

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO ETNOFARMACOLÓGICA DE *Jatropha isabellei*, *Tabernaemontana catharinensis* E *Viola tricolor*  
VISANDO DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO  
FARMACÊUTICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Mariana Piana**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**AVALIAÇÃO ETNOFARMACOLÓGICA DE *Jatropha isabellei*,  
*Tabernaemontana catharinensis* E *Viola tricolor* VISANDO  
DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA**

**Mariana Piana**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margareth Linde Athayde**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

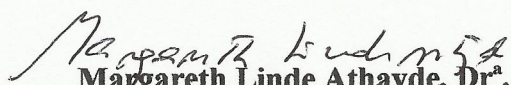
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO ETNOFARMACOLÓGICA DE *Jatropha isabellei*,  
*Tabernaemontana catharinensis* E *Viola tricolor* VISANDO  
DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA**

elaborada por  
**Mariana Piana**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

  
**Margareth Linde Athayde, Dr.<sup>a</sup>**  
(Presidente/Orientador)

  
**Michel Mansur Machado, Dr. (UNIPAMPA)**

  
**Gustavo Roberto Thomé, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 9 de julho de 2012.

*A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original.  
Albert Einstein*

*Dedico este trabalho  
a minha orientadora, Margareth,  
pela confiança,  
e à minha família,  
pela incansável dedicação, incentivo e compreensão.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente e por me fazer acreditar que tudo é possível.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Margareth Linde Athayde, pelo apoio concedido nos momentos mais difíceis, pela motivação, amizade e confiança na orientação deste trabalho e, em especial, pela sabedoria compartilhada de maneira incondicional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos, apoio, disponibilidade e atenção e incentivo, em especial a professora Dr<sup>a</sup>. Gizele Scotii do Canto pela disponibilidade em me co-orientar

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de receber o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e subsídios necessários para que pudesse executar meus experimentos, em especial ao funcionário Paulo Ricardo pela sua amizade e atenção incondicional.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À professora Dr<sup>a</sup> Thais Scotti do Canto-Dorow e Dr<sup>a</sup> Jumaida Maria Rosito, responsáveis pela identificação do material vegetal.

Meu muito obrigado, com muito carinho, aos meus colegas do laboratório de Fitoquímica pela amizade, companheirismo, ensinamentos, reflexões e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos, aconselhando, incentivando e, inclusive na contribuição a este trabalho.

Ao professor Dr. Michel Mansur Machado, e ao Dr. Gustavo Roberto Thomé, que aceitaram compor a comissão examinadora, contribuindo para a conclusão deste trabalho.

Ao secretário Paulo Ricardo, pela eficiência e paciência.

Agradeço aos meus pais, Vilson e Ivanilda, pelo exemplo de luta, sabedoria, dedicação, pelo importante apoio e incentivo em todas as minhas escolhas e por terem dado condições materiais e morais para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Aos meus irmãos Mercedita e Mateus, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e são exemplos de coragem, batalha e determinação. Ao Rafael pelo incentivo e paciência.

A todos que, de alguma maneira, com seu apoio, tempo e atenção, transmitindo energia e confiança sem os quais a jornada seria mais difícil.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO ETNOFARMACOLÓGICA DE *Jatropha isabellei*, *Tabernaemontana catharinensis* E *Viola tricolor* VISANDO DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA**

AUTORA: MARIANA PIANA

ORIENTADORA: MARGARETH LINDE ATHAYDE

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 9 de julho de 2012.

A biodiversidade das plantas constitui uma grande riqueza em potencial para a saúde humana e o uso de plantas que contém flavonoides, puros ou em combinação, tem crescido devido as suas propriedades antioxidantes. Vários efeitos biológicos como atividade antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória têm sido atribuídos aos flavonoides, uma vez que eles são capazes de atuar modulando células envolvidas na inflamação. O conhecimento popular, sobre o uso das plantas medicinais, serve de embasamento para estudos clínicos, farmacológicos e químicos, além do desenvolvimento de novos fármacos, e o estudo de plantas que possuem substâncias que possam agir sobre os radicais livres gerados em nosso organismo, torna-se de grande importância. Entre as espécies que apresentam atividade anti-inflamatória, estão a *Jatropha isabellei* e a *Viola tricolor*, que possuem estudos fitoquímicos associados à capacidade antioxidante, e a *Tabernaemontana catharinensis* que não possui. Este trabalho pretende analisar entre essas espécies, aquela que apresenta potencial como anti-inflamatório, desenvolver uma formulação e submetê-la a estudos de estabilidade. Os ramos e frutos de *T. Catharinensis* foram coletados, macerados em etanol (70%), filtrado, evaporado em evaporador rotatório para remoção do etanol (extrato aquoso), esse foi particionado, utilizando solventes de polaridade crescente: clorofórmio, acetato de etila e butanol, quantidade igual de extrato aquoso foi submetido à secura resultando no extrato bruto. A capacidade antioxidante dos ramos foi superior à dos frutos, o conteúdo de polifenóis, taninos condensados e alcaloides, não apresentaram relação com a capacidade antioxidante, esse resultado indica que a capacidade antioxidante esteja relacionada não somente a quantidade, mas também a diferentes padrões de hidroxilação dos flavonoides. O estudo das frações das flores de *V. Tricolor* realizados por Gonçalves (2008) apresentaram excelentes capacidades antioxidantes, superiores as encontradas em *T. Catharinensis* e *J. isabellei* em estudos de Fröhlich (2010). Além disso, o mesmo autor encontrou grandes quantidades de rutina em todas as frações de *V. tricolor*, e por essas razões foi utilizada no desenvolvimento do gel. As flores de *V. tricolor* foram coletadas, maceradas em etanol (70%), o filtrado foi evaporado em um evaporador rotatório para remoção do etanol, o extrato aquoso obtido foi submetido à secura obtendo-se o extrato bruto que foi analisado fitoquimicamente e apresentou quantidades consideráveis de polifenóis, flavonoides, taninos condensados, ácido salicílico e pequenas quantidades de alcaloides. Métodos para quantificação da rutina no gel e no extrato foram validados. O gel desenvolvido foi submetido a estudos de estabilidade, por meio de análises organolépticas, medidas de pH, viscosidade, e quantificação de rutina através do método validado. O gel apresentou-se estável desde que se mantenham a temperaturas inferiores a 20°C.

**Palavras chaves:** *Tabernaemontana catharinensis*, *Viola tricolor*, estabilidade.

## ABSTRACT

Master's Degree Dissertation  
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria

### **AVALIAÇÃO ETNOFARMACOLÓGICA DE *Jatropha isabellei*, *Tabernaemontana catharinensis* E *Viola tricolor* VISANDO DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA**

**AUTHOR: MARIANA PIANA**

**ADVISER: MARGARETH LINDE ATHAYDE**

**Day and Place of the Defense: July 9<sup>th</sup>, 2012, Santa Maria.**

The plants biodiversity have a rich potential for the human health and the use of plants that containing flavonoids, alone or in combination, has grown because of their antioxidant properties. Several biological effects such as antitumor activity, antioxidant and anti-inflammatory have been attributed to flavonoids, since they are able to act by modulating cell involved in inflammation. The popular knowledge, about the use of medicinal plants, is the basis for clinical, pharmacological and chemical studies, besides the development of new medicines, and the study of plants that have substances that can act on the free radicals generated in our body, is of great importance. Between the species that have anti-inflammatory activity, are *Jatropha isabellei* and *Viola tricolor*, that have phytochemical studies associated to the antioxidant capacity and *Tabernaemontana cathariensis* which has not. This work intends to analyze between these species, the one that have potential anti-inflammatory, develop a formulation and submit it to stability studies. The branches and fruits of *T. Catharinensis* were collected, macerated in ethanol (70%), filtered, evaporated in a rotary evaporator to remove the ethanol (aqueous extract), that has been partitioned using increasingly polar solvents: chloroform, ethyl acetate and n-butanol, an equal amount of aqueous extract was subjected to dryness resulting in the crude extract. The antioxidant activity of the branches was higher than the fruits, the content of polyphenols, condensed tannins and alkaloids had no relation with the antioxidant activity, and this result suggests that the antioxidant capacity is related not only with the quantity but also with different hydroxylation patterns of flavonoids. The study of fractions from flowers of *V. tricolor* conducted by Gonçalves (2008) showed excellent antioxidant capacity, higher than those found in *T. Catharinensis* and *J. isabellei* in studies by Fröhlich (2010). Furthermore, the same author found large amounts of rutin in all fractions of *V. tricolor* that, for these reasons, was used in development of the gel. The flowers of *V. tricolor* were collected, macerated in ethanol (70%), the filtrate was evaporated in a rotary evaporator to remove the ethanol, the aqueous extract obtained was subjected to dryness obtaining the crude extract that was phytochemically analyzed and presented considerable amounts of polyphenols, flavonoids, condensed tannins, salicylic acid and small amounts of alkaloids. Methods for quantification of rutin in the gel and in the extract were validated. The developed gel was subjected to stability studies, by organoleptic analysis, pH measurements, viscosity, and quantification of rutin using the method validated. The gel showed stable as long as it remains at temperatures below 20°C.

**Keywords:** *Tabernaemontana catharinensis*, *Viola tricolor*, stability.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Núcleo fundamental dos flavonóides .....	20
Figura 2 – Ergolina (alcaloide da cravagem do centeio).....	20
Figura 3 – Ácido gálico (tanino hidrolizável).....	20
Figura 4 – $\beta$ caroteno (carotenóide).....	21
Figura 5 – <i>V. tricolor</i> (Amor-perfeito).....	26
Figura 6 – <i>Tabernaemontana catharinensis</i> (Cobrina) – Aspecto geral da planta.....	28
Figura 7 – <i>Jatropha. Isabellei</i> (Mamoneiro do campo) – Aspecto geral da planta.....	30

### MANUSCRITO 1

Figura S1 – HPLC analysis' of chlorogenic acid of the CRF fractions of the branches (1) and of the rutin of the EtAC fraction of the fruits (2), (3) unknown peak.....	49
--	----

### MANUSCRITO 2

Figure I – Percentage of antioxidant capacity of ascorbic acid standard and of the crude extract of <i>V. tricolor</i> evaluated by DPPH method.....	69
Figure II – Chromatogram of the quantification of salicylic acid in crude extract of <i>V. tricolor</i> . (SA) salicylic acid.....	69
Figure III– Figure III – Chromatogram of the quantification of rutin in crude extract of <i>V. tricolor</i> . R ( rutin); (*) unknown peak, probably related to flavonoid glycosides.....	70
Figure IV– Figure IV - Chromatogram of the quantification of rutin in gel of <i>V. tricolor</i> . (R) rutin; (*) unknown peak, probably related to flavonoid glycosides.....	70

### MANUSCRITO 3

Figura 1– Viscosity values of gels of crude extract of the <i>V.tricolor</i> during the accelerated stability study.....	85
Figure 2– Decrease (%) of the concentration of the rutin in relation to the initial concentration in samples of gel.....	85

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO 1

Table S1–IC <sub>50</sub> and total of polyphenols, flavonoids, alkaloids and condensed tannins in the crude extract and in the fractions of fruits of <i>Tabernaemontana catharinensis</i> .....	49
Table S2–IC <sub>50</sub> and total of polyphenols, flavonoids, alkaloids and condensed tannins in the crude extract and in the fractions of the branches of <i>Tabernaemontana catharinensis</i> .....	49

