 31, p. 263-276, 1991.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. *Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos, 2001a. 500 p.

CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. *Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos, 2001b. 500 p.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A., PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of Herbal Medicines. *Fitoterapia*, n. 71, p. 58-65, 2000.

CHARAUX, M. C. Sur la présence de la rutine dans certains végétaux. Préparation et identification de ce et de ses produits de dédoublement. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, v. 6, p. 641-647, 1924.

CHRIST, M.; MULLER, J. *Archiv der Pharmazie*, v. 293, n. 65, p. 1033-1042, 1960.

COIMBRA, R. *Notas de Fitoterapia: Catálogo dos Dados Principais sobre Plantas utilizadas em Medicina e Farmácia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Arte Moderna, 1958. 429 p.

CORREA, P. M. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Rio de Janeiro: IBDF, 1984. v. 6, 777 p.

CRUZ, G.L. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1979. 599 p.

CZYGAN, F-C; FROHNE, F.; HÖLTZEL, C.; NOGELL, A.; PFÄNDER, H-J; WILLTHUN, G.; BUFF, W. Sambuci Flos. In: BISSET, N. G.; WICHTL, M. (Ed) *Herbal drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis*. 2 ed. Stuttgart: Scientific Publishers CRC, 2001. 566 p.

DAB 10 Kommentar: wissenschaftliche Erläuterungen zum deutschen Arzneibuch. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1994.

D'AMÉLIO, F. S. *Botanicals: A phytocosmetic desk reference*. Boca Raton: CRC Press, 1999. 361 p.

DAVÍDEK, J. Isolation of chromatographically pure rutin from flowers of Elder. *Nature*, v. 189, n. 4763, p. 487-488, 1961.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; BARANIAK, B. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *LWT – Food Science and Technology*, In Press, 19 março 2005.

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

DIMITRI, M. J. *Enciclopedia Argentina de agricultura y jardinería*. 3 ed. Buenos Aires: ACME, 1980. v. 2.

DONDI, F.; KAHIE, Y. D.; LODI, G.; BLO, G.; PIETROGRANDE, C.; RESCHIGLIAN, P. Solvent selectivity effects in reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoid compounds. *Journal of Chromatography*, v. 461, p. 281-292, 1989.

EMEA. The European agency for the evaluation of medicinal products. Working part on herbal medicinal products (HMPWP), Stability testing of HD, HDP and HMP, guidelines. n. 25, 1999. Disponível na Internet no endereço <http://www.emea.eu.int/>. Acesso em 15/07/2004.

ESCHRICH, W. *Pulver Atlas der Drogen des deutschen Arzneibuches*. Stuttgart: Fischer, 1988. 335 p.

ESPAÑA, S. M.; MARSICOVETERE, P. V.; CACERES, A. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorder's. 5. Vibroicidal activity of five American plants used to treat diarrhea. *Fitoterapia*, v. 65, n. 3, p. 273-274, 1994.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 4 ed. Strasbourg: Council of Europe, 2002. 2416 p.

EVANS, W. C. *Trease and Evans: Pharmacognosy*. 15 ed. Londres: W B Saunders, 2002. 585 p.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.) *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*. 4 ed. Porto Alegre / Florianópolis : Ed. Da UFRGS / Ed. Da UFSC, 2002. 833 p.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.) *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*. 4 ed. Porto Alegre / Florianópolis : Ed. da UFRGS / Ed. da UFSC, 2002. 833 p.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ed. 1988. São Paulo: Atheneu.

FARMACOPEIA Portuguesa. 7 ed. Lisboa : Ministério da Saúde, 2002.(cd-rom)

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

FOSTER, A. S. *Practical plant anatomy*. Princeton: van Nostrand. 1949. 228 p.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; Di MAMBRO, V. M.; AZZOLINI, A. E. C. S.; FONSECAL, M. J. V. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS Pharmarmaceutical Science*, v. 5, n. 2, p. 1-5, 2003.

GERLACH, D. *Botanische Microtechnik*. Stuttgart: Georg Thieme. 1984. 311 p.

GIAMPIERI, L.; FRATERNALE, D.; RICCI, D. Composition and antioxidant activity of essential oil and ethanolic extract obtained from fresh flowers of *Sambucus nigra*. *Rivista Italiana Eppos*, n. 35, p. 33-40, 2003.

GILG, E.; BRANDT, W.; SCHÜRHOFT, P. N. *Farmacognosia: matéria farmacêutica vegetal y animal*. 2 ed. Barcelona: Labor, 1942. 656 p.

GOLDIM, J. R. *Pesquisa em saúde e direito dos animais*. Porto Alegre: HCPA, 1995. 28 p.

GÖREN, A. C.; BILSEL, G.; BILSEL, M. YENISOY-KARAKAS, S.; KARAKAS, D. Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of atropine and obidoxime in a parenteral injection device. *Journal of Chromatography A*, v. 1057, n. 1-2, p. 237-239, 2004.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O.; PELZER, L. E. Anti-inflammatory properties of plants flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco*, v. 56, p. 683-687, 2001.

GUARRERA, P. M. Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, e Latium). *Fitoterapia*, v. 76, p. 1-25, 2005.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.

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

HERBAL Medicine: Expanded Commission E Monographs. Mark Blumenthal, Alicia Goldberg, Josef Brinckmann (ed). Newton: IMC, 2000. 519p.

HERNÁNDEZ, N. E.; TERESCHUK, M. L.; ABDALA, L. R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Vale (Tucumán, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, p. 317-322, 2000.

HEYWOOD, V. H. (Ed). *Flowering Plants of the World*. Nova Iorque: Oxford University Press, 1993. 335p.

HOLLMAN, P. C. H.; HERTOOG, M. G. L.; KATAN, M. B. K. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, v. 57, n. 1, p. 43-46, 1996.

HONG, D. D.; SHAH, M. Development and validation of HPLC stability-indicating assays. In: CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. (Ed). *Drug Stability. Principles and Practices*. 3 ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2000. v. 107, 773 p.

ICH. International Conference on Harmonization. Validation of analytical procedures: Methodology. Q2B. 1996. 8 p. Disponível na Internet no endereço <http://www.ich.org/>. Acesso em 15/03/2003.

ICH. International Conference on Harmonization. Stability testing of new drug substances and products. Q1A (R2). 2003. 15 p. Disponível na Internet no endereço <http://www.ich.org/>. Acesso em 15/03/2003.

JORGE, L. I. F.; GRACIANO, R. A. S.; PRADO, S. P. T.; PEREIRA, U. Identificação histológica de *Sambucus australis* Cham. & Schlecht. (SABUGUEIRO). *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v. 20, n. 1, p. 117-123, 1999.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F. *Plant Systematics: a Phylogenetic Approach*. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999. 464 p.

KOKOLETSI, M. X.; KAFKALA, S.; TSIAGANIS, M. A novel gradient HPLC method for simultaneous determination of ranitidine, methylparaben and propylparaben in oral liquid pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 38, n. 4, p. 763-767, 2005.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica*. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.

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

LAMAISON, J. L.; PETITJEAN-FREYTET, C.; CARNAT, A. Présence de 3-glucoside et de 3-rutinoside d'isorhamnétine dans les fleurs de *Sambucus nigra* L. *Annales Pharmaceutiques Française*, v. 49, n. 5, p. 258-262, 1991.

LAWRIE, W.; MCLEAN, J.; PATON, A. C. Triterpenoids in the bark of Elder (*Sambucus nigra*). *Phytochemistry*, v. 3, n. 5, p. 258-262, 1964.

LEE, K. W.; KIM, Y. J.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 7292-7295, 2003.

LEPORATTI, M. L.; CORRADI, L. Ethnopharmacobotanical remarks on the Province on Chieti town (Abruzzo, Central Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 74, p. 17-40, 2001.

LIANG, Y-Z; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B*, v. 812, p. 53-70, 2004.

LIN, C-N.; TOME, W-P. Antihepatotoxic principles of *Sambucus formosana*. *Planta Medica*, v. 33, n. 13, p. 223-224, 1988.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. *Phytopharmaceutical Technology*. Boca Ratón: CRC, 1989. 974 p.

LÓPEZ, M.; MARTÍNEZ, F.; DEL VALLE, C.; ORTE, C.; MIRÓ, M. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 922, p. 359-363, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 512 p.

MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B. *The sistematic identifcation of flavonoids*. Berlin: Springer, 1970.

MACIEL, R. L.; BRANDÃO, M. G. L. Definição de parâmetros farmacognósticos para as flores e a tintura-mãe do *Sambucus australis* Cham. Et Schltld. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 15, 1998, Águas de Lindóia. *Programas e resumos...* São Paulo, 1998. p. 194.

MALEŠ, Ž; MEDIĆ-ŠARIĆ, M. Investigation of the flavonoids and phenolic acids of Sambuci flos by thin-layer chromatography. *Journal of Planar Chromatography*, v. 12, september/october, 1999.

MARTINS, J. E. C. *Plantas Medicinais do uso da amazônia*. 2 ed. Belém: CEJUP, 1989. 107 p.

MASCOLO, N.; AUTORE, G.; CAPASSO, F.; MENGHINI, A.; FASULO, M. P. Biological screening of Italian medicinal plants for anti-inflammatory activity. *Phytoterapy Research*, v. 1, p. 28-31, 1987.

MECKES-LOZOYA, M.; CAMPOS, V. M. Pharmacological screening of Mexican plants, popularly used for the treatment of cough. *Fitoterapia*, v. 57, n. 5, p. 365-370, 1985.

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

MERCOSUL. Regulamento técnico do Mercosul, estabilidade de produtos farmacêuticos. Grupo Mercado Común. Resolución n. 53/96, 1996. Disponível na Internet no endereço <http://www.sice.oas.org>. Acesso em 23/11/2003.

MINISTÉRIO DE SALUD DE COSTA RICA. Guía para realización de estudios de estabilidad de medicamentos. Disponível na Internet no endereço: <http://www.netsalud.sa.cr>. Acesso em 15/08/2003.

MINISTÉRIO DE SALUD PUBLICA DE CUBA. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos. Regulación 23, 2000. Disponível na Internet no endereço: <http://www.cecmecmed.slod.cu>. Acesso em 20/01/2004.

MIRALDI, E.; FERRI, S.; MOSTAGHIMI, V. Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 75, p. 77-87, 2001.

MOERMAN, D. E. *Native American Ethnobotany*. Portland: Timber Press, 1998. 927 p.

MUELLER, C. A. Caprifoliaceae, Valerianaceae, Calyceraceae. In: MARTIUS, C.F.P. *Flora Brasiliensis*, 1885. v. 6. pt. 4.

NETO, C. C.; OSWENS, C. W.; LANGFIELD, R. D.; COMEAU, A. B.; ONGE, J. St.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huyalas. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, p. 133-138, 2002.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. *Plantas Mediciniais – Guia para o profissional de Saúde*. Londres: Pharmaceutical Press, 2002.

NIJVELDT, R. J.; van NOOD, D.; van HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; van NORREN, K.; van LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

NISHITANI, E.; SAGESAKA, Y. M. Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 17, n. 5, p. 675-685, 2004.

NG, T. B.; LIU, F.; WANG, Z. T. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Science*, v. 66, n. 8, p. 709-723, 2000.

NUDELMAN, N. S. *Estabilidad de Medicamentos*. Buenos Aires: El Ateneo, 1976. 187 p.

PALMESE, M. T.; MANGANELLI, R. E. U.; TOMEI, P. E. An ethnopharmacobotanical survey in the Sarrabus district (south-east Sardinia). *Fitoterapia*, v. 72, p. 619-643, 2001.

PARIS, R. R.; MOYSE, H. *Précis de Matière Médicale*. Paris: Masson et C^{ie}, 1971. v. 3, 509 p.

PDR for Herbal Medicines. 2 ed. Montvale: Medical Economics, 2000. 858 p.

PEIRCE, A. *The American pharmaceutical association: practical guides to natural medicines*. Nova Iorque: William Morrow and Company, 1999. 729p.

PELZER, L. E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A. O.; GUERREIRO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plants flavonoids. *Il Fármaco*, v. 53, n. 6, p. 421-424, 1998.

PERROT, E. N. *Matières premières usuelles du règne vegetal: thérapeutique, hygiène, industrie*. Paris: Masson et C^{ie}., 1944. v. 2.

PETRY, R. D. *Desenvolvimento e validação de métodos de doseamento de flavonóides de Passiflora edulis Sims. (maracujá)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 1999, Dissertação (Mestrado). 213 p.

PIERONI, A. Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 70, p. 235-273, 2000.

PIERONI, A.; QUAVE, C.; NEBEL, S.; HEINRICH, M. Ethnopharmacy of the ethnic Albanians (Arbëreshë) of northern Basilicata, Italy. *Fitoterapia*, v. 73, p. 217-241, 2002.

PIETROGRANDE, M. C.; BIGHI, C.; BLO, G.; KAHIE, Y. D.; RESCHIGLIAN, R.; DONDI, F. Retention behaviour of selected flavonoid compounds in NP-HPLC. *Chromatographia*, v. 27, n. 11/12, p. 625-627, 1989.

PIETTA, P.; BRUNO, A.; MAURI, P.; RAVA, A. Separation of flavonol-2-O-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 593, p. 165-170, 1992.

PLANCHON, L.; BRETIN, P.; MANEAU, P. *Précis de Matière Médicale*. 50 ed. Paris: Librairie Maloine, 1946. v. 2.

QUER, F. *Plantas medicinales: el Dioscórides renovado*. Barcelona: Labor, 1993. v. 3.

REBUelta, M.; VIVAS, J. M.; SAN ROMAN, L.; FERNANDEZ, M. G. S. Étude de l'effet diurétique de différents préparations des fleurs du *Sambucus nigra*. *Plantes Médiques et Phytothérapie*, v. 17, p. 173-181, 1983.

REITZ, R. Caprifoliáceas. In: *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí: R. Reitz ed., 1985. 1 pt., 16p.

REVIEW of Natural Products: the most complet source of natural products information. 2 ed. St. Louis: Fact and Comparisons, 2002. 794 p.

REHWALD, A.; MEIER, B.; STICHER, O. Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Crataegus* leaves and flowers. *Journal of Chromatography A*, v. 677, p. 25-33, 1994.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

ROMBI, M. *100 Plantas Medicinales: composition, mode d'actions et interet therapeutique*. Nice: Remart, 1991. 298 p.

SASS, J.E. *Elements of Botanical Microtechnique*. Nova Iorque: McGraw-Hill, 1951. 222 p.

SCHINELLA, G. R.; TOURNIER, H. A.; PRIETO, J. M.; MORDUJOVICH de BUSCHIAZZO, P.; RIOS, J. L. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sciences*, n. 70, v. 9, p. 1023-1033, 2002.

SEITZ, U.; OEFNER, P. J.; NATHAKARNKITKOOL, S.; POPP, M.; BONN, G. K. Cappillary electrophoretic analysis of flavonoids. *Electrophoresis*, v. 13, p. 35-38, 1992.

SENNA, E. M. T. L. *Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. Compositae (Marcela)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 1999, Dissertação (Mestrado). 140 p.

SERKEDJIEVA, J.; MANOLOVA, N.; ZGÓRNIK, I.; ZAWLINSKA, B.; GRZYBEK, J. Antiviral activity of the infusion from flowers of *Sambucus nigra* L., aerial parts of *Hypericum perforatum* and roots of *Saponaria officinalis* L. against influenza and herpes simplex viruses. *Phytotherapy Research*, v. 4, n. 3, p. 97, 1990.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, n. 987, p. 57-66, 2003.

SHOIB, A. M. EL-M.; GOMAA, C. S.; ALY, A. A. E.; ROOS, S. A. A note on flavonoid and carbohydrate contents of *Sambucus nigra* L. grown in Egypt. *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 13, n. 1, p. 95-100, 1972.

SILVA, R. A. D. *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*. 1 ed. São Paulo: Nacional, 1929. 1149 p.

SILVA, W. B. *Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a matéria-prima vegetal e solução extrativa de Phyllanthus niruri L. (Euphorbiaceae)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 1999, Dissertação (Mestrado). 145 p.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STCHMANN, J. R. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Editora da Universidade / UFRGS, 1998. 173 p.

SOARES, L. A. L. *Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de Maytenus ilicifolia Mart. Ex. Reissek – Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediário e final*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2002, Tese (Doutorado). 279 p.

SOARES, L. A. L.; OLIVEIRA, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 36, n. 4, p. 787-790, 2004.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. P.; BASSANI, V. L. Farmacologia e toxicologia dos produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*. 4 ed. Porto Alegre / Florianópolis : Ed. da UFRGS / Ed. da UFSC, 2002. 833 p.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drugs Discovery Today*, v. 5, n. 2, p. 39-41, 2000.

SUYENAGA, E. S. *Avaliação da atividade antiinflamatória de flavonóides por ensaios in vivo e in vitro*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2002, Tese (Doutorado). 187p.

SWAIN, T. Flavonoids. In: GOODWIN, T. W. (org.) *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. 2 ed. Londres: Academic Press, 1976. v. 2.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Method Validation. In: *Analytical Method Development and Validation*. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1997.

TAKHTAJAN, A. L. *Diversity and classification of flowering plants*. Nova Iorque: Columbia University Press, 1997. 643 p.

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

TOULEMONDE, B.; RICHARD, H. M. J. Volatile constituents of Dry Elder (*Sambucus nigra*) Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 31, p. 365-370, 1983.

TOURNAIRE, C.; CROUX, S.; MAURETTE, M. T.; BECK, I.; HOCQUAUX, M.; BRAUN, A.; OLIVEIROS. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. *Journal of Photochemistry And Photobiology B , Biology*, v. 19, p. 205-215, 1993.

TSIMOGIANNIS, D. I.; OREOUPLOULOU, V. Free radical scavenging and antioxidant activity of 5,7,3',4'-hydroxy-substituted flavonoids. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, v. 5, p. 523-529, 2004.

TUNÓN, H.; OLAVSDOTTER, C.; BOHLIN, L. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 48, p. 61-76, 1985.

USP. The United States Pharmacopeia. NF 23. 28 ed. Rockville: Estados Unidos Pharmacopeial Convention, 2005. 3187p.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis – A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1996. 384 p.

WANG, H.-K.; XIA, Y.; YANG, Z.-Y.; NATSCHKE, S. L. M.; LEE, K.-H. Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents. In: MANTHEY, J. A.; BUSLIG, B. S. *Flavonoids in the Living System*. Nova Iorque: Plenum Press, 1998. cap. 15. 278 p.

WHO. *World Health Organization: Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products*. Geneva: WHO, 1993.

WHO - World Health Organization. Stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms. *World Health Organization: Technical Report Series*. n. 863, annex 5, 1996. Disponível no endereço <http://www.who.gov>. Acesso em 12/05/2003.

WHO - World Health Organization *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva: WHO, 1998. 115p.

WHO. *World Health Organization: Monographs on Selected Medicinal Plants*. Genebra: WHO, 2001. v. 2. 315 p.

WILLUHN, Von G.; RICHTER, W. Zur kennits der inhaltsstoffe von *Sambucus nigra*. *Planta Médica*, v. 31, p. 328-343, 1977.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carragenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of The Society For Experimental Biology And Medicine*, v. 111, p. 244-247, 1962.

WITTEMER, S. M.; VEIT, M. Validated method for the determination of six metabolites derived from artichoke leaf extract in human plasma by high-performance liquid chromatography-coulometric-array detection. *Journal of Chromatography B*, n. 793, p. 367-375, 2003.

YANG, B.; KOTANI, A.; ARAI, K.; FUSU, F. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. *Analytical Sciences*, v. 17, p. 599-604, 2001.

YESILADA, E; ÜSTÜN, O.; SEZİK, E.; TAKAISHI, Y.; ONO, Y.; HONDA, G. Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: interleukin-1 α , interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . *Journal of Ethnopharmacology*, v. 58, p. 59-73, 1997.

YESILADA, E.; GÜRBÜZ, I.; SHIBATA, H. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, p. 289-293, 1999.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z. W.; SHIMIZU, M. Antioxidative Activity of Flavones and Flavonols *in vitro*. *Phytotherapy Research*, v. 11, p. 446-449, 1997.

ZHI-CHEN, I. *General control methods for vegetable drugs*. Genebra: WHO, p. 71-75, 1980.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.) *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*. 4 ed. Porto Alegre / Florianópolis : Ed. Da UFRGS / Ed. Da UFSC, 2002. 833 p.

CAPÍTULO 1

Tabela A1 Diferenças macroscópicas detectadas na análise das flores de *Sambucus australis* Cham. & Schltld. e *Sambucus nigra* L.

Estruturas	Caracteres	<i>Sambucus australis</i>	<i>Sambucus nigra</i>
FLORES	diâmetro	7,0 a 10,1 mm	3,0 a 5,0 mm
	quanto ao sexo	funcionalmente unissexuais (pistiladas, com estames curtos ou estaminadas, com estames longos)	monoclinas
	botões florais	1,0 a 3,0 mm de diâmetro	1,5 mm a 3,0 mm de diâmetro
BRÁCTEAS	distribuição dos tricomas tectores e glandulares	porção basal da face adaxial	TECTORES: distribuídos por toda a lâmina, mais comumente na margem e na base da face adaxial GLANDULARES: mais abundantes na base da face adaxial
	medida	0,5 a 0,6 mm de largura e 0,9 a 2,8 mm de comprimento	0,5 mm de largura e 0,6 a 1,5 mm de comprimento
	forma	triangulares ou elípticas	triangulares, oblongas, ovaladas a elípticas, laminares
	ápice	proeminência apical presente	proeminência apical ausente
SÉPALAS	coloração	amarelo-esverdeadas	esbranquiçado-amareladas, esverdeadas ou amarronzadas
	forma	triangular-ovaladas	triangulares
	medidas	1,0 a 1,5 mm de comprimento e 1,0 mm de largura na porção basal	0,5 a 1,0 mm de comprimento e 0,5 a 0,7 mm de largura na porção basal
	dentes marginais	ausentes	presentes
	distribuição dos tricomas tectores e glandulares	ocorrem na porção basal da face adaxial	TECTORES: na margem e na base da face adaxial GLANDULARES: na base da face adaxial
PÉTALAS	medidas	2,5 a 5,0 mm de comprimento e 1,5 a 3,0 mm de largura	2,0 a 3,5 mm de comprimento e 2,0 a 3,0 mm de largura
ANDROCEU	comprimento dos estames	curtos ou longos	longos
	deiscência das anteras	deiscentes nas flores estaminadas e indeiscentes nas flores pistiladas	deiscentes
	comprimento dos filetes	flores pistiladas - 1,0 a 2,0 mm flores estaminadas - 3,0 a 4,0 mm	1,0 a 1,5 mm
GINECEU	número de lóbulos no estigma	pentalobado	trilobado
	número de carpelos e lóculos no ovário	pentacarpelar ou tetracarpelar, raro tricarpelar, pentalocular ou tetralocular, raro trilocular	tricarpelar, raro tetracarpelar, trilocular, raro tetralocular
PEDICELOS	medida	1,0 a 6,0 mm de comprimento	1,0 a 7,0 mm de comprimento

Tabela A2. Diferenças microscópicas detectadas na análise das flores de *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. e *Sambucus nigra* L.