### MANUSCRITO 2

Table I – Total of polyphenols, flavonoids, condensed tannins and alkaloids in crude extract of <i>V. tricolor</i> .....	68
Table II – Results of linearity and sensitivity of method for quantification of rutin in crude extract of <i>V. tricolor</i> .....	68
Table III – Table III – Recovery of the standard solution of rutin added the samples analyzed by the proposed method.....	68
Table IV – Results of linearity and sensitivity of method for quantification of rutin in gel of <i>V. tricolor</i> .....	68
Table V – Recovery of the standard solution of rutin added the samples, analyzed by the proposed method.....	69

### MANUSCRITO 3

Table I – Percent composition (w/w) of the gels.....	84
Table II – Results of the organoleptic characteristics (appearance, color and smell) of the samples analyzed during the period of 90 days in low, room and high temperatures.....	84

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**µg/ml** – micrograma por mililitro  
**Abs** – absorvância  
**CLAE** – cromatografia líquida de alta eficiência  
**cm** – centímetro  
**CRF** – clorofórmica  
**DNA** – (do inglês) “deoxyribonucleic acid”  
**DPPH** – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl  
**EAG/g** –equivalentes de ácido gálico por grama  
**EC/g** –equivalentes de catequina por grama  
**EDTA** – ácido etilenodiamino tetra-acético  
**EQ/g** –equivalentes de quercetina por grama  
**ER/g** equivalentes de rutina por grama  
**ERN** – espécies reativas de nitrogênio  
**ERO** – espécie reativa de oxigênio  
**EtAc** – acetato de etila  
**g** – grama  
**H** – Hidrogênio  
**HCl** – ácido clorídrico  
**IC<sub>50</sub>** – Concentração que resulta 50% da capacidade de inibição  
**IL-1** interleucina 1  
**m** – metro  
**mg** – miligrama  
**min** – minuto  
**mm** – milímetro  
**mM** – milimolar  
**n-BuOH** – butanolica  
**nm** – nanômetro  
**OH** – hidroxila  
**pH** – potencial hidrogeniônico  
**RSD** – relative standard deviation  
**TNF-α** –Factor de necrose tumoral alfa  
**w/w** – weight/weight  
**DPR** – desvio padrão relativo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1 Objetivo geral.....	17
2.1 Objetivos específicos.....	17
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1 Escolha da espécie vegetal e a importância da coleta na concentração de princípios ativos.....	18
3.2 Metabólitos secundários.....	19
3.2.1 Definição.....	19
3.2.2 Funcionalidade.....	19
3.3 Radicais livres.....	21
3.4 Compostos fenólicos como antioxidantes.....	22
3.4.1 Flavonóides.....	23
3.5 Plantas potenciais para estudo farmacológico.....	24
3.5.1 <i>Viola tricolor</i> L.....	25
3.5.2 <i>Tabernaemontana catharinensis</i> A. DC.....	27
3.5.3 <i>Jatropha isabellei</i> Müll. Arg.....	29
3.6 Formulação.....	31
3.6.1 Géis.....	31
3.7 Estudos de estabilidade.....	33
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>MANUSCRITO 1 - Phytochemical analyzes and antioxidant capacity of <i>Tabernaemontana catharinensis</i> A. DC. fruits and branches.....</b>	<b>36</b>
Abstract.....	38
Introduction.....	38
Results and discussion.....	39
Conclusion.....	41
References.....	42
Supplementary material.....	44
Experimental.....	44
References.....	47
<b>MANUSCRITO 2 Analysis of <i>Viola tricolor</i> L. In crude extract and gel.....</b>	<b>50</b>
Abstract.....	52
Introduction.....	53
Reagents.....	54
Methods.....	55
Results and discussion.....	61
Conclusion.....	64
References.....	65
<b>MANUSCRITO 3 Stability study of gel containing <i>Viola tricolor</i> L.....</b>	<b>71</b>
Abstract.....	73
Introduction.....	74
Material and Methods.....	75
Results and discussion.....	75
Conclusion.....	80
References.....	80

<b>5 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>86</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>94</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>96</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Sem o recurso da ciência, o homem primitivo observava, admirava e apreciava a diversidade do mundo das plantas, as quais forneciam alimentos, remédios, roupa e abrigo (CUNHA, 2005). O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana e o conhecimento sobre elas simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (LÓPEZ, 2006).

A biodiversidade dos vegetais constitui uma grande riqueza em potencial para a saúde humana. As plantas são fontes de produtos naturais e biologicamente ativos, muitos dos quais são utilizados para a síntese de inúmeros fármacos. Embora cerca de 100.000 compostos oriundos de plantas tenham sido identificados, as fontes de metabólitos secundários parecem ser inesgotáveis em relação às possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades importantes à terapêutica e à agricultura (YUNES; CALIXTO, 2001).

Com certeza, inúmeras espécies vegetais foram incorporadas à medicina tradicional única e exclusivamente pelo acaso, caracterizado pelo uso empírico de espécies vegetais, seguido de avaliação, mesmo que rústica e grosseira, dos sinais e sintomas que apareciam após seu consumo, até selecionar pela qualidade de respostas se determinada espécie seria útil ou não. O método usado é o mesmo, o da tentativa e erro, ainda muito comum e útil na pesquisa, que serve para mostrar a forte ligação entre o conhecimento popular e o científico (STASI, 1996). A etnofarmacologia é exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem, a abordagem etnofarmacológica consiste em combinar informações adquiridas junto a comunidades locais que fazem uso da flora medicinal com estudos realizados em laboratórios (SIMÕES et al., 2004). A partir desse conhecimento popular acerca do uso das plantas medicinais, que serviu de embasamento para os estudos clínicos, farmacológicos e químicos das plantas, originaram-se os primeiros fármacos utilizados pelo homem, como atropina, artemísia, colchicina, digoxina, efedrina, morfina, pilocarpina, quinina, reserpina, taxol, vincristina e vinblastina (GILANI; ATTA-UR-RAHMAN, 2005).

Fitoterápico é o produto obtido de planta medicinal, ou de seus derivados, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa (BRASIL, 2011). É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004b).

Segundo Miguel e Miguel (1999), os produtos naturais podem ser tão eficientes quanto os produzidos pela síntese química, contudo a transformação de uma matéria prima vegetal em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico. Para garantir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas.

Nos últimos anos, tem-se verificado um grande avanço científico, envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). O uso de plantas contendo flavonoides, puros ou em combinação, tem crescido devido ao aumento da demanda por compostos de origem natural e da atenção dada a alimentos que contêm essa classe de moléculas (DI MAMBRO; FONSECA, 2005).

Os flavonoides representam uma extensa família de compostos fenólicos de baixo peso molecular e, de acordo com suas estruturas moleculares, abrangem diversas classes químicas, como flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianinas, flavanóis (ou catequinas) e flavonóis, entre outros (SULTANA; ANWAR, 2008). Dentre suas propriedades biológicas ressalta-se: ação hepatoprotetora, antitrombótica, antibacteriana, antiviral, antineoplásica, anti-inflamatória e imunoestimulante (BONINA et al., 1996). A capacidade de interagir com a fosforilação de proteínas e a atividade antioxidante, quelante metálica e de varredura de radicais livres podem ser a causa do amplo perfil farmacológico dos flavonoides (DI MAMBRO; FONSECA, 2005).

Os taninos são classificados em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados, importantes componentes gustativos, sendo responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais. A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades. Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diarreia, hipertensão arterial, reumatismo,

hemorragias, feridas, queimaduras, problemas cardiovasculares e do sistema urinário (SIMÕES et al., 2004).

Os alcaloides são compostos nitrogenados e constituem num vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural e o amplo espectro das atividades biológicas reportadas podem ser relacionadas com sua variedade estrutural. Entre suas atividades estão: amebicida, anticolinérgico, anti-hipertensivos, antimalárico, antitumorais, antitussígenos, tratamento da gota entre outras (SIMÕES et al., 2004).

A pesquisa de produtos naturais proporciona a descoberta de novos fármacos e o estudo de plantas que apresentem substâncias que possam agir sobre os radicais livres gerados em nosso organismo, torna-se de grande importância (VELLOSA et al., 2007). Sendo assim, substâncias que agem neutralizando-os têm sido empregadas com a finalidade de se obter produtos destinados a prevenção ou a cura de doenças.

Diante disso, destacam-se as espécies *Viola tricolor*, *Tabernaemontana catharinensis* A. CD e *Jatropha isabellei* Müll. Arg., as quais na medicina popular são utilizadas para o tratamento de diversas patologias, em especial as que envolvem processos inflamatórios. Aliado a isso, sabe-se que os radicais livres são gerados por diversas desordens no nosso organismo, entre eles em processos inflamatórios. Substâncias antioxidantes têm atuado no combate a esses radicais, como por exemplo, alguns metabólitos secundários produzidos pelas espécies vegetais, em destaque os polifenóis e flavonoides que possuem potencial atividade antioxidante. Até o momento, existem estudos sobre compostos fenólicos relacionados à capacidade antioxidante em *V. tricolor* e *J. isabellei*, porém os mesmos são inexistentes em relação a *T. catharinensis*, o que motivou a realização deste trabalho.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Quantificar os principais metabólitos secundários, determinar a capacidade antioxidante, avaliar entre as espécies *V. tricolor*, *T. catharinensis* e *J. isabellei* aquela que possuir melhor potencial antioxidante, e realizar estudo de estabilidade em formulação semi-sólida contendo o extrato dessa espécie.

### 2.2 Específicos

- Quantificar polifenóis, flavonoides, taninos condensados e alcaloides nas frações e no extrato bruto dos frutos e ramos de *T. catharinensis* e do extrato bruto das flores de *V. tricolor*
- Determinar a capacidade antioxidante pelo método do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) no extrato bruto e frações dos frutos e ramos de *T. catharinensis* e no extrato bruto das flores de *V. tricolor*.
- Quantificar compostos fenólicos nas frações dos frutos e ramos de *T. catharinensis* e no extrato bruto das flores de *V. tricolor* por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE) quando presentes.
- Comparar os estudos já realizados de *J. Isabellei*, com os de *T. catharinensis* e *V. tricolor*, escolher a que possuir melhor potencial antioxidante para desenvolvimento de formulação.
- Validar método para quantificação de marcador analítico no extrato bruto e na formulação.
- Realizar estudo de estabilidade na formulação através de análise organoléptica, pH, viscosidade e quantificação de marcador analítico.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Escolha da espécie vegetal e a importância da coleta na concentração de princípios ativos.

Várias abordagens para a seleção de espécies vegetais têm sido apresentadas na literatura, dentre elas, três tipos são alvo de maiores investigações: a) abordagem randômica - escolha da planta sem qualquer critério, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta; b) abordagem quimiotaxonômica ou filogenética - seleção da espécie correlacionada com a ocorrência de uma dada classe química de substâncias em um gênero ou família; c) abordagem etnofarmacológica - seleção da espécie de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico (MACIEL et al., 2002; LÓPEZ, 2006).

A seleção etnofarmacológica, favorece com maior probabilidade a descoberta de novas substâncias bioativas. Nesta abordagem a descrição do histórico da planta como um recurso terapêutico eficaz para o tratamento e cura de doenças de determinado grupo étnico, se traduz na economia de tempo e dinheiro, dois dos fatores mais perseguidos pelas economias ocidentais (NUNES et al., 2003).