Estruturas	Caracteres	<i>Sambucus australis</i>	<i>Sambucus nigra</i>
BRÁCTEAS	forma das células fundamentais da epiderme (secção transversal)	poligonal	alongadas, de diferentes formas
	distribuição dos tricomas tectores e glandulares	porção basal da face adaxial	principalmente na base da face adaxial e na porção basal marginal
	classificação quanto aos estômatos	anfiestomáticas	hipoestomáticas
	vista frontal dos bordos	células tabulares mais alongadas com paredes retilíneas	células mais alongadas com paredes retilíneas
	organização do sistema vascular	um a quatro feixes vasculares ou agrupamentos xilemáticos. Quando apenas um, localiza-se na região da nervura principal, podendo ser constituído por subagrupamentos	geralmente composto por um único agrupamento xilemático
	idioblastos cristalíferos	ausentes	raros
RECEPTÁCULO	gotas lipídicas	grande quantidade	quantidade normal
	tricomas	glandulares ocorrem na região de inserção da bráctea.	tectores e glandulares ocorrem na região de inserção da bráctea.
SÉPALAS	forma das células fundamentais da epiderme	face abaxial: alongadas e possuem forma irregular face adaxial: retangular	tabular
	paredes das células fundamentais da epiderme	sinuosas em ambas as faces, espessas e com visíveis pontoações	face adaxial: retilíneas face abaxial: retilíneas a sinuosas
	distribuição dos tricomas tectores e glandulares	ocorrem na porção basal da face adaxial; os glandulares são abundantes	ocorrem nas regiões basais de ambas as faces, com maior densidade na face adaxial; os tectores ocorrem também na região da margem e são comumente encontrados na porção basal entre as sépalas
	espessura da cutícula	mais espessa na face abaxial	espessa principalmente na região dos bordos
	estômatos	hipoestomático	anfihipoestomático

Continuação...

Estruturas	Caracteres	<i>Sambucus australis</i>	<i>Sambucus nigra</i>
SÉPALAS	idioblastos cristalíferos	ausentes	idioblastos de areia cristalina, de oxalato de cálcio, de aspecto enegrecido e sem forma definida, são visíveis em ambas as faces
	mesofilo	duas a sete camadas de células parenquimáticas.	até cinco camadas de células parenquimáticas.
PÉTALAS	número de nervuras	geralmente cinco, raro quatro paralelas;	três, raro quatro paralelas;
	distribuição dos tricomas	tectores e principalmente glandulares na porção basal da face adaxial;	na porção basal de ambas as faces ocorrem tricomas tectores e glandulares de diferentes formas, sendo que a maior densidade é verificada na face adaxial;
	estriação cuticular (vista frontal)	face adaxial: intensamente estriada face abaxial: menos estriada	face adaxial: menos estriada face abaxial: mais estriada
	idioblastos cristalíferos	ausentes	presentes
	mesofilo	até doze camadas de clorênquima	até dez camadas clorênquima
	sistema vascular	pode ocorrer um feixe vascular de maior desenvolvimento na região da nervura principal.	feixes vasculares colaterais igualmente desenvolvidos.
ANDROCEU	diâmetro dos grãos de pólen	18 µm a 34 µm	15 µm a 25 µm
GINECEU	número de lóculos	cinco, quatro ou raro três	três ou raro quatro
PEDICELOS	colênquima	uma camada	uma a seis camadas
	endoderme	ausente	presente
	sistema vascular	até doze feixes vasculares; não apresenta fibras calibrosas na porção externa do floema; câmbio interfascicular ausente; estágio de desenvolvimento secundário ausente;	até dezesseis feixes vasculares; podem ocorrer fibras calibrosas na porção externa do floema; câmbio interfascicular pode estar presente; estágio de desenvolvimento secundário pode estar presente;
	gotas lipídicas	em todos os tecidos.	na epiderme e no parênquima cortical.

CAPÍTULO 2

Tabela B1 Teor de umidade, flavonóides totais e rutina obtido com o ensaio de perda por dessecação para as amostras de *Sambucus nigra* e *Sambucus australis*.

Espécie	Amostras	Umidade Relativa (%)	Teor de Flavonóides Totais (%)	Teor de Rutina (%)
<i>Sambucus australis</i>	1 ¹	13,85	1,67	0,96
	2 ¹	13,79	2,31	0,89
	3 ¹	10,33	1,67	0,81
	4 ²	10,73	1,91	0,63
	5 ³	9,95	2,92	1,67
	6 ³	10,30	2,47	1,52
	7 ³	10,05	1,46	0,84
	8 ³	10,25	2,57	2,18
	9 ³	9,90	2,69	1,42
	10 ^{3.1}	10,65	2,72	1,33
	11 ^{3.1}	10,64	2,35	1,70
	12 ^{3.1}	9,94	-	1,08
	13 ^{3.1}	9,50	-	0,90
	14 ⁴	11,57	3,30	1,58
	15 ⁴	11,39	2,32	1,0
	16 ⁵	9,74	2,57	0,64
	17 ⁵	13,17	1,75	1,48
	18 ⁶	10,52	-	0,99
<i>Sambucus nigra</i>	19	11,43	1,79	1,03
	20	12,02	1,74	1,05
	21	12,23	1,46	1,02
	22	11,65	1,37	0,79
	23	12,54	1,63	1,31
	24	12,49	1,41	0,93
	25	13,38	1,95	1,30
	26	10,37	1,72	1,18
	27	10,73	1,87	0,78
	28	11,34	2,51	1,64
	29	10,63	0,99	0,72
	30	9,63	1,69	0,68
	31	12,05	1,52	1,09

¹ Amostras coletadas em Viamão.

² Amostra coletadas em Porto Alegre.

³ Amostras coletadas em Caxias do Sul (Cidade).

^{3.1} Amostras coletadas em Caxias do Sul (Interior).

⁴ Amostras coletadas em Veranópolis.

⁵ Amostras coletadas em Santa Maria.

⁶ Amostra coletada em Santa Catarina / Praia da Guarda do Embaú.

Tabela B2 Áreas absolutas relativas a curva de calibração de rutina realizada no dia 1.

	Concentração de rutina ($\mu\text{g/ml}$)							
	10	15	20	25	30	35	40	45
ÁREAS ABSOLUTAS*	245117	374182,3	497678,3	625952,3	753156	872581	998550,3	1117387
DPR (%)	0,27	0,77	0,06	0,15	0,94	0,32	0,93	0,1

*Média de três determinações.

Tabela B3 Áreas absolutas relativas a curva de calibração de rutina realizada no dia 2.

	Concentração de rutina ($\mu\text{g/ml}$)							
	10	15	20	25	30	35	40	45
ÁREAS ABSOLUTAS*	235117	378088,7	501676,7	628406,3	753422,7	877187	999633	1144302
DPR (%)	0,67	0,11	0,22	0,09	0,53	0,17	0,11	1,57

*Média de três determinações.

Tabela B4 Áreas absolutas relativas a curva de calibração de rutina realizada no dia 3.

	Concentração de rutina ($\mu\text{g/ml}$)							
	10	15	20	25	30	35	40	45
ÁREAS ABSOLUTAS*	246588	372591,3	497941	623880	754828,3	866731	993264,3	1106550
DPR (%)	0,76	0,13	0,31	0,079	0,098	0,086	0,24	0,63

*Média de três determinações.

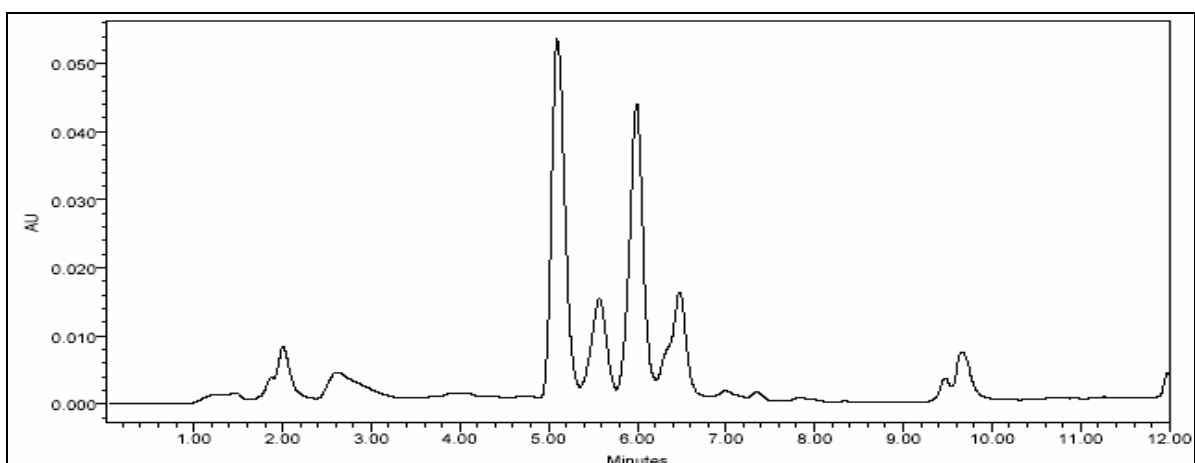


Figura B1 Amostra 1 (*Sambucus australis* Cham. & Schltl) Procedente de Viamão, coletada no ano de 2003.

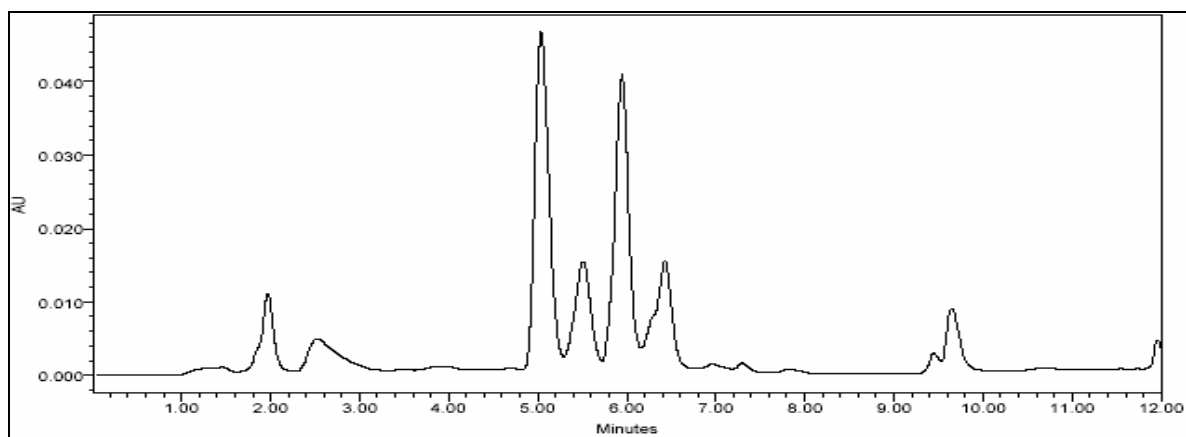


Figura B2 Amostra 2 (*Sambucus australis* Cham. & Schltl) Procedente de Viamão, coletada no ano de 2003.

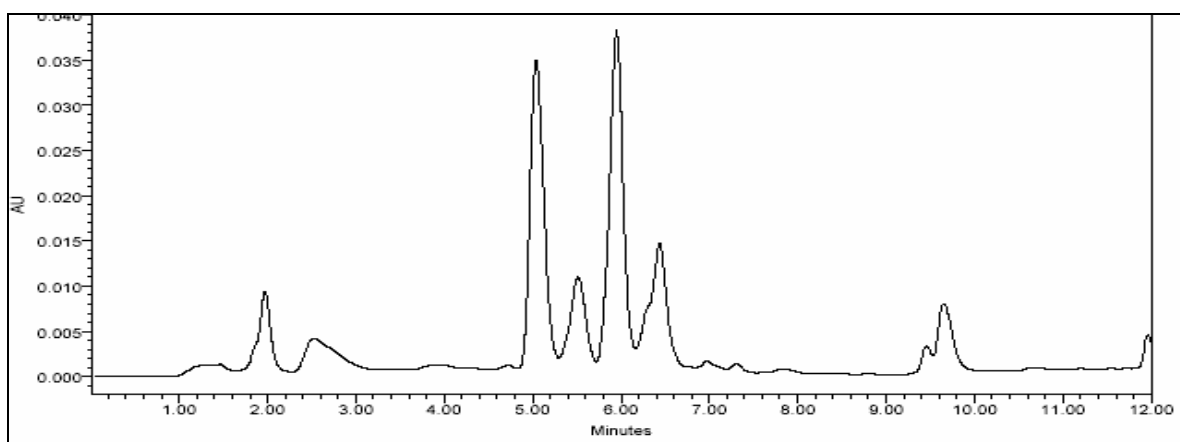


Figura B3 Amostra 3 (*Sambucus australis* Cham. & Schltl) Procedente de Viamão, coletada no ano de 2003.

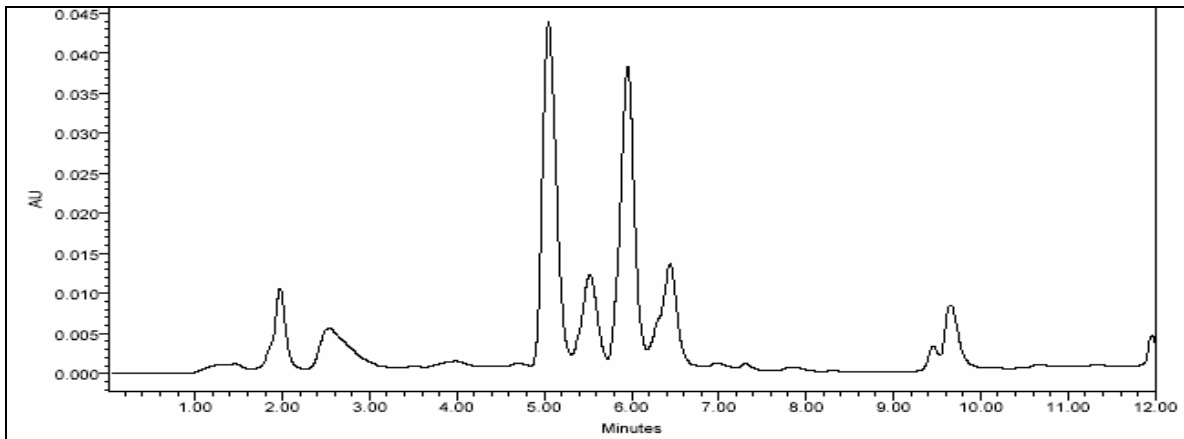


Figura B4 Amostra 4 (*Sambucus australis* Cham. & Schltl) Procedente de Porto Alegre, coletada no ano de 2003.

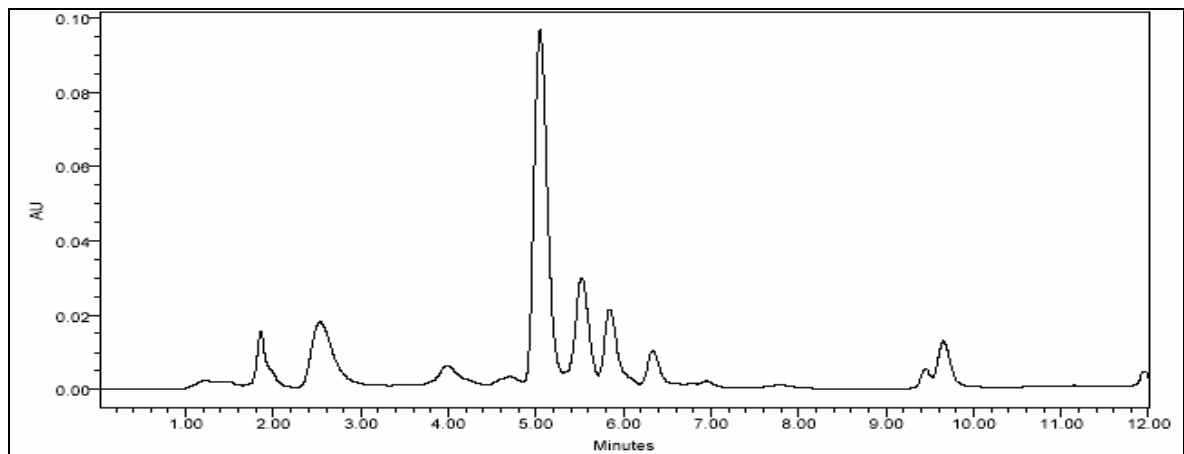


Figura B5 Amostra 5 (*Sambucus australis* Cham. & Schltl) Procedente de Caxias do Sul (Centro), coletada no ano de 2003.

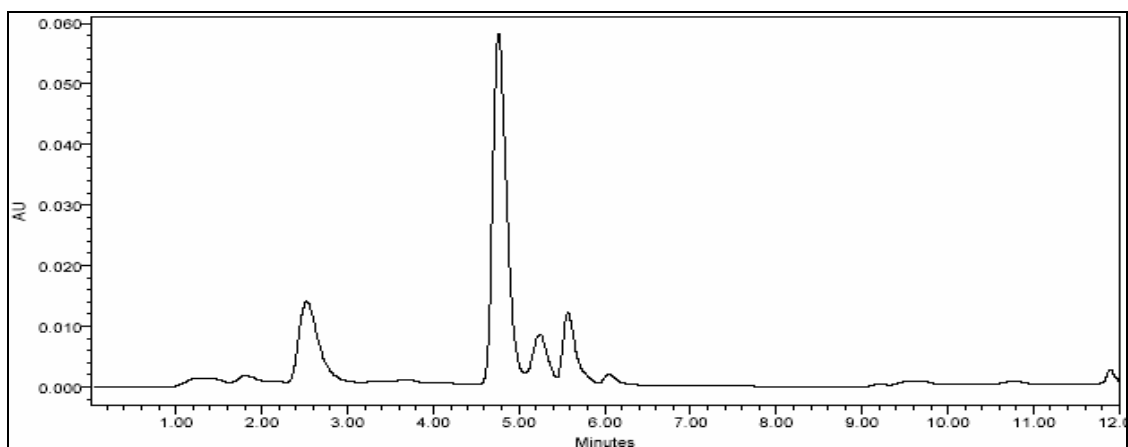


Figura B6 Amostra 6 (*Sambucus australis* Cham. & Schltl) Procedente de Caxias do Sul (Centro), coletada no ano de 2003.

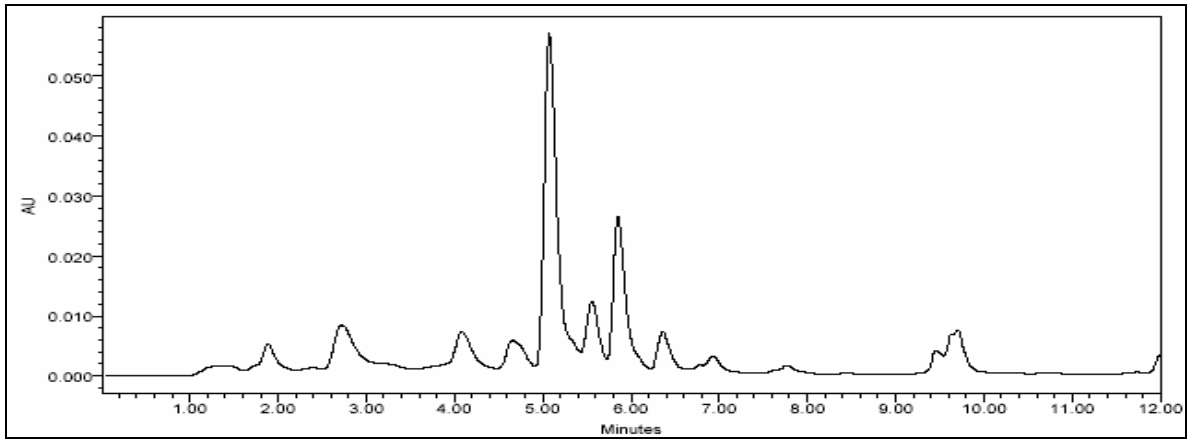


Figura B7 Amostra 7 (*Sambucus australis* Cham. & Schltidl). Procedente de Caxias do Sul (Centro), coletada no ano de 2003.