Após determinada a espécie vegetal a ser estudada através da abordagem etnofarmacológica, define-se o local da coleta, considerando fatores como idade da planta e época de coleta, esses poderão causar modificações nos teores dos seus constituintes químicos. A planta escolhida deve ser seguramente identificada e destinada ao estudo fitoquímico e/ou farmacológico, nesta etapa escolhe-se a parte da planta que será investigada (raiz, caule, galhos, folhas, flores, frutos) (MACIEL et al., 2002).

Algumas características desejáveis das plantas medicinais são sua eficácia, baixo risco de uso, assim como reprodutibilidade e constância de sua qualidade (TOLEDO et al., 2003). As espécies medicinais, no que se refere à produção de substâncias com atividade terapêutica, apresentam alta variabilidade no tempo e espaço. O ponto de colheita varia segundo órgão da planta, estágio de desenvolvimento, época do ano e hora do dia. A distribuição das substâncias ativas, numa planta, pode ser bastante

irregular, assim, alguns grupos de substâncias localizam-se preferencialmente em órgãos específicos do vegetal (LÓPEZ, 2006).

Há também, uma grande variação na concentração de princípios ativos durante o dia, como por exemplo, os alcaloides e óleos essenciais concentram-se mais pela manhã e os glicosídeos à tarde. A colheita das plantas em determinado ponto tem o intuito de obter o máximo teor de princípio ativo, no entanto, na maioria das vezes, nada impede que as plantas sejam colhidas antes ou depois do ponto de colheita para uso imediato. O maior problema da época de colheita inadequada é a redução do valor terapêutico e/ou predominância de princípios tóxicos (MACIEL et al., 2002).

## **3.2 Metabólitos secundários**

### **3.2.1 Definição**

O metabolismo é um conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula, sendo que a presença de certas enzimas é que direcionam essas reações. Os compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transformados é que são os metabólitos (SANTOS, 2010).

Metabólitos secundários são compostos químicos distintos dos intermediários e dos produtos do metabolismo primário. Eles variam de acordo com a espécie vegetal e a família e alguns são restritos a determinada família, gênero ou espécie, possibilitando o emprego como marcador taxonômico (BENETT; WALLSGROVE, 1994).

Geralmente, os efeitos medicinais e/ou tóxicos das plantas estão relacionados aos metabólitos secundários, os quais possuem como função adaptar o vegetal ao meio e representam a principal classe de substâncias vegetais de interesse farmacológico (VANHAELEN et al., 1991).

### **3.2.2 Funcionalidade**

As plantas apresentam em seus metabólitos secundários uma grande fonte de possíveis fármacos devido à diversidade de moléculas com as mais variadas estruturas e propriedades químicas (VELLOSA et al., 2007). Constituintes tais como flavonoides (figura 1), alcaloides (figura 2), taninos (figura 3) e carotenoides (figura 4) demonstraram ações farmacológicas (BARA et al., 2006) as quais podem ser empregados como agentes medicinais (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

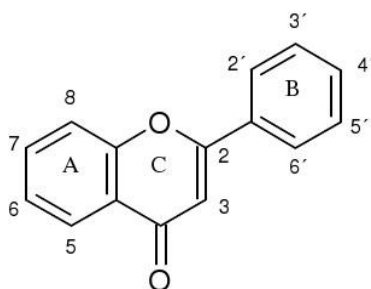


Figura 1 – Núcleo fundamental dos flavonóides (Simões et al. 2004).

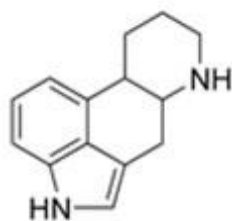


Figura 2 – Ergolina (alcaloide da cravagem do centeio) disponível em <[http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g25\\_centeio/acc.html](http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g25_centeio/acc.html)>. Acesso em 11/07/2012.

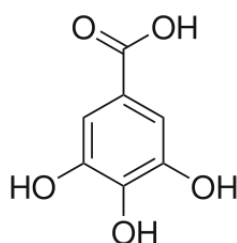


Figura 3 – Ácido gálico (tanino hidrolizável) disponível em <<http://es.wikipedia.org/wiki/Tanino>>. Acesso em 11/072012.

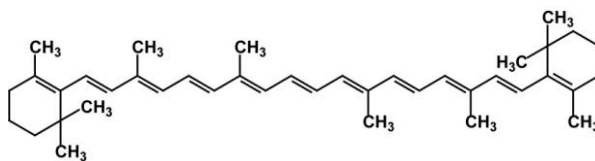


Figura 4 –  $\beta$  caroteno (carotenóide) disponível em <<http://wikipoly.files.wordpress.com/2009/03/beta.jpg>>. Acesso em 12/07/2012.

Esses metabólitos secundários possuem várias atividades, os alcaloides atuam no sistema nervoso central como calmante, sedativo, estimulante, anestésico e analgésico, alguns outros alcaloides podem ser cancerígenos e outros antitumorais; as mucilagens agem como cicatrizante, anti-inflamatório, laxativo, expectorante e antiespasmódico; os flavonoides podem agir como anti-inflamatório, atuar fortalecendo os vasos capilares, e ter ação antiesclerótico, antiedematoso, dilatador de coronárias, espasmolítico, antihepatotóxico, colerético e antimicrobiano; os taninos agem como adstringentes e antimicrobianos (SIMÕES, 2004).

### 3.3 Radicais livres

Os radicais livres são espécies químicas constituídas de um átomo ou associação dos mesmos, possuindo um elétron desemparelhado na sua órbita mais externa. Essa situação implica em alta instabilidade energética e cinética, e para se manterem estáveis precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula. A formação de radicais livres conduz ao estresse oxidativo, condição em que a geração de espécies reativas excede a habilidade do sistema em neutralizá-las e eliminá-las, com esse desequilíbrio inicia-se uma cadeia de reações, originando alterações em proteínas extracelulares e a modificações celulares. O dano mais comum causado pelo estresse oxidativo é a peroxidação dos ácidos graxos constituintes da dupla camada lipídica que, pode levar morte celular e também pode resultar na multiplicação celular (HIDRATA et al., 2004).

O organismo humano sofre ação constante de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) geradas em processos inflamatórios, por disfunções biológicas ou proveniente dos alimentos. As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ( $\text{HO}\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ), peroxila ( $\text{ROO}\bullet$ ) e alcoxila ( $\text{RO}\bullet$ ); e os ERN incluem-se o óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ),

ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>), nitritos (NO<sub>2</sub>□), nitratos (NO<sub>3</sub>□) e peroxinitritos (ONOO□). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios (BARREIROS et al., 2006). Existem outros, como por exemplo o peróxido de hidrogênio, que por si só, não apresenta atividade radical, no entanto, sua facilidade em atravessar as membranas celulares faz com que entre em contato com metais de transição ou com oxigênio singlete, produzindo radicais hidroxilas que, são muito nocivos pela impossibilidade de serem sequestrados in vivo (BARREIRA et al., 2008; SANTOS, 2011). Desta forma, os metais de transição possuem um comportamento similar aos radicais livres, visto que desempenham uma atividade vital na iniciação do processo mediado por estas espécies reativas (BARREIRA et al., 2008).

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como o câncer, as doenças cardiovasculares, a catarata, o declínio do sistema imune e as disfunções cerebrais (SOUZA et al., 2007).

### **3.4 Compostos fenólicos como antioxidantes**

Para evitar o efeito nocivo destes radicais, o organismo possui mecanismos biológicos de proteção. Entre eles, hormônios como estrogênio e angiotensina, algumas enzimas como superóxido dismutase, glutathione peroxidase, e catalase, ou antioxidantes fornecidos pela dieta como  $\alpha$ -tocoferol, carotenóides, ácido ascórbico e compostos fenólicos, dotados da capacidade de remover os radicais livres e assim, proteger contra os danos oxidativos (TAWAHA et al., 2007).

Como antioxidantes, os compostos fenólicos são moléculas bioativas e multifuncionais que ocorrem de forma natural nos vegetais, com propriedades que lhes permitem atuar como agentes redutores, doadores de átomos de hidrogênio, e captadores do singlete oxigênio (RICE EVANS et al., 1995, ZHENG; WANG, 2001; BARREIRA et al., 2008).

Os compostos fenólicos das plantas como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas têm

recebido muita atenção, pois a atividade antioxidante desses deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e sua estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUZA et al., 2007).

#### 3.4.1 Flavonóides

Entre os compostos fenólicos, encontram-se os flavonoides que possuem diversas formas estruturais. A maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído por duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (SIMÕES et al., 2004). A diversidade estrutural dos flavonoides pode ser atribuída ao nível de oxidação e às variações no esqueleto carbônico básico, promovidas por reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização (COUTINHO et al., 2009).

De forma geral, os flavonoides podem ao apresentar-se na natureza sob formas de aglicona, que corresponde a sua forma mais simples, e glicosídeos (RICE-EVANS et al., 1997; COUTINHO et al., 2009) que são formados por flavonoides ligados a resíduos de açúcares, como glicose, galactose, ramnose, arabinose ou xilose (RICE-EVANS et al., 1997).

A atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura, quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons. Há necessidade de no mínimo duas hidroxilas fenólicas no flavonoide para se obter uma atividade antioxidante considerável, uma vez que os monoidroxiflavonóides não são efetivos. Entre os flavonoides com múltiplas hidroxilas destacam-se a miricetina, quercetina, luteolina, fustina, eriodictiol e taxifolina que possuem forte atividade antioxidante quando comparados ao  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno (CAO et al. 1997; BARREIROS et al., 2006).

Outro fator importante que influencia a atividade antioxidante dos flavonoides é a sua interação com as biomembranas. A lipofilicidade do flavonoide indica a

incorporação desse pela membrana, que é alvo da maioria das ERO e ERN. Assim, deve haver uma concentração mínima do flavonoide por ácido graxo, de modo a assegurar a presença de uma de suas moléculas próxima ao sítio de ataque do radical. Flavonoides que possuem uma cadeia de açúcares ligada em sua estrutura são muito polares, não sendo assimilados pela membrana, porém, nesta forma eles podem ser armazenados em vesículas, possuindo um tempo maior de permanência no organismo (BARREIROS et al., 2006).

Vários efeitos biológicos como atividade antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória têm sido atribuídos aos flavonoides, visto que são capazes de atuar modulando células envolvidas com a inflamação (por exemplo, inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- $\alpha$  e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida, e esses efeitos são devidos a sua capacidade de remover radicais livres (HAVSTEEN, 2002; COUTINHO et al., 2009), assim como, estimulando a citocina anti-inflamatórias IL - 10 (COMALADA et al., 2006).

### **3.5 Plantas potenciais para estudo farmacológico**

O uso de espécies medicinais como fonte de substâncias bioativas permanece uma estratégia promissora que pode contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. O Brasil, detentor de aproximadamente um terço da flora mundial, possui um grande número de plantas que vêm sendo utilizadas pela população para diferentes fins, especialmente no tratamento da inflamação. Por apresentarem ações anti-inflamatórias e imunomoduladoras comprovadas cientificamente, os flavonoides constituem uma alternativa potencial como agentes terapêuticos frente aos processos inflamatórios (COUTINHO et al., 2009).