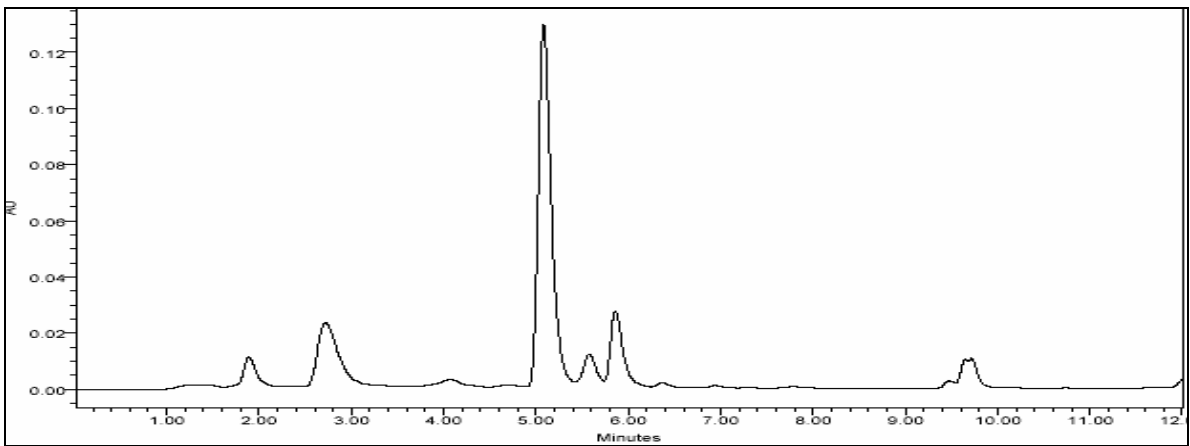


Figura B8 Amostra 8 (*Sambucus australis* Cham. & Schltidl). Procedente de Caxias do Sul (Centro), coletada no ano de 2003.

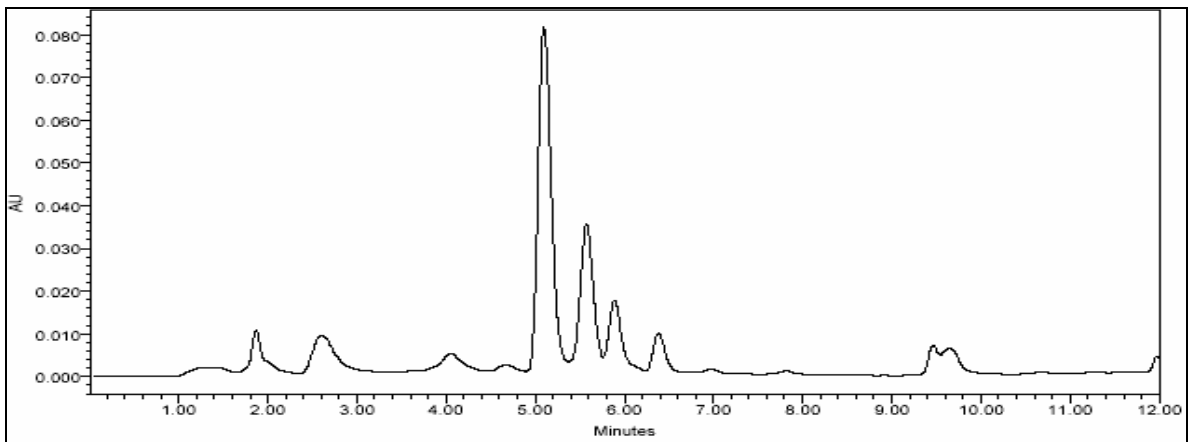


Figura B9 Amostra 9 (*Sambucus australis* Cham. & Schltidl). Procedente de Caxias do Sul (Centro), coletada no ano de 2003.

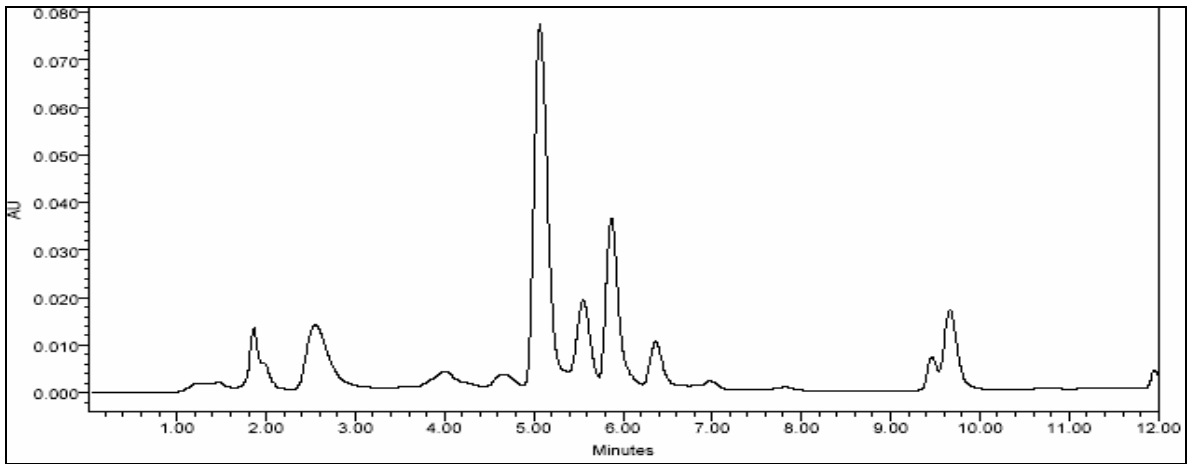


Figura B10 Amostra 10 (*Sambucus australis* Cham. & Schlttdl) Procedente de Caxias do Sul (Centro), coletada no ano de 2003.

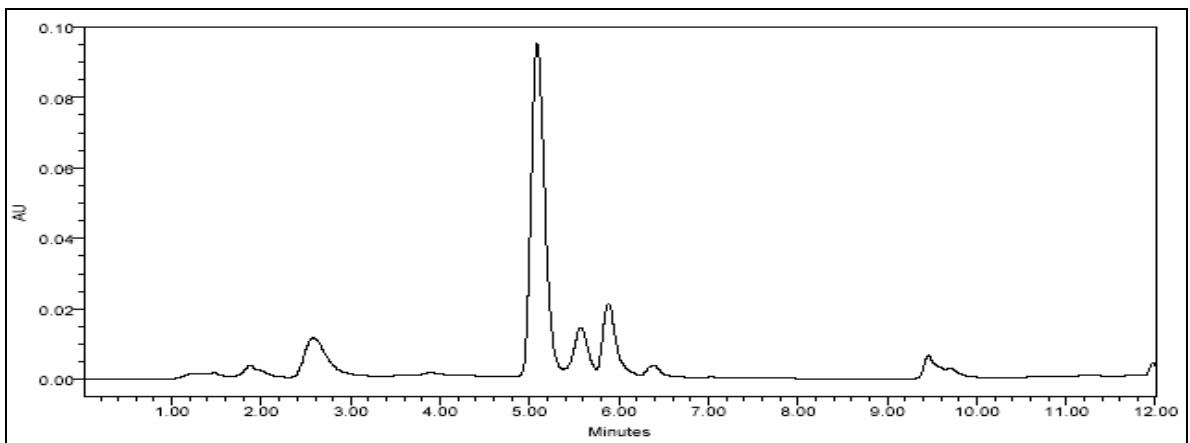


Figura B11 Amostra 11 (*Sambucus australis* Cham. & Schlttdl) Procedente de Caxias do Sul (Interior), coletada no ano de 2003.

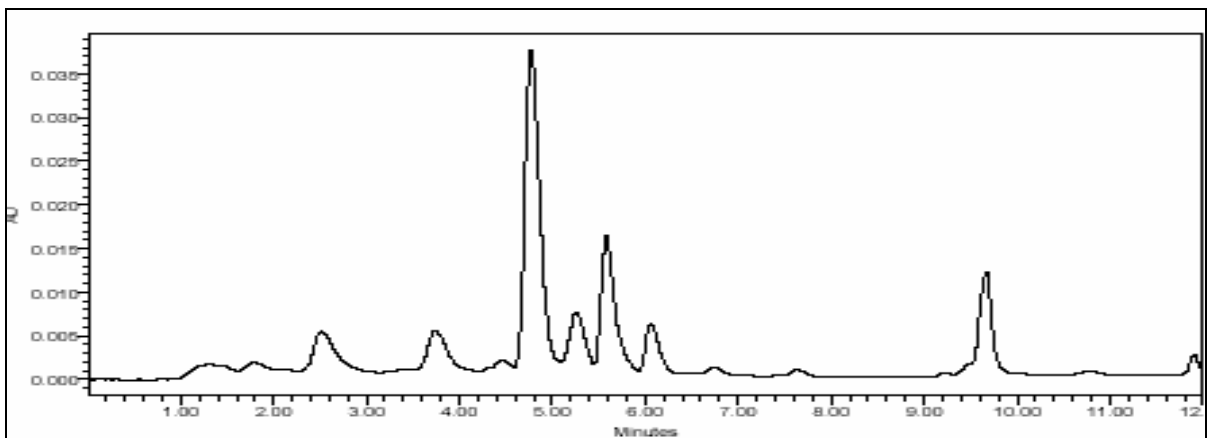


Figura B12 Amostra 12 (*Sambucus australis* Cham. & Schlttdl) Procedente de Caxias do Sul (Interior), coletada no ano de 2004.

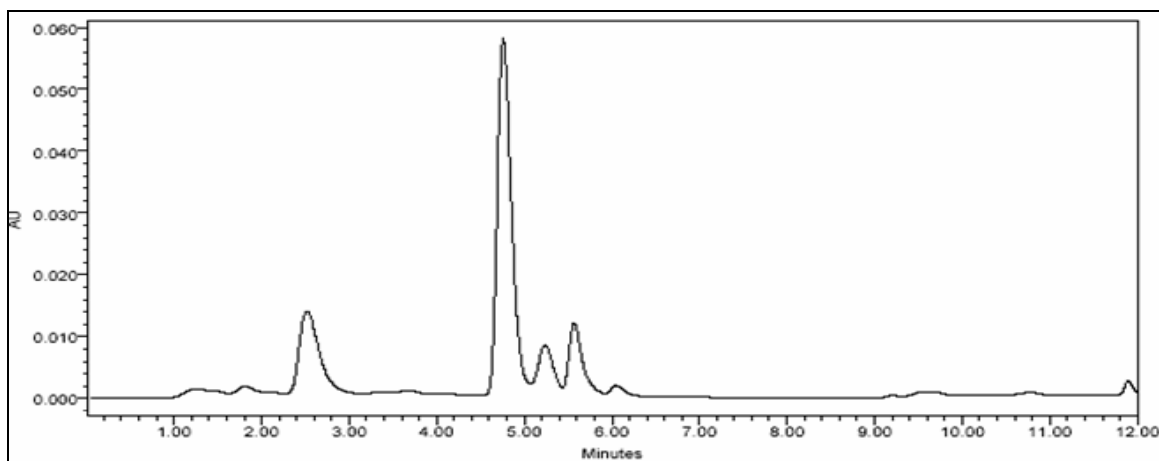


Figura B13 Amostra 13 (*Sambucus australis* Cham. & Schldl) Procedente de Caxias do Sul (Interior), coletada no ano de 2004.