Entre as espécies vegetais com potencial atividade antioxidante e utilizadas popularmente no tratamento de processos inflamatórios destacam-se:



### 3.5.1 *Viola tricolor* L.

A espécie vegetal *V. tricolor* (conhecida popularmente por amor-perfeito) é uma planta ornamental pertencente à Violaceae (GONÇALVES, 2008). As Violáceas compreendem arbustos ou ervas de 16 gêneros e 800 espécies (LORENZI; SANTOS, 1995). É uma herbácea anual de caule curto, ramificado, com 20 - 25 cm de altura, folhas lisas, cerosas e denteadas. Possui flores isoladas geralmente com três cores, em tons amarelo, azul e vermelho. As plantas melhoradas por seleção formam o grupo *V. tricolor hortensis* cujas flores são muito grandes com cores adicionais como roxas, roxas enegrecidas e brancas, na forma de manchas ou estrias. É cultivada em bordaduras ou grupos em canteiros ricos, permeáveis e úmidos, a pleno sol. Multiplica-se por sementes que são semeadas no outono (LORENZI; SANTOS, 1995).

De acordo com a cultura popular, possui propriedades anti-inflamatória, expectorante, estimulante, sudorífera, diurética, depurativa, emoliente, antitumoral e laxante. Dentre suas indicações terapêuticas estão: uso em feridas, chagas, úlceras, eczema úmido, infecções cutâneas, afecções do sangue, doenças cardíacas, nervosas e icterícia (CIAGRI, 2012).

*V. tricolor* (figura 1) é usada externa e internamente, tem sido relatada no tratamento de várias doenças de pele, como seborreia, impetigo e acne; catarro do trato respiratório e coqueluche, assim como também auxilia nos casos de dermatite seborreica em bebês. É também empregada no alívio dos sintomas de cistite. A planta foi oficialmente incorporada a Farmacopeia dos Estados Unidos e ainda é usada na América na forma de pomada e cataplasma em eczemas e outros problemas de pele, e internamente para bronquite (RIMKIENÈ et al., 2003).

As folhas secas, pulverizadas ou misturadas com mel até formarem uma pomada, quando aplicadas sobre as feridas, ajudam a cicatrizá-las. Para curar infecções cutâneas, tratam-se as partes afetadas com compressas de gaze embebidas em uma infusão da planta. A infusão, que também pode ser ingerida, combate as afecções do sangue, a debilidade nervosa, o cansaço, as doenças cardíacas nervosas e icterícia (CIAGRI, 2012). Todas essas aplicações descritas acima encontram apenas embasamento empírico, pois ainda há muito pouco sendo investigado cientificamente sobre as potencialidades terapêuticas da planta.



Figura 1 - *V. tricolor* L. (Amor-perfeito) – Aspecto geral da planta. Disponível em <<http://canguemcores.blogspot.com.br/2009/05/amor-perfeito.html>> Acesso em 10/05/2012.

Esta espécie contém 0,3% de ácido salicílico e derivados, como metil-éster e violutosídeo, ácidos fenólicos como os ácidos trans-caféico, protocatequico e p-cumárico; 10% de mucilagem, 2,4 - 4,5% de taninos, flavonoides (rutina, violantina, scoparina, saponarina, orientina, vicenina, glicosídeos antocianidínicos), carotenóides, como violaxantina e zeaxantina, cumarinas, como a umbeliferona e pequenas quantidades de saponinas, ácido ascórbico e tocoferol. Os salicilatos e a rutina presentes na planta têm propriedade anti-inflamatória. Devido à alta concentração de rutina na planta, esta pode ser empregada para prevenir rompimentos dos capilares sanguíneos, controlar a formação dos fluidos nos tecidos e reduzir a pressão sanguínea (RIMKIENÈ et al., 2003). O ácido salicílico possui um efeito queratolítico, também proporciona o aumento da penetração de outras substâncias na pele devido a um efeito de dissolução do cimento intercelular (HERANE, 2005).

Estudos da capacidade antioxidante pelo método DPPH nas frações diclorometano, acetato de etila e butanólica e no extrato bruto das flores e em outras partes do vegetal (folhas e ramos) efetuados por Gonçalves (2008) resultaram em ótimas capacidades antioxidantes. Os resultados mostraram que as frações do extrato das flores apresentaram capacidade superior as demais partes da planta estudada. A fração diclorometano apresentou IC<sub>50</sub> de 13,40 µg/mL, acetato de etila de 13,25 µg/mL e butanólica de 14,18 µg/mL, sendo equiparável ao do ácido ascórbico (IC<sub>50</sub> de 12,66 µg/mL). O mesmo autor encontrou 143,57 mg de rutina/g de fração butanólica e total de rutina de 182,72 mg/g de planta, correspondendo a 28,4%, um teor consideravelmente alto presente nas flores de *V. tricolor*.

Vukics et al. (2008), consideraram que o principal componente das flores é rutina e como principal componente das folhas foi identificadas como violantina. Também observaram que houve correlação positiva entre a capacidade antioxidante e o conteúdo de flavonoides. Toiu et al. (2008) quantificaram 112,23 mg/100g de ácido salicílico no produto vegetal das partes aéreas dessa espécie. Witkowska-Banaszczak et al. (2005) testou a infusão, decocção e o extrato etanólico dessa espécie e verificou significativa atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*.

Svangard et al. (2004) realizaram fracionamento originando uma fração rica em pequenas proteínas lipofílicas, que resultou no isolamento de três ciclotídeos, os quais demonstraram citotoxicidade dose dependente para as linhagens de células humanas de linfoma e mieloma, sendo que as potências dos três ciclotídeos isolados foram equiparados ao da doxorubicina, droga antineoplásica utilizada clinicamente.

### 3.5.2 *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.

A família Apocynaceae é considerada uma família angiosperma contendo aproximadamente 300 gêneros e 2000 espécies conhecidas. Uma estimativa para a flora brasileira engloba cerca de 41 gêneros e 376 espécies. A família inclui espécies com alta importância econômica, tanto para produtos farmacêuticos e látex, quanto para plantas ornamentais (JOLY, 1998). O gênero *Tabernaemontana* pertence à família Apocynaceae e várias espécies desse gênero são utilizadas na medicina popular contra diversos tipos de enfermidades: diarreia, doenças de pele, verrugas, sífilis, herpes, hanseníase, câncer, picadas de insetos e ainda, como hemostática, hipotensora e cardiotônica (AGRA et al., 2008).

Dentro das espécies existentes no Brasil destaca-se a *Peschiera fuchsiaefolia*, recentemente reclassificada como *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (*T. Catharinensis*) (ALMEIDA et al., 2004) que é popularmente conhecida pelos nomes de “leiteira” ou “leiteiro de vaca”, por produzir látex nas folhas, caules e frutos, com muita abundância. Seus usos relatados são como antídoto para mordedura de serpentes, como calmante em dor de dente e para o tratamento de verrugas (PEREIRA et al., 2005). De acordo com Leeuwemberg (1994), esta espécie também é denotada como *T. affinis*, *T.*

*australis*, *T. hilariana*, é encontrada na Argentina e Paraguai, Brasil e Bolívia (PEREIRA et al., 2008). Árvores ou arbustos de *T. catharinensis* (figura 2) possuem de 3 - 10m de altura, e seu caule leitoso torna-se glabrescentes com o passar do tempo. Possui folhas membranáceas estreitamente elípticas a ovado-elípticas, pecíolo 3-8mm de comprimento, inflorescência geralmente com muitas flores brancas eretas, terminais ou axilares, brácteas 3-7 mm de comprimento e frutos de 2 a 3,4 x 1,3 - 2,2 cm, amarelo, vermelho ou vermelho-alaranjado (MORALES, 2010).



Figura 2 – *T. catharinensis* (leiteira) – Aspecto geral da planta. Disponível em <<http://florademisiones.blogspot.com.br/2010/02/tabernaemontana-catharinensis-dc.html>> acesso em 10/05/2012.

Estudos farmacológicos dos extratos brutos dessa espécie tem demonstrado atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e analgésica (Pereira et al., 2003). Estudos realizados por Pereira et al. (2008) resultaram no isolamento e determinação de estruturas, tais como, 12 alcaloides indólicos, 13 triterpenos pentacíclicos e 3 triterpenos do extrato das cascas das raízes de *T. catharinensis* e também confirmou que os compostos ibogamina, 3-oxo-coronaridina e 12-metoxi-4-metilvoachalotina presentes demonstraram citotoxicidade para linhagens de células tumorais de adenocarcinoma de mama e de melanoma humano.

Veronese et al. (2005) verificaram que após a incubação do músculo sóleo com veneno de *Bothrops jararacussu* ou das toxinas bothropstoxin I ou bothropstoxin II, juntamente com o extrato aquoso de *T. catharinensis*, ocorreu imediatamente uma

redução dos níveis de creatina quinase de 53%, 37% e 56%, respectivamente. O músculo sóleo em análise microscópica apresentou redução significativa de mionecroses quando se encontrava protegido pelo extrato aquoso de *T. catharinensis*. Pereira et al. (2005), verificaram as atividades antioxidantes através da reação acoplada de betacaroteno/ácido linoleico e observaram que as frações ricas em alcaloides obtiveram atividade antioxidante superiores quando comparadas ao controle betacaroteno. Segundo Pereira et al. (2006), a ação efetiva desse extrato está associadas à presença de alcaloides indólicos.

Estudos realizados por Guida et al. (2003) em extratos metanólicos e fração de alcaloides obtidos do córtex do tronco de *T. catharinensis* detectou atividade frente à *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter lwoffii*.

Janning et al. (2011) verificaram que extrato hidroalcoólico de *T. catharinensis*, através de análise macroscópica no processo de cicatrização de ferida em ratos, contém propriedades cicatrizantes.

Até o momento, não constam na literatura, análises quantitativas sobre compostos fenólicos e sua relação com a capacidade antioxidante nesta espécie, esse estudo é de grande importância quando se pretende encontrar uma espécie com potencial farmacológico e desenvolver um produto eficaz contendo extratos vegetais.

### 3.5.3 *Jatropha isabellei* Müll. Arg

*J. isabellei*., pertence à família Euphorbiaceae e na medicina popular paraguaia, é conhecida popularmente como “yagua rova”, sinônimos da planta são *Jatropha gossypifolia* var. *Isabelli* Chodat & Hassl. e *Jatropha gossypifolia* var. *Isabelli* Chodat & Hassl. (BASUALDO et al., 1995; PERTINO et al., 2007). Em Santa Maria, RS, a planta é conhecida como “turubiti” ou “mamoneiro do campo”, (figura 3) e seu uso é popularmente recomendado para dores nas costas (FRÖHLICH et al., 2010).

Segundo Joly (1998), esta família compreende 290 gêneros e 7500 espécies, distribuídos principalmente nas regiões tropicais, sendo muito bem representada na flora brasileira. Os maiores centros de dispersão encontram-se na América e na África.

O decocto e a infusão das raízes de *J. isabellei* são recomendados como digestivo, para tratar reumatismo, gota e induzir o aborto (BASUALDO et al., 1995; PERTINO et al., 2007).

Schmeda-hirschmann e Razmilic (1996) testaram o diterpeno jatrofona isolado dos rizomas dessa espécie, os resultados demonstraram que o diterpeno foi significativamente ativo contra as formas promastigotas de *Leishmania spp* e *Tripanossoma cruzi*.