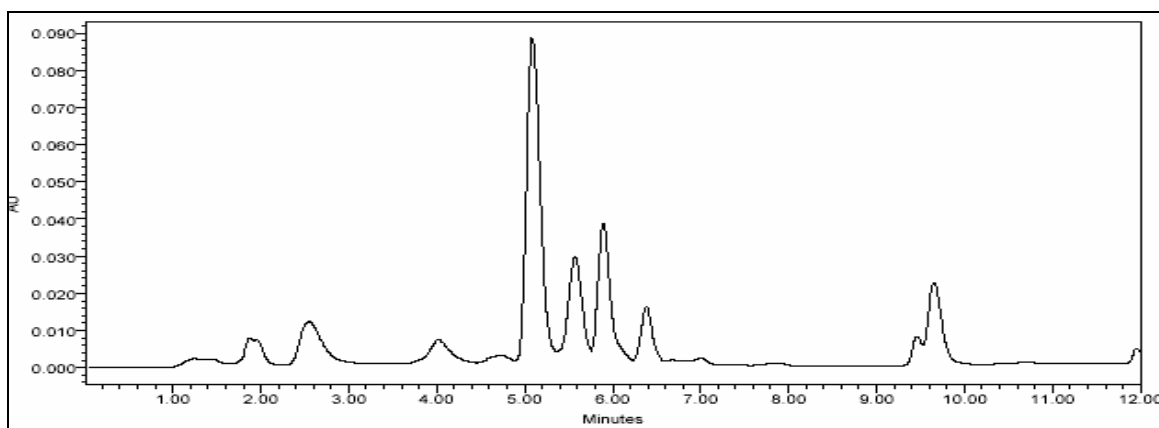


Figura B14 Amostra 14 (*Sambucus australis* Cham. & Schldl) Procedente de Veranópolis, coletada no ano de 2003.

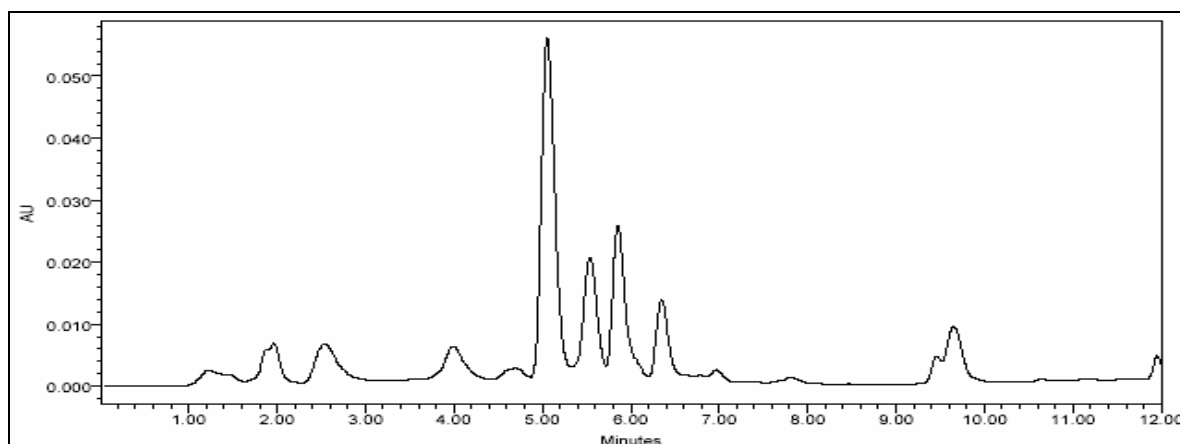


Figura B15 Amostra 15 (*Sambucus australis* Cham. & Schldl) Procedente de Veranópolis, coletada no ano de 2004.

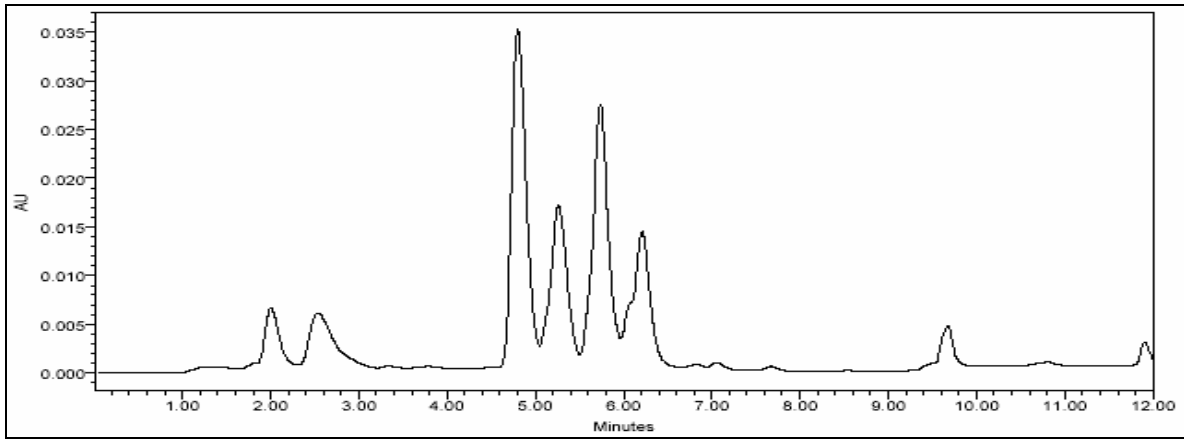


Figura B16 Amostra 16 (*Sambucus australis* Cham. & Schltdl) Procedente de Santa Maria, coletada no ano de 2004.

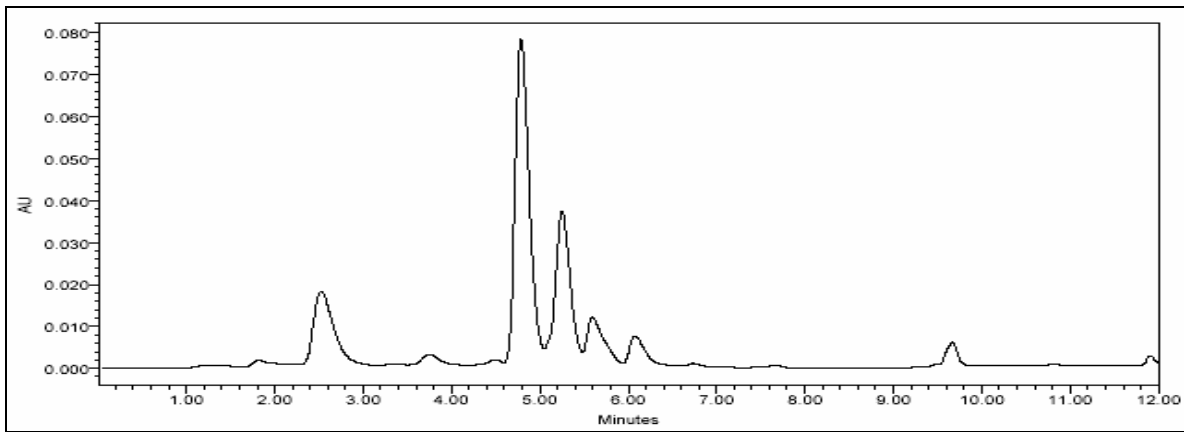


Figura B17 Amostra 17 (*Sambucus australis* Cham. & Schltdl) Procedente de Santa Maria, coletada no ano de 2004.

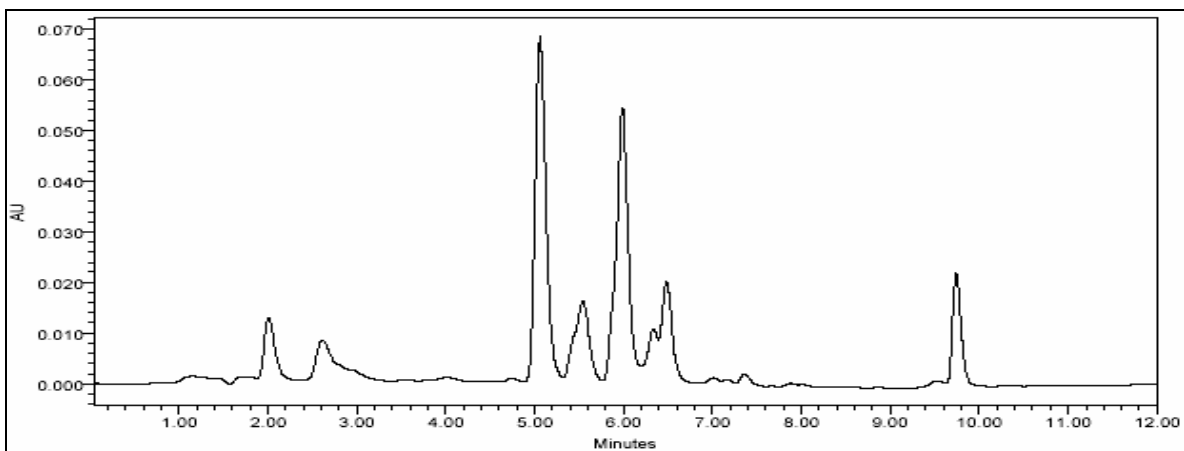


Figura B18 Amostra 18 (*Sambucus australis* Cham. & Schltdl.) Procedente de Guarda do Embaú / Santa Catarina, coletada no ano de 2005.

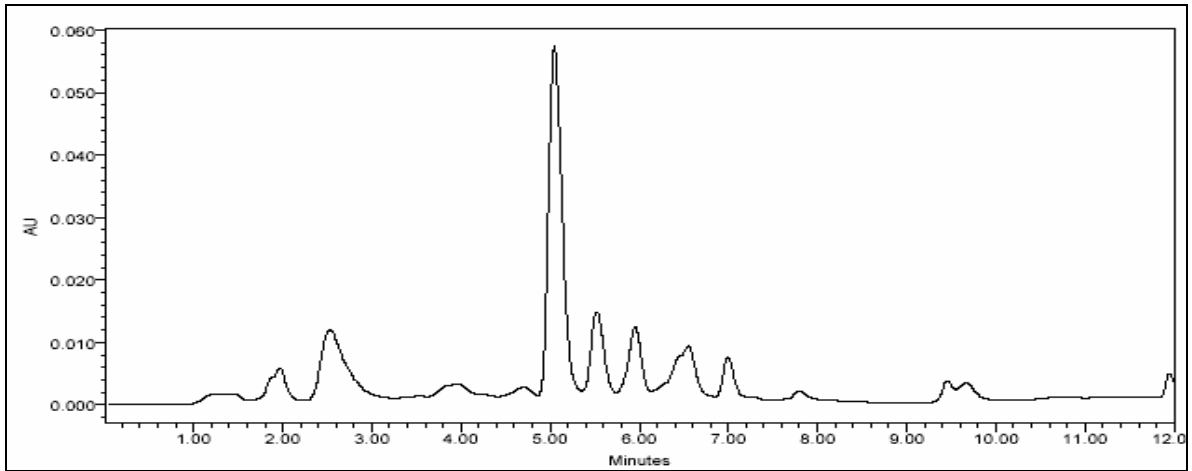


Figura B19 Amostra 19 - *Sambucus nigra* L., fornecida pelo Laboratório de Farmacognosia / UFRGS.