Figura 3 - *J. Isabellei* (Mamoneiro do campo) – Aspecto geral da planta. Fotografia: Angelo A. Schneider, Flora: nativa do Rio Grande do Sul. Disponível em < [http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/floras/open\\_sp.php?img=6217](http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/floras/open_sp.php?img=6217)> Acesso em 10/05/2012.

Theoduloz et al. (2009) avaliaram a atividade antiproliferativa dos diterpenos jatrolona A e B e 16 derivados semi-sintéticos dos mesmos, do composto jatrolona e três derivados deste em culturas de células humanas. As células utilizadas foram fibroblastos de pulmão normal, adenocarcinoma gástrico, leucemia, câncer de pulmão e carcinoma da bexiga. O composto jatrolona A foi inativo contra todas as linhagens de células tumorais, mas sua acetilação originou um composto com atividade antiproliferativa. O composto jatrolona B foi ativo contra todas as linhagens de células tumorais, e seus derivados apresentaram efeitos distintos sobre as linhagens de células selecionadas. O composto jatrolona mostrou forte atividade anticancerígena enquanto que seus derivados  $9\beta,13\alpha$ diidroxiiisabellona e  $13\alpha$ hidroxi- $9\beta$ -acetoxiiisabellona foram menos ativos.

Estudo realizado por Pertino et al. (2007) demonstrou efeito gastroprotetor dos terpenos ácido acetil aleuritólico, do diterpeno jatrofona, das jatrolonas A e B, do composto 9 $\beta$ ,13 diidroxiisabellona e seu derivado acetilado.

Fröhlich (2012) estudou as partes subterrâneas dessa espécie, através de extração e fracionamento com solventes de polaridades crescentes. A melhor capacidade antioxidante foi encontrada a fração acetato de etila (IC<sub>50</sub> de 14,78 $\mu$ g/mL), no entanto o extrato bruto apresentou IC<sub>50</sub> de 124,60  $\mu$ g/mL. Para estas amostras, o conteúdo de polifenóis, flavonoides e taninos condensados foi relativamente proporcional à sua capacidade antioxidante. O mesmo autor, encontrou atividade anti-inflamatória através da avaliação de testes antinoceptivos e anti-edematogênicos em modelo animal para artrite gotosa, do extrato bruto e da fração purificada de alcaloides de *J. Isabellei*.

### 3.6 Formulação

A incorporação dos extratos vegetais em formulações é uma prática bastante difundida, sendo de fundamental importância à escolha adequada da base à qual os princípios ativos serão incorporados, garantindo, assim, a estabilidade e absorção dos princípios ativos e, conseqüentemente, obtenção de seus efeitos farmacodinâmicos esperados (BÜHLER; FERREIRA, 2008).

Ressalta-se ainda a importância no desenvolvimento de fitoterápicos o estabelecimento de marcadores químicos, que são indispensáveis para o planejamento e monitoramento, e estudos de estabilidade dos produtos intermediário e final. Para isso, o conhecimento da estrutura química tem especial relevância no caso de substâncias facilmente degradáveis por fatores tais como luz, calor e solventes (TOLEDO et al., 2003).

#### 3.6.1 Géis

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), géis são definidos como formas farmacêuticas semi-sólidas de um ou mais princípios ativos que contém um agente

geleificante para fornecer firmeza a uma solução ou dispersão coloidal (um sistema no qual partículas de dimensão coloidal – tipicamente entre 1 nm e 1 mm – são distribuídas uniformemente através do líquido).

Sob o ponto de vista dermatológico, são amplamente usados, pois apresentam características sensoriais agradáveis, sendo adequados para produtos com finalidades de proteção, lubrificação, hidratação ou outros efeitos, de acordo com o princípio ativo incorporado à formulação (NAIRN, 2004). Os hidrossolúveis apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos nem comedogênicos e podem veicular princípios ativos hidrossolúveis (CORRÊA et al., 2005).

Geralmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros que, quando dispersos em um meio aquoso doam viscosidade à preparação. Além do agente geleificante e da água, as formulações à base de gel podem conter fármacos, solventes, conservantes antimicrobianos e estabilizantes. Dentre os polímeros empregados na formulação de géis de uso tópico destacam-se gomas naturais, materiais semi-sintéticos como metilcelulose, hidroxietilcelulose (ANSEL, 2007).

O polímero hidroxietilcelulose é utilizado como adjuvante farmacêutico. Trata-se de um polímero de caráter não iônico, formador de gel em sistemas aquosos, agente espessante altamente eficiente usado em várias preparações tópicas. Também se apresenta estável com vários princípios ativos, formulados em preparações com ampla faixa de pH (KIBE, 2000).

Partindo do pressuposto que os fármacos não se ligam aos polímeros, tais géis liberam bem o fármaco (AULTON, 2005), e muitas vezes proporcionam uma liberação rápida independente da solubilidade em água, quando comparados aos cremes ou pomadas (GENNARO, 2004).

Para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica estável e biodisponível é necessário conhecer as propriedades físicas e químicas do fármaco e dos excipientes isoladamente e quando combinados (LIEBERMAN et al., 1989). Os excipientes funcionam como um veículo para as substâncias ativas ou suas associações, possibilitando a preparação e estabilidade, modificação das propriedades organolépticas ou determinação de propriedades físico-químicas de medicamentos, alterando também a sua biodisponibilidade (PRISTA et al., 2003).



### 3.7 Estudos de estabilidade

As pesquisas por novas formas farmacêuticas fitoterápicas vêm crescendo, a fim de viabilizar fitofármacos eficazes e seguros, entre estas formas estão aquelas que contêm flavonoides (LOPES et al., 2006), que são compostos sensíveis à presença de metais, à temperatura e à hidrólise (ZUANAZZI, 2000).

As formulações devem ser estáveis durante as etapas de produção, envasamento, estocagem, comercialização, distribuição e utilização pelo consumidor (CHORILLI et al., 2007). A instabilidade pode ser definida como uma situação de ocorrência imediata ou de longo prazo que altera significativamente a durabilidade, a eficácia e a segurança do produto como, por exemplo, turbidez, precipitação, cristalização, alteração da cor, alteração de odor, variação de viscosidade e separação de fases, fatores que podem ser identificados durante a fase inicial de desenvolvimento do cosmético (ZAGUE, 2006).

O estudo de estabilidade acelerada consiste na realização do teste na fase inicial de desenvolvimento do produto e com uma duração reduzida. É realizado submetendo-se o produto a extremas condições de armazenamento como, por exemplo, diferentes temperaturas, umidade e intensidade de luz, permitindo, assim, que mais dados sejam obtidos em um curto período de tempo. Estas condições têm por finalidade acelerar a decomposição do produto e, portanto, reduzem o tempo necessário para os testes de estabilidade habituais. Este estudo vem demonstrando com grande probabilidade de acerto o que aconteceria no produto quando este é submetido a condições normais de armazenamento por longo período de tempo. Na grande maioria das vezes, o estudo de longa duração confirma o prognóstico dado pelo estudo acelerado (BRASIL, 2004a; AULTON, 2005).

A estabilidade de produtos farmacêuticos e cosméticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagens. Estes estudos fornecem informações acerca do grau de estabilidade relativa de um produto em condições variadas em que venha a ser submetido, desde sua fabricação até o término da validade. Os estudos contribuem para a orientação no desenvolvimento de formulações e materiais de acondicionamento,

aperfeiçoamento de formulações, estimativa e confirmação de prazo de validade e monitoramento e segurança dos produtos (BRASIL, 2004a).

Produtos expostos ao consumo e que apresentem problemas de estabilidade organoléptica ou físico-química, além de descumprirem os requisitos técnicos de qualidade, podem ainda colocar em risco a saúde do consumidor, configurando infração sanitária (BRASIL, 2004a).

Aliados aos recursos da moderna tecnologia, a indústria tem investido em pesquisas para o desenvolvimento de formulações contendo plantas medicinais visando um mercado promissor pela busca em manter o organismo saudável e em equilíbrio com produtos de alta qualidade (LOPES et al., 2006).

Neste ponto de vista destaca-se a avaliação do teor de substância ou grupo de substâncias ativas e do perfil qualitativo dos constituintes químicos de interesse, presentes na matéria-prima vegetal, produtos intermediários e produto final; por meio de métodos espectrofotométricos, cromatográficos, físicos, físico-químicos ou químicos, devendo possuir especificidade, exatidão, precisão e tempo de rotina analítica, viabilizando-se que o mesmo possa ser utilizado em estudos de estabilidade, permitindo, inclusive, a detecção de produtos oriundos da degradação das substâncias ativas ou dos marcadores químicos. Além disso, a utilização de métodos analíticos visando à quantificação de substâncias ativas ou de referência bem como de aspectos relativos à forma farmacêutica são essenciais para a obtenção da homogeneidade dos lotes de produção (TOLEDO et al., 2003).

## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados desta dissertação estão sob a forma de três manuscritos, que estão formatados de acordo com as normas dos periódicos em que foram submetidos, itens materiais e métodos, resultados e discussão, e referências bibliográficas encontram-se nos manuscritos.

## **4 RESULTADOS**

**MANUSCRITO 1** – Submetido à revista Natural Product Research

**Phytochemical analyzes and antioxidant capacity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. fruits and branches.**

Mariana Piana, Aline Augusti Boligon, Thiele Faccim de Brum, Marina Zadra, Janaína Kieling Frohlich, Amanda Luana Forbrig Froeder, Alexandra Augusti Boligon, Margareth Linde Athayde



**Phytochemical analyzes and antioxidant capacity of  
Tabernaemontana catharinensis A. DC. fruits and branches.**

Journal:	<i>Natural Product Research</i>
Manuscript ID:	GNPL-2012-0858
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	15-Jun-2012
Complete List of Authors:	Piana, Mariana; Federal University of Santa Maria, Department of Industrial Pharmacy Boliqon, Aline; Federal University of Santa Maria, de Brum, Thiele; Federal University of Santa Maria, Zadra, Marina; Federal University of Santa Maria, Frohlich, Janaina; Federal University of Santa Maria, Froeder, Amanda; Federal University of Santa Maria, Boliqon, Alexandra; Federal University of the Pampa, Athayde, Marqareth; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy
Keywords:	Tabernaemontana catharinensis, Antioxidant Capacity, Apocynaceae

## **Phytochemical analyzes and antioxidant capacity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. fruits and branches.**

Mariana Piana<sup>a</sup>, Aline Augusti Boligon<sup>a</sup>, Thiele Faccim de Brum<sup>a</sup>, Marina Zadra<sup>a</sup>, Janaína Kieling Frohlich<sup>a</sup>, Amanda Luana Forbrig Froeder<sup>a</sup>, Alexandra Augusti Boligon<sup>b</sup>, Margareth Linde Athayde<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*Phytochemical Research Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil;*

<sup>b</sup>*Adjunct Professor, Federal University of the Pampa, Campus São Gabriel, Av. Antonio Trilha, 1847. 97300-000;*

\*Correspondence: Tel: + (55) 32208950 Fax: +55 (55) 32208248

E-mail address: [marga@ccs.ufsm.br](mailto:marga@ccs.ufsm.br) (Margareth Linde Athayde)

Postal address: Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

### **Abstract**

Antioxidant capacity of the crude extract and fractions of *Tabernaemontana catharinensis* fruits and branches, Apocynaceae, was evaluated by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method and the content of polyphenols, flavonoids, alkaloids and condensed tannins were determined by the spectrophotometric method. The ethyl acetate fraction of the fruits and the butanol fraction of the branches showed IC<sub>50</sub> of 181.82 µg/mL and 78.19 µg/mL, respectively. In the analysis of these fractions by HPLC, it was possible quantify rutin (3.45 mg/g) in the ethyl acetate fraction and chlorogenic acid (8.96 mg/g) in the butanol fraction. The present study showed that these quantified compounds can contribute to the antioxidant capacity that was higher in the branches fraction than in the fruits fraction.

**Keywords:** *Tabernaemontana catharinensis*, Antioxidant Capacity, Apocynaceae.

### **1 Introduction**

Currently there is a great interest in finding natural antioxidants from plant materials. Numerous crude extracts and pure natural compounds from plants were reported to have antioxidant and radical-scavenging activities (Chang & Sung, 2008; Boligon et al., 2009). The use of these compounds, such as flavonoids and other phenolic compounds present in the most plants has been associated with a lower incidence of diseases related to the oxidative stress (Behera, Verma, Sonone & Makhija, 2008; Hajji et al., 2010), such as cancer, heart diseases and neurodegenerative diseases (Mustafa, Hamid, Mohamed & Bakar, 2010; Hajji et al., 2010).

*Tabernaemontana catharinensis* A. DC., Apocynaceae, (Syns. *Peschiera catharinensis* A. DC) has also been denoted as *Tabernaemontana affins*, *Tabernaemontana australis* and *Tabernaemontana hilariana* (Rates, Schapoval, Souza & Henriques, 1993; Soares, Pereira, Meireles & Saraiva, 2007), it is found in Argentina, Paraguay, Brazil and Bolivia (Leeuwenberg, 1994; Pereira et al., 2008). Popularly it is known as “jasmin” (jasmine), “leiteira de dois irmãos” (milkweed) and “casca- de- cobra” (snake skin) (Pereira, Leal, Sato & Meireles, 2005; Rates, Schapoval, Souza & Henriques, 1993). The tea or infusion of *T. catharinensis* is used in popular medicine as antiinflammatory (Pereira, 2003), antidote for snake bites, to relieve toothache, vermifuge and also to eliminate warts (Pereira, Leal, Sato & Meireles, 2005; Rates, Schapoval, Souza & Henriques, 1993). The essential oil of the plant leaves showed antioxidant activity (Boligon et al., 2012)

Many studies realized with plants resulted in the development of natural antioxidant formulations. However, there is not enough scientific information about antioxidant properties of various plants, especially those who are less used in medicine. So it is interesting and useful tasks find new sources of natural antioxidants. In this study, were determine the total amount of polyphenols, flavonoids, alkaloids and condensed tannins present in the crude extract and chloroform fraction (CRF), ethyl acetate fraction (EtAc) and n-butanol fraction (n-BuOH) of *T. catharinensis* fruits and branches. Simultaneously, HPLC/DAD was performed to identify which were the mainly phenolics compounds and to quantify them.

## 2 Results and discussion

The content of polyphenols, flavonoids, alkaloids and condensed tannins of the crude extract and its different fractions from the fruits and branches of *T. catharinensis* are shown in table S1 and S2, respectively.

The results showed that for fruits, the amount of polyphenols for CRF fraction was the highest one (311.52 mg GAE/g of fraction), followed by EtAc fraction and n-BuOH fraction. A similar tendency was not observed with the same fractions of branches, which showed that the EtAc fraction had the highest amount of polyphenols (397.94 mg GAE/g of fraction), followed by the n-BuOH fraction and the CRF fraction. In the crude extract of fruits and branches was observed that they had a lower polyphenol's content as compared with all the others fractions. Variations in the amount of polyphenol's in the different fractions may be attributed to the polarities of the

compounds presents in the plant (Hajji et al., 2010), phenolic compounds are usually extracted from the more polar fractions (Tian, Shi, Zhou, Ge & Upu, 2011), for this reason we found higher concentrations of these compounds in the EtAc and n-BuOH fractions from the branches.

As to the flavonoids, the results showed that the CRF fraction of branches of *T. catharinensis* had the highest amount of flavonoids (180.46 mg of rutin equivalents (RE)/g of fraction), followed by the EtAc fraction, n-BuOH fractions and the crude extract. However for fruits, the EtAc fractions had the highest amount of flavonoids (218.81 mg RE/g of fraction), followed by the CRF fraction, n-BuOH fraction and the crude extract.

The highest amount of alkaloids was found in the CRF fractions, for both parts of the plant, 179.10 mg of alkaloids/g of fraction in braches and 91.48 mg of alkaloids/g of fraction in fruits. Chloroform solvent is very used for the extraction of alkaloids, such as in studies performed by Pereira, Leal, Sato & Meireles (2005) and Rates, Cauduro, Moreno & Henriques (1988) with *T. Catharinensis*, explaining the large amount of alkaloids in this fraction.

The results showed that there is a small amount of condensed tannins in fruits and branches of this species. Studies performed by Wong, Lim, Abdullah & Nordin (2011) found tannins in methanol extracts of leaves of *Vallaris glabra*, Apocynaceae.

The DPPH radical scavenging capacity of samples were dose-dependent, and the branches obtained better antioxidant capacity (AC) than fruits. For fruits, it was observed that the more polar fractions, EtAc and n-BuOH, had higher scavenging capacity toward DPPH with the IC<sub>50</sub> values of 181.82 µg/mL and 188.24 µg/mL respectively (table S1), and these same fractions showed superiors amounts of flavonoids. Many studies have shown that the antioxidants compounds are more easily extracted by polar solvents due to the presence of hydroxyls (Mensor et al, 2001).

For branches, the n-BuOH fractions exhibited high scavenging activity toward DPPH with the IC<sub>50</sub> of 78.19 µg/mL, followed by the CRF fraction (table S2). This result cannot be associate to the polyphenol content and although the amounts of condensed tannins follow the same tendency of the AC, cannot be said that these are the main responsible for the AC, because they were found in small quantities. In addition, large quantities of alkaloids were found in the CRF fraction, which may have contributed in the great AC of this fraction, since it showed the second best IC<sub>50</sub> of 93.11 µg/mL.



The large variations of the AC may be related not only to the flavonoids contribution, but certainly is related to the presence of different types of flavonoids.

Generally, the AC of flavonoids is dependent of the structure and of the substitution pattern of hydroxyl groups. The essential requirement for an effective radical scavenging activity is the 3, 4-orthodihydroxy configuration in ring B and 4-carbonyl group in ring C, which has the better electron donating properties and a radical target. The presence of 3-OH group or 3 and 5 -OH groups, giving a catechol-like structure in ring C, which is also beneficial for the antioxidant activity of flavonoids. Removal of the 3-OH will affect the conformation of the molecule by the reduction of the number of OH group. The presence of C2-C3 double bond configured with a 4-keto arrangement was known to be responsible for electron delocalization from ring B and it increases the radical scavenging activity (Wojdy, Oszmiaski & Czemerzys, 2007; Mustafa, Hamid, Mohamed, & Bakar, 2010). Another important factor is the glycosylation in all these crucial positions hydroxyl influences the antioxidant activity of flavonoids such changes of the hydroxyl groups by glycosylation decreases the antioxidant activity. Flavonoids often occur as glycosides, glycosylation rendering the molecule less reactive to free radicals and more soluble in water (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1997).

Distinct association between the bioactive compounds and antioxidant capacity might be related to the presence of various active compounds in the plant, which resulted different trends of AC (Jayaprakasha & Patil, 2007; Mustafa, Hamid, Mohamed, & Bakar, 2010). Among the partitions, the more polar ones (AcEt and n-BuOH fraction) were those that generally had better AC. Consequently, the smaller AC was found in the less polar partitions, it was demonstrated in the different fractions of the fruits.

The AcEt fractions of the fruits and the CRF fraction of branches that showed good antioxidant capacity and more amounts of flavonoids were analyzed by HPLC (figure S1). In the AcEt fraction of the fruits was possible identify and quantify the rutin  $3.45 \pm 1.66$  mg/g of fraction, and in the CRF fraction of branches the quantity of chlorogenic acid was  $8.96 \pm 0.47$  mg/g of fraction. These quantified compounds can contribute positively for the antioxidant capacity of this species.

### **3 Conclusion**

The branches had higher antioxidant capacity than fruits. The EtOAc fraction of the fruits and the n-BuOH fraction of the branches showed higher antioxidant

capacities, these results may be related with the quantity, structure and with the substitution pattern of hydroxyl groups of flavonoids. Rutin, a glycoside of quercetin and Chlorogenic acid, both recognized as very active antioxidants may contribute with this capacity.

### Acknowledgements

The authors thank the financial support of CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development)/Brazil.

### References

- Behera, B.C., Verma, N., Sonone, A., Makhija, U., (2008). Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. *Bioresour. Technol.* 99, 776-784.
- Boligon A.A., Pereira R.P., Feltrin A.C., Machado M.M., Janovik V., Rocha J.B.T. & Athayde M.L. (2009). Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource Technology*, 100, 6592-6598.
- Boligon A.A., Schwanz T. G., Piana M., Bandeira R.V., Frohlich J. K., Brum T. F., Zadra M. & Athayde M. L. (*in press*, 2012) DOI:10.1080/14786419.2011.653971
- Chang, S.K. & Sung, P.M. (2008). Antioxidant activities of ethanol extracts from seeds in fresh Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) and wine processing wast. *Bioresource Technology*, 99, 4503-4509.
- Hajji M., Jarraya R., Lassoued I., Masmoudi O., Damak M., Nasri M. (2010). GC/MS and LC/MS analysis, and antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts from *Mirabilis jalapa* tubers. *Process Biochemistry*, 45, 1486-1493.
- Jayaprakasha G.K. & Patil B.S. (2007). In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chemistry*, 101, 410-418.
- Leeuwenberg, A. J. M. *A revision of Tabernaemontana. The new world species and Stemmadenia*, The Royal Botanic Gardens: Kew, 1994.
- Mensor L.L., Menezes F.S., Leitão G.G., Reis A.S., Santos T.C., Coube C.S. & Leitão S.G. (2001) Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15, 27-30.

- Mustafa R.A., Hamid A.A., Mohamed S. & Bakar F.A. (2010) Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 Selected Tropical Plants. *Journal of food science*, 75(1), 28-30.
- Pereira, C.G. (2003). SFE of pharmacological compounds from *Tabernaemontana catharinensis*: analysis of the antioxidant and antimycobacterial activity. *Proceedings of 6<sup>th</sup>. Int. Symp. on Supercritical Fluids*, Versailles (frança), 2003.
- Pereira P.S., França S.C., Oliveira P.V.A., Breves C.M.S., Pereira S.I.V., Sampaio S.V., Nomizo A. & Dias D.A. (2008). Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and *in vitro* cytotoxicity. *Quim. Nova*, 31(1), 20-24.
- Pereira C.G., Leal P.F., Sato D.N. & Meireles, M.A.A. (2005) Antioxidant and antimycobacterial activities of *Tabernaemontana catharinensis* extracts obtained by supercritical CO<sub>2</sub> + cosolvent. *Journal of medicinal food*, 8(4) 533-538.
- Rates S.M.K., Cauduro A.D. Salazar V., Moreno P.R.H. & Henriques, A.T. (1988). Alcalóides indólicos em *Peschiera australis* (Muell. Arg.) Miers. Var. *australis*. *Caderno de Farmácia*, 4, (1/2), 51-62.
- Rates S.M.K., Schapoval E.E.S, Souza I.A., Henriques A.T. (1993). Chemical constituents and pharmacological activities of *Peschiera australis*. *Int J Pharmacogn*, (31)288-294.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. & Paganga G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2 (4), 152-159.
- Soares D.C., Pereira C.G., Meireles M.A.A. & Saraiva E.M. (2007). Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. *Parasitology International*, 56, 135-139.
- Tian S., Shi Y., Zhou X., Ge L. & Upu H. (2011). Total polyphenolic (flavonoids) content and antioxidant capacity of different *Ziziphora clinopodioides* Lam. Extracts. *Pharmacognosy Magazine*, 7, 65-68.
- Wojdyło A., Oszmiński J. & Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, 940-949.
- Wong S.K., Lim Y.Y., Abdullah N.R. & Nordin F.J. (2011). Assessment of antiproliferative and antiplasmodial activities of five selected Apocynaceae species. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(3), 1-8.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

### Phytochemical analyzes and antioxidant capacity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. fruits and branches.