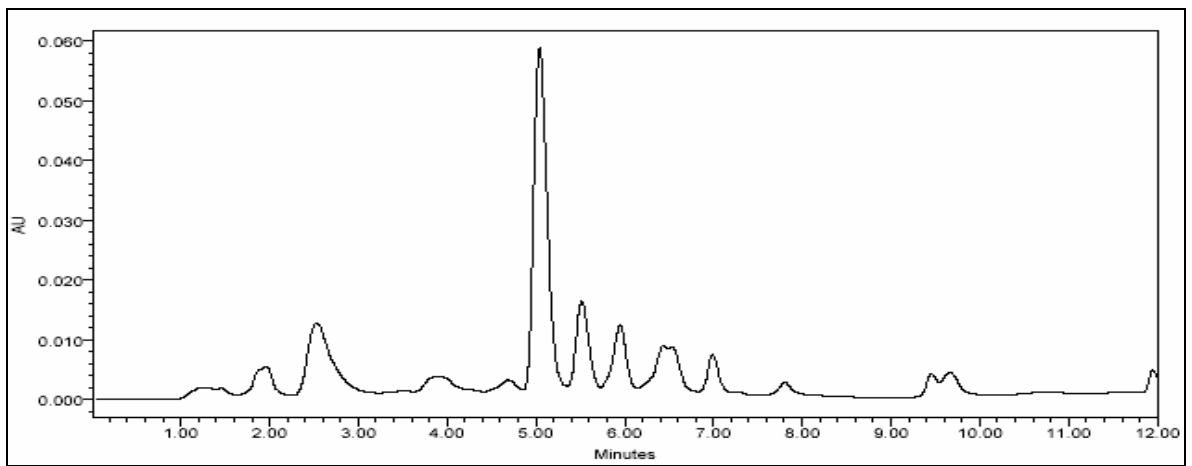


Figura 20 Amostra 20 - *Sambucus nigra* L., fornecida pelo Laboratório de Farmacognosia / UFRGS.

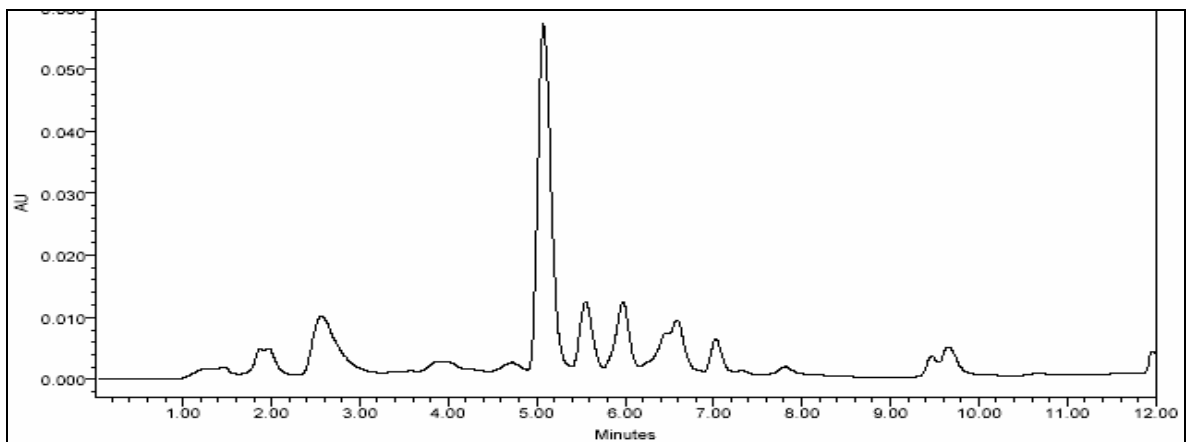


Figura B21 Amostra 21 - *Sambucus nigra* L., fornecida pelo Laboratório de Farmacognosia / UFRGS.

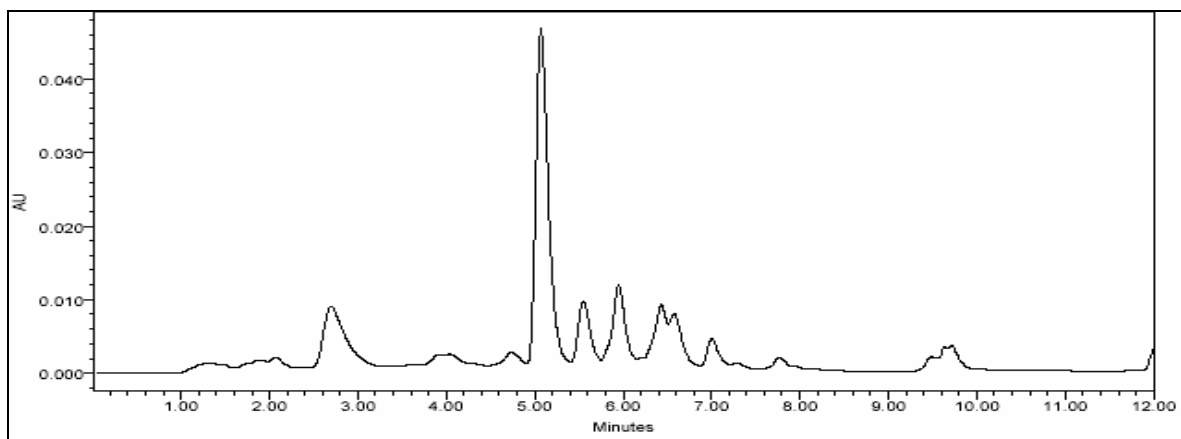


Figura B22 Amostra 22 - *Sambucus nigra* L., fornecida pelo Laboratório de Farmacognosia / UFRGS.

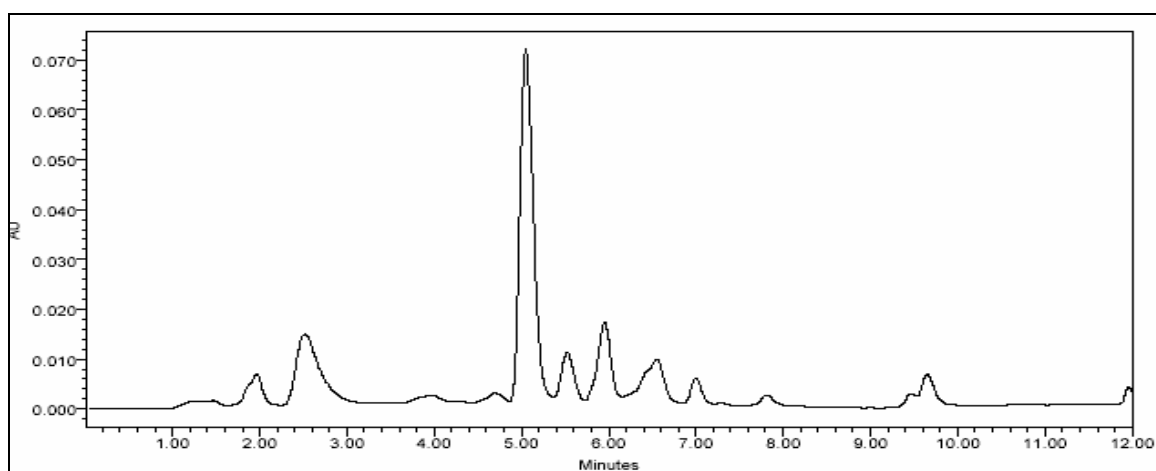


Figura B23 Amostra 23 - *Sambucus nigra* L., fornecida pelo Laboratório de Farmacognosia / UFRGS.

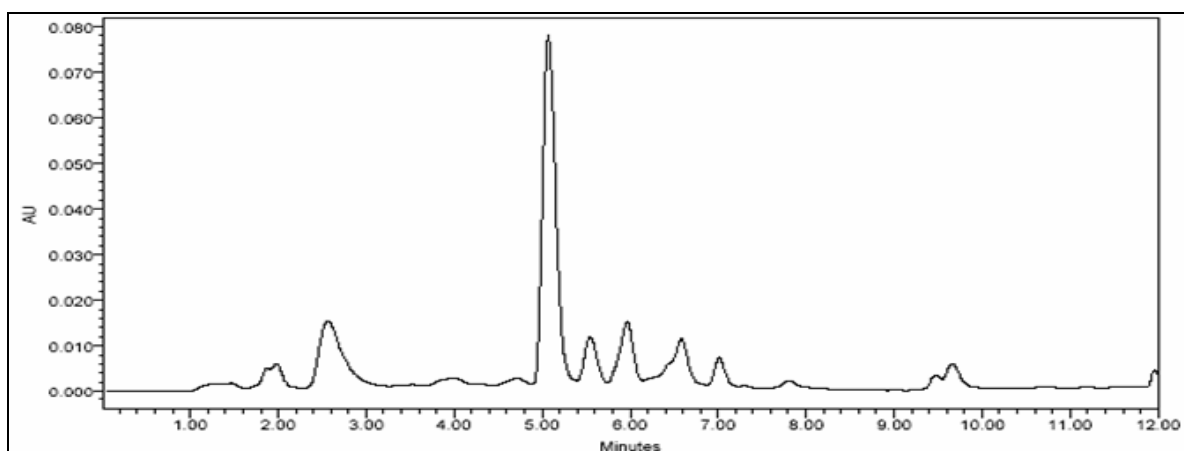


Figura B24 Amostra 24 - *Sambucus nigra* L., fornecida pelo Laboratório de Farmacognosia / UFRGS.

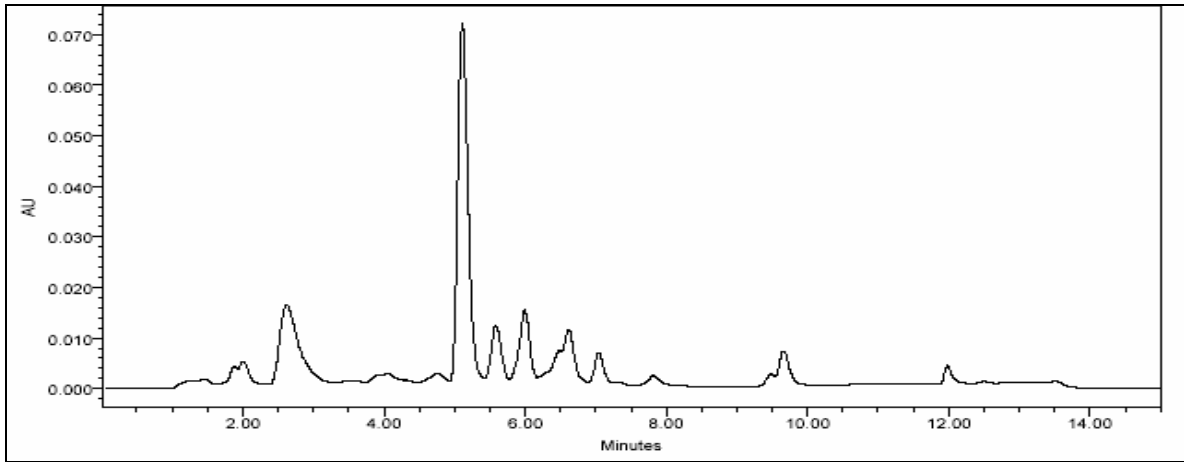


Figura B25 Amostra 25 - *Sambucus nigra* L., fornecida pelo Laboratório de Farmacognosia / UFRGS.