Mariana Piana<sup>a</sup>, Aline Augusti Boligon<sup>a</sup>, Thiele Faccim de Brum<sup>a</sup>, Marina Zadra<sup>a</sup>, Janaína Kieling Frohlich<sup>a</sup>, Amanda Luana Forbrig Froeder<sup>a</sup>, Alexandra Augusti Boligon<sup>b</sup>, Margareth Linde Athayde<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*Phytochemical Research Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil;*

<sup>b</sup>*Adjunct Professor, Federal University of the Pampa, Campus São Gabriel, Av. Antonio Trilha, 1847. 97300-000;*

\*Correspondence: Tel: + (55) 32208950 Fax: +55 (55) 32208248

E-mail address: marga@ccs.ufsm.br (Margareth Linde Athayde)

Postal address: Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

#### Abstract

Antioxidant capacity of the crude extract and fractions of *Tabernaemontana catharinensis* fruits and branches, Apocynaceae, was evaluated by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method and the content of polyphenols, flavonoids, alkaloids and condensed tannins were determined by the spectrophotometric method. The ethyl acetate fraction of the fruits and the butanol fraction of the branches showed IC<sub>50</sub> of 181.82 µg/mL and 78.19 µg/mL, respectively. In the analysis of these fractions by HPLC, it was possible quantify rutin (3.45 mg/g) in the ethyl acetate fraction and chlorogenic acid (8.96 mg/g) in the butanol fraction. The present study showed that these quantified compounds can contribute to the antioxidant capacity that was higher in the branches fraction than in the fruits fraction.

**Keywords:** *Tabernaemontana catharinensis*, Antioxidant Capacity, Apocynaceae.

## EXPERIMENTAL

### Chemicals

All chemicals were of analytical grade. The solvents for the extractions and analytical procedures as chloroform, ethyl acetate, ethanol, n-butanol, gallic acid, chlorogenic acid and a spectrophotometric grade methanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Folin–Ciocalteu reagent 2 N, DPPH radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), rutin and catechin were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis,

MO, USA). All others chemicals and reagents were purchased locally and were of analytical grade.

### **Plant collection and extractions**

Branches and fruits of *T. catharinensis* were collected in São Miguel (Rio Grande do Sul, south state of Brazil) in December/2009. A dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria (SMBD 12.355). The branches of the plant were dried at room temperature and chopped in a knife mill. The chopped branches and fruits *in natura* were macerated separately at a room temperature with ethanol 70% for a week with daily shake-up, the solvent was renewed for four weeks. After filtration, both extracts were evaporated under reduced pressure to remove the ethanol. Each extract was suspended in water and partitioned successively with chloroform, ethyl acetate and n-butanol (3 x 200 mL for each solvent).

### **Analysis of polyphenols, flavonoids, alkaloids and condensed tannins and antioxidant capacity**

The analysis of the crude extract and of the different fractions of fruits and branches of *T. catharinensis* were performed in a Shimadzu UV-1201 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) in triplicate.

#### **Polyphenols analysis**

The polyphenols contents were determined by the Folin-Ciocalteu method, described by Chandra & De Mejia (2004). The absorbance was 730nm, measured in spectrophotometer. The data were expressed in mg gallic acid equivalent (GAE) per g of each fraction, based on the calibration curve of gallic acid.

#### **Flavonoid analysis**

The flavonoid content was determined by the reaction with aluminum chloride using the method described by Woisky & Salatino (1998). The absorbance was 420nm, measured in spectrophotometer. The data was calculated based on calibration curve of rutin and expressed in mg equivalents of rutin (RE) per g of each fraction.

#### **Condensed tannins analysis**

Condensed tannins were determined by Morrison's method, Asiedu, Stuchbury & Powell (1995) which uses vanillin as a reagent. The absorbance was 500nm, measured in spectrophotometer. The data were expressed in mg catechin equivalent (CE) per g of each fraction, based on calibration curve of catechin.

### **Alkaloids analysis**

Alkaloids were determined by reaction of precipitated with dragendorff's reagent, described by Sreevidya & Mehrotra (2003). The absorbance was 435nm, measured in spectrophotometer. The data was calculated based on calibration curve of Bismuth nitrate and expressed in mg of alkaloids per g of each fraction.

### **Radical-scavenging capacity – DPPH assay**

The antioxidant capacity was evaluated following the method described by Choi et al. (2002). The Spectrophotometric analysis was used in order to determine the inhibition concentration (IC<sub>50</sub> - concentration which gives 50% inhibition) of the crude extract and fractions. Six different ethanol dilutions of the crude extract and fractions (2.5 mL), at 250; 125; 62.5; 31.25; 15.62 and 7.81µg/mL were added to 1.0 mL of a 0.3 mM DPPH ethanol solution. The absorbance was measured at 518 nm by spectrophotometer against a blank after 30 min of reaction at room temperature. DPPH solution (1.0 mL) plus ethanol (2.5 mL) was used as a control. IP% (percentage of inhibition) was plotted against sample concentration, and a linear regression curve was established in order to calculate the IC<sub>50</sub>.

### **HPLC system for analysis of chlorogenic acid and rutin**

The identifications and assays of chlorogenic acid and rutin were performed using the method described by Evaristo & Leitão (2001) slightly modified. High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), Prominence Auto-Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20 AT reciprocating pumps connected to the degasser DGU 20A5 with integrator CBM 20A, UV-VIS detector DAD SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1. Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient, conditions using a C-18 column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles; the mobile phase A was water containing 2.0% acetic acid and mobile phase B was methanol. The mobile phase was filtered through a 0.45 µm membrane filter and

then degassed by an ultrasonic bath prior to use. Standard reference solutions of chlorogenic acid and rutin were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.00625 – 0.250 mg/mL and 0.0031 – 0.250mg/mL, respectively. The AcEt fraction of the fruits and CRF fraction of the branches was also dissolved in the mobile phase. All solutions and samples were first filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore). The chromatographic peaks were confirmed by comparing their retention time and Diode-Array-UV spectra with those of the reference standards. Isolated compound was quantified at 327 nm and 356nm, respectively. The flow rate was 0.8 mL/min and the injection volume was 40µl. All chromatographic operations were carried out at room temperature and in triplicate.

### Statistical analysis

One-way ANOVA followed by Tukey test were performed in the total phenolics, flavonoids, alkaloids, condensed tannins and DPPH assays. Statistical *p* values were calculated to quantify levels of significance for each treatment type. A significant *p* value ( $p < 0.001$  when appropriate) means that there exists significant difference between the two sets of data being analyzed.

### References

- Chandra S. & De Mejia E.G. (2004). Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguayensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 3583-3589.
- Choi, C.W., Kim S.C., Hwang S.S., Choi B.K., Ahn H.J., Lee M.Y., Park S.H. & Kim S.K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparison. *Plant Science*, 163, 1161-1168.
- Evaristo I.M. & Leitão M.C. (2001). Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fracção fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L. *Silva Lusitana*, 9(2), 135-141.
- Morrison, I.M., Asiedu, E.A., Stuchbury, T. & Powell, A.A. (1995). Determination of lignin and tannin contents of Cowpea seed coats. *Annals of Botany*, 76, 287-290.

- Sreevidya, N. & Mehrotra, S. (2003). Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with dragendorff's reagent in plant materials. *Journal of AOAC International*, 86(6), 1124-1127.
- Woisky, R.G. & Salatino, A. (1998). Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal Apicultural Research*, 37(2), 99 - 105.



Table S1 - IC<sub>50</sub> and total of polyphenols, flavonoids, alkaloids and condensed tannins in the crude extract and in the fractions of fruits of *T. catharinensis*.

Fractions and crude extract	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Polyphenols (mg GAE/g dry extract)	Flavonoids (mg QE/g dry extract)	Alkaloids (mg of alkaloids/g dry extract)	Condensed tannins (mg CE/% g dry extract)
CRF	266.55 $\pm$ 1.57 a	311.52 $\pm$ 0.9 a	154.73 $\pm$ 1.74 a	91.48 $\pm$ 1.77 a	3.11 $\pm$ 0.40 a
EtAc	181.82 $\pm$ 1.05 b	221.12 $\pm$ 1.64 b	218.81 $\pm$ 1.08 b	18.44 $\pm$ 1.92 b	5.51 $\pm$ 0.40 b
n-BuOH	188.24 $\pm$ 0.68 b	111.97 $\pm$ 0.09 c	119.07 $\pm$ 1.30 a	16.41 $\pm$ 0.72 b	0.53 $\pm$ 0.67 c
Crude extract	1155.91 $\pm$ 0.64 c	71.03 $\pm$ 0.2 d	41.30 $\pm$ 1.08 c	6.84 $\pm$ 1.58 c	1.42 $\pm$ 0.68 ac

Results are expressed as mean of three determinations  $\pm$  RSD (relative standard deviation); averages followed by different letters in each column differ by Tukey test at  $p < 0.001$ .

Table S2 - IC<sub>50</sub> and total of polyphenols, flavonoids, alkaloids and condensed tannins in the crude extract and in the fractions of the branches of *T. catharinensis*.

Fractions and crude extract	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Polyphenols (mg GAE/g dry extract)	Flavonoids (mg QE/g dry extract)	Alkaloids (mg of alkaloids/g dry extract)	Condensed tannins (mg CE/% g dry extract)
CRF	93.11 $\pm$ 1.55 a	191.50 $\pm$ 2.0 a	180.46 $\pm$ 1.77 a	170.10 $\pm$ 1.53 a	2.66 $\pm$ 0.25 ab
EtAc	106.27 $\pm$ 1.18 a	397.94 $\pm$ 1.39 b	163.51 $\pm$ 1.44 b	29.57 $\pm$ 1.27 b	2.33 $\pm$ 0.40 ab
n-BuOH	78.19 $\pm$ 0.54 b	248.70 $\pm$ 1.92 c	156.28 $\pm$ 1.71 b	58.20 $\pm$ 1.02 c	3.10 $\pm$ 0.17 a
Crude extract	202.17 $\pm$ 1.5 c	42.47 $\pm$ 1.41 d	39.54 $\pm$ 1.17 c	11.02 $\pm$ 1.99 d	1.67 $\pm$ 0.98 b

Results are expressed as mean of three determinations  $\pm$  RSD (relative standard deviation); averages followed by different letters in each column differ by Tukey test at  $p < 0.001$ .

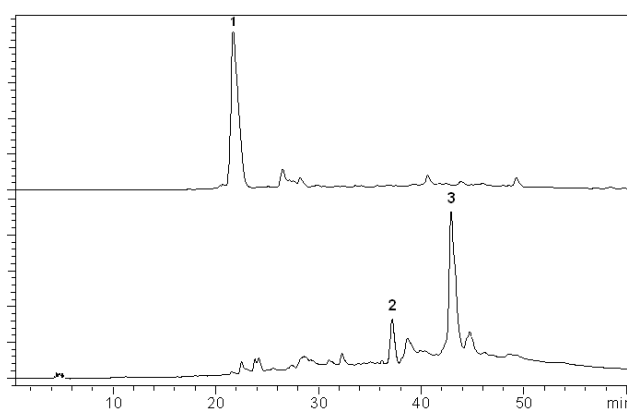


Figure S1 - HPLC analysis' of chlorogenic acid of the CRF fractions of the branches (1) and of the rutin of the EtAC fraction of the fruits (2), (3) unknown peak.

**MANUSCRITO 2** – Submetido ao Journal of Chromatographic Science

**Analysis of rutin in *Viola tricolor's* extract and gel**

Mariana Piana, Marina Zadra, Thiele Faccim de Brum, Aline Augusti Boligon, Adiene Fernandes Kieling Gonçalves, Ritiel Correa da Cruz, Gizele Scotti do Canto, Margareth Linde Athayde



### Analysis of rutin in *Viola tricolor*'s extract and gel

Journal:	<i>Journal of Chromatographic Science</i>
Manuscript ID:	JCS-12-261
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	20-Jun-2012
Complete List of Authors:	Piana, Mariana; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy Zadra, Marina; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy de Brum, Thiele; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy Boligon, Aline; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy Gonçalves, Adiene; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy da Cruz, Ritiel; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy do Canto, Gizele; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy Athayde, Margareth; Federal University of Santa Maria, Industrial Pharmacy
Keyword:	<i>Viola tricolor</i> L, rutin, HPLC validation, salicylic acid

## Analysis of rutin in *Viola tricolor*'s extract and gel by HPLC

Mariana Piana<sup>a</sup>, Marina Zadra<sup>a</sup> Thiele Faccim de Brum<sup>a</sup>, Aline Augusti Boligon<sup>a</sup>,  
Adiene Fernandes Kieling Gonçalves<sup>a</sup>, Ritiel Correa da Cruz<sup>a</sup>, Gizele Scotti do Canto<sup>b</sup>,  
Margareth Linde Athayde<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Phytochemical Research Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil;*

<sup>b</sup>*Pharmacotechnics Research Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build. 26, room 1141, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil;*

\*Correspondence: Tel: + (55) 32208950 Fax: +55 (55) 32208248

E-mail address: [marga@ccs.ufsm.br](mailto:marga@ccs.ufsm.br) (Margareth Linde Athayde)

Postal address: Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

### Abstract

Heartsease, also known as wild pansy (*Viola tricolor* L.). This study investigates the phytoconstituents, antioxidant capacity and validates a method for quantification of rutin in the crude extract of the flowers of *V. tricolor* and in the extract incorporated in gel by HPLC. The extract contains considerable amounts of polyphenols,  $109.32 \pm 1.29$  mg of GAE/g of extract, similar antioxidant capacity were found by DPPH method (IC<sub>50</sub> of  $16.00 \pm 0.78$  µg/mL) compared with the standard ascorbic acid (IC<sub>50</sub> of  $16.57 \pm 0.95$  µg/mL), these excellent results may be due to the amounts of polyphenols, flavonoids and condensed tannins. HPLC method for quantification of rutin in the extract and in gel has been linear, sensitive, precise, specific, accurate and robust. These validated method can be used to control the quality of the extract and of the gel.

**Keywords:** *Viola tricolor* L., rutin, HPLC validation, salicylic acid.

## Introduction

Heartsease, also known as wild pansy (*Viola tricolor* L., Violaceae), has a long history in phytomedicine (1). The therapeutic activity of pansy has been identified in treating various skin conditions, such as eczema, seborrhea, impetigo, and acne (2).

Wild pansy contains 0.3% of salicylic acid and its derivatives such as the methyl ester and violutoside (the glucosidoarabinoside of salicylic acid methyl ester); phenol carboxylic acids such as trans-caffeic acid, protocatechuic acid, p-coumaric acid; 10% of mucilages (made up of glucose (35%), galactose (33%), arabinose (18%), and rhamnose (8%)); 2.4-4.5% of tannins, flavonoids (rutin, violanthin, scoparin, saponaretin, orientin, vicenin, anthocyanidin glycosides); carotenoids (violaxanthin and four geometrical isomers, zeaxanthin, etc.); coumarins: umbelliferone; small amounts of saponins; ascorbic acid and tocopherol. The salicylates and rutin contained in the plant are anti-inflammatory (2).

In the form of plant extracts, flavonoids have been used in dermatology and cosmetics for a long time (3). The main reason of increasing popularity of these substances is their beneficial biochemical activity and the main factor affecting activity of flavonoids in the skin is their skin penetration ability (4). The available data indicate that the compounds of this group permeate through the stratum corneum and can reach the viable layers of the epidermis and dermis (3)

The worldwide trends to standardize extracts by fast and efficient techniques as chromatographic and spectrometric, with the purpose of determining the substances usually present, responsible for cosmetic activity, even in small concentrations (5).

Two basic factors determine the composition of an extract: the quality of plant material and the process of production (6). The standardization of plant extracts should

be performed in order to know the contents of one or more constituents (7). The increasing demand for safe and effective products has required of the scientific community more complex studies and the use of more efficient techniques to determine the stability. The immense Brazilian biodiversity led to the development of several products, in different forms, which complicates, even further the standardization of experimental protocols to certify the stability of these preparations (8).

The development and validation of an efficient analytical method is an integral part of the quality control of the source material, in order to guarantee the safety and effectiveness of the resulting compound (9). This study investigates the phytoconstituents and the antioxidant capacity, besides the validation of a method for quantification of rutin in the crude extract of the flowers of *V. tricolor* and in the extract incorporated in gel. A HPLC with UV detection was used, the validation followed characteristics of precision, linearity, limit of detection, quantification, specificity, accuracy and robustness.

## **Experimental**

### **Reagents**

All reagents used in this study were of analytical grade. Ethanol, methanol, vanillin, gallic acid, salicylic acid and the spectrophotometric grade methanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Folin-Ciocalteu reagent, DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), rutin and catechin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All the other chemicals and reagents were of analytical grade and purchased locally. The chemicals used in the formulation were kindly provided by the pharmacotechnic laboratory of the University Federal of Santa Maria.

## **Methods**

### **Collection and extraction of plant**

The flowers of *V. tricolor* were collected in the city of Gaurama (Rio Grande do Sul, south Brazil) between September and November of 2009. A dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria (SMBD 12.958). The flowers were dried in stove (temperature < 40° C) and chopped in a knife mill. The chopped flowers were macerated at a room temperature with ethanol 70% during a week, with daily shake-up, the solvent was renewed for four weeks. After filtration, the extract hydroalcoholic was evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator to remove the ethanol. The aqueous extract was dried in stove (temperature above 40°C) getting the crude extract.

### **Analysis of polyphenols, flavonoids, condensed tannins, alkaloids and the antioxidant capacity in the crude extract of the *V. Tricolor* flowers**

The analysis was performed in a Shimadzu UV-1201 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan)

#### *Polyphenols*

The polyphenol content was measured by Folin-Ciocalteu method described by Chandra and Mejia (10). The volume of 0.5 mL of 2 N Folin–Ciocalteu reagent was added in 1 mL of the sample. This blend was allowed to stand for 5 min before the addition of 2 mL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%. The solution was left standing during 10 min before reading, at 730

nm. The data was expressed in mg of gallic acid equivalent (GAE) per g of crude extract, based on the calibration curve of gallic acid.

#### *Flavonoids*

The flavonoids content was determined by the reaction with aluminum chloride using the method described by Woisky and Salatino (11). The volume of 0.5 mL of AlCl<sub>3</sub> 2% solution was added in 1 mL of the sample. After 15 minutes, the absorbance was read, at 420 nm. The data was calculated based on the calibration curve of rutin and expressed in mg equivalents of rutin (RE) per g of crude extract.

#### *Condensed tannins*

Condensed tannins were determined by the vanillin method described by Morrison et al. (12), slightly modified. The volume of 0.1 mL of a extract solution (25mg/mL of concentration) was pipetted into a test tube, after that 0.9 mL methanol was added. Vanillin reagent (2.5 mL equal volumes of 1 g of vanillin in 100 mL methanol and 8 mL concentrated HCl in 100 mL methanol) was added. The test tubes were placed in a water bath for 20 min. The absorbance was read at 500nm. The data were expressed in mg catechin equivalent (CE) per g of crude extract, based on the calibration curve of catechin.

#### *Alkaloids*

The alkaloids were determined by the precipitation reaction with Dragendorff's reagent, described by Sreevidya and Mehrotra, (13). Briefly describing, 5 mL of the solution of the extract was taken, the pH was kept between 2 and 2.5 with diluted HCl, 2 mL of Dragendorff's reagent was added and the precipitate formed was centrifuged. After that,



the precipitate was washed with alcohol, the filtrate was discharged and the residue was treated with 2 mL of a disodium sulfide solution, the brownish black precipitate formed was then centrifuged. The residue was dissolved in 2 mL of a concentrated nitric acid, this solution was diluted in 10mL of distilled water. In 1 mL of this solution was added 5 mL of thiourea solution. The absorbance was measured at 435nm, the data were calculated based on the calibration curve of bismuth nitrate and expressed in mg of alkaloids per g of crude extract.

#### *Radical scavenging capacity – DPPH assay*

The antioxidant capacity was evaluated according to a slightly modified method, previously described by Choi et al. (14). Spectrophotometric analysis was used in order to determine the inhibition concentration ( $IC_{50}$  - concentration which gives 50% inhibition) and the inhibition percentage (IP%) of the crude extract. Six different ethanol dilutions of the extract, 2.5 mL at 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 and 7.81  $\mu\text{g/mL}$  were mixed with 1.0 mL of a 0.3 mM DPPH ethanol solution. The absorbance was measured at 518nm in spectrophotometer against a blank after 30 min of reaction at room temperature. A DPPH solution (1.0 mL, 0.3 mM) plus ethanol (2.5mL) was used as a control. The same was performed with standard ascorbic acid under the same experimental conditions. Inhibition of DPPH autoxidation in percent (IP%) was calculated according to the Equation 1.

$$IP\% = 100 - [(ABS\ SAMPLE - ABS\ BLANK) / ABS\ CONTROL] \times 100 \quad (1)$$

The *ABS SAMPLE* is the absorbance of the test compound, *ABS BLANK* is the absorbance of the blank and the *ABS CONTROL* is the absorbance of the control

reaction (containing all reagents except the test compound). IP% was plotted against sample concentration, and a linear regression curve was established in order to calculate the IC<sub>50</sub>.

### **Analysis in HPLC**

Analysis in HPLC was utilized with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), Prominence Auto-Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20 at reciprocating pumps connected to the degasser DGU 20A5 with integrator CBM 20A, UV-VIS detector DAD SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1. The mobile phases and all solutions and samples were filtered through a membrane filter (Millipore, Bedford, USA), 0.45 µm, and then degassed by an ultrasonic bath before use. The quantification was carried out by integration of the peaks using the external standard