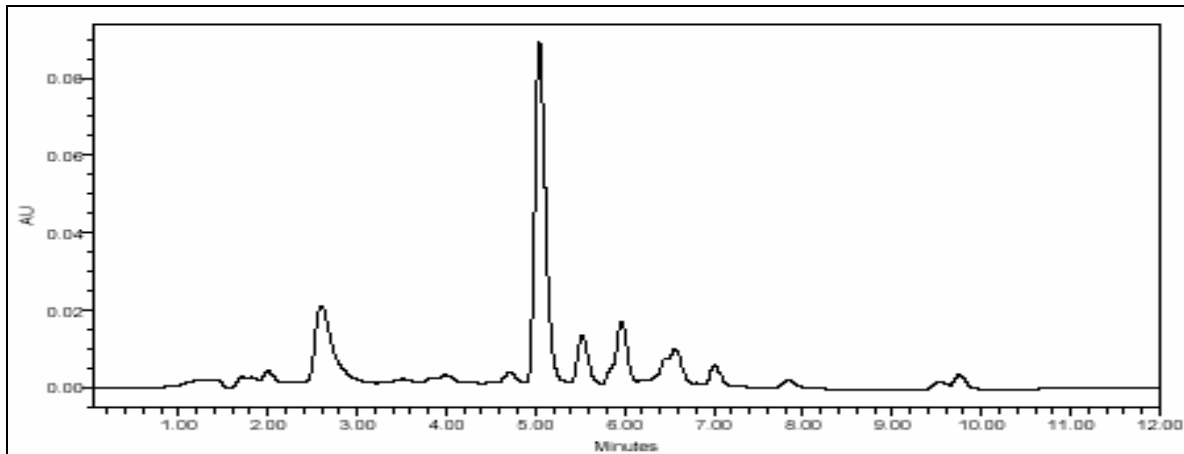


Figura B26 Amostra 26 - *Sambucus nigra* L., fornecida pelo Laboratório de Farmacognosia / UFRGS.

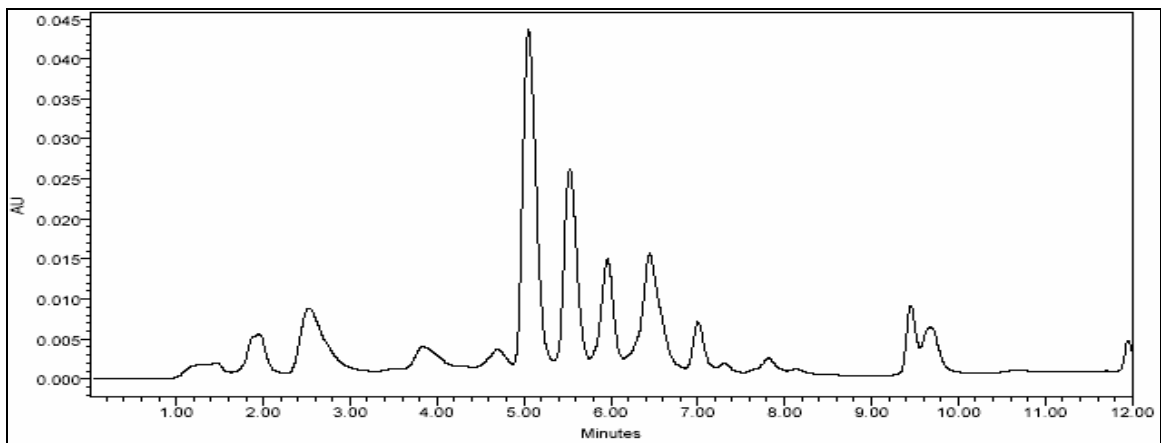


Figura B27 Amostra 27 - *Sambucus nigra* L., adquirida comercialmente.

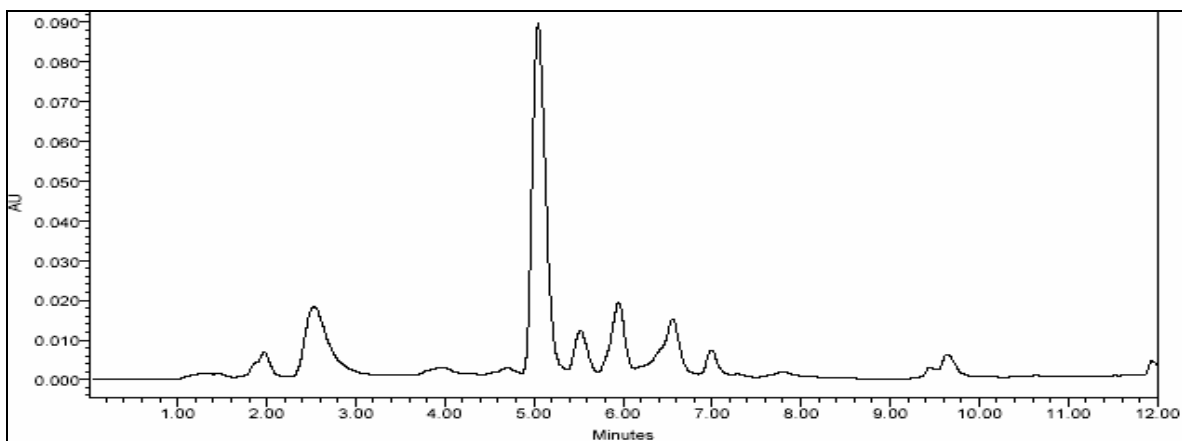


Figura B28 Amostra 28 - *Sambucus nigra* L., fornecida pelo Laboratório de Farmacognosia / UFRGS.

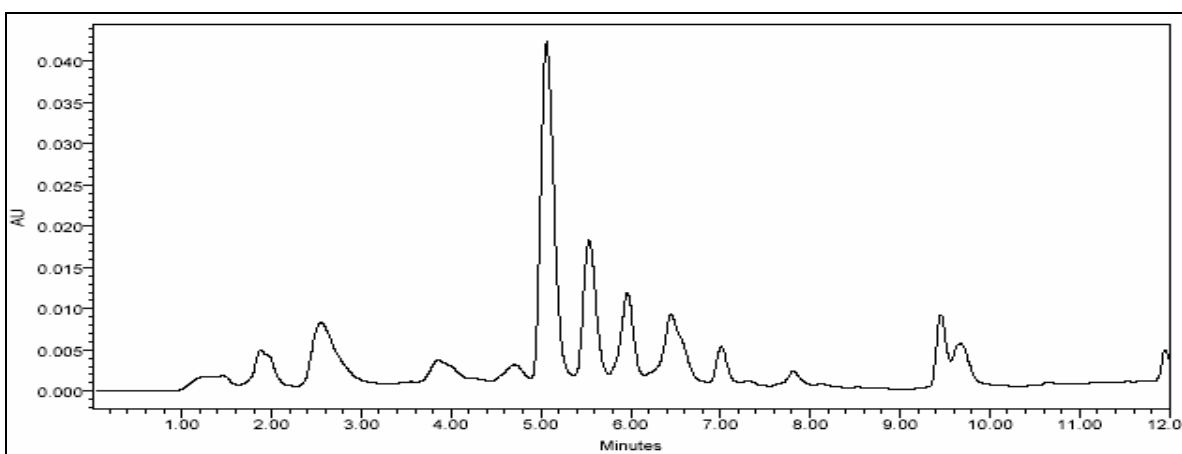


Figura B29 Amostra 29 - *Sambucus nigra* L., adquirida comercialmente.

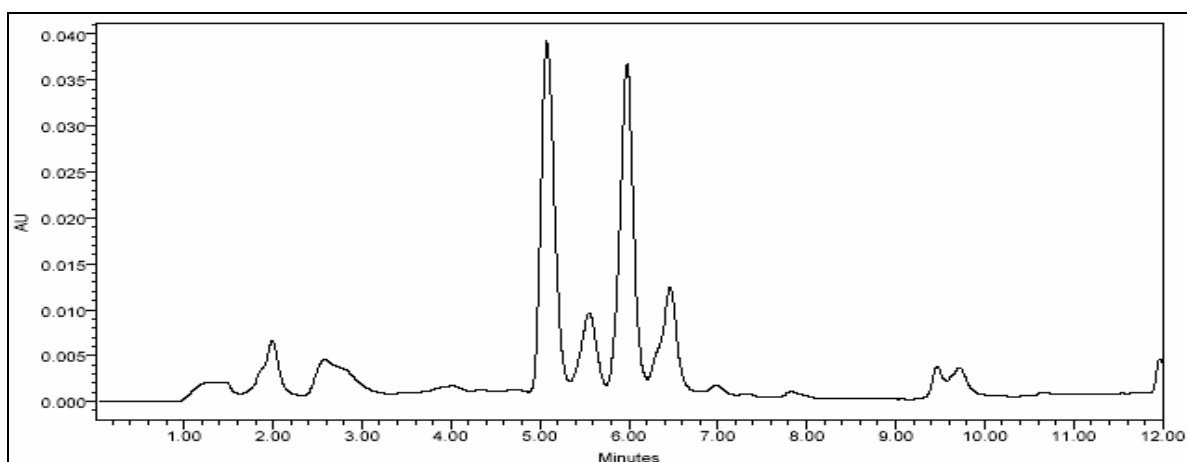


Figura B30 Amostra 30 - *Sambucus nigra* L., adquirida comercialmente.

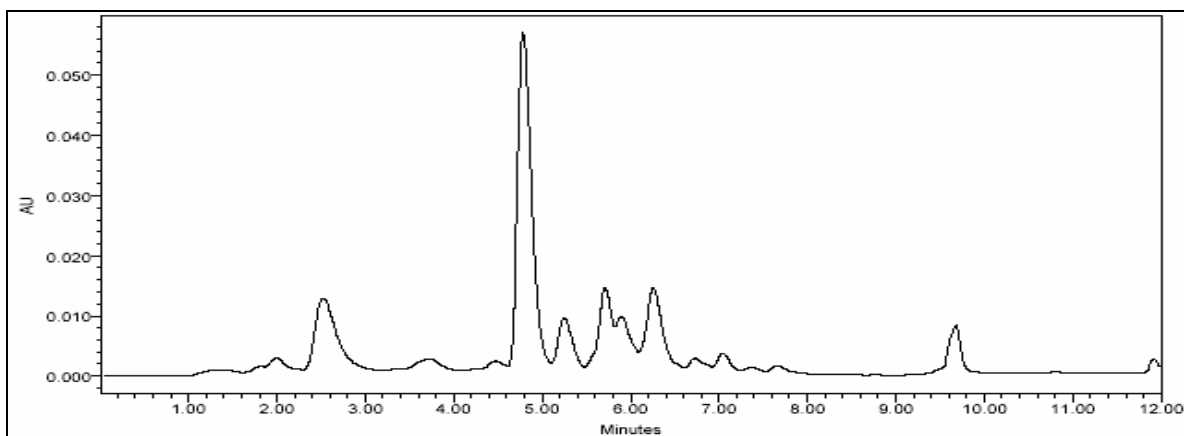


Figura B31 Amostra 31 - *Sambucus nigra* L., fornecida pelo Laboratório de Farmacognosia / UFRGS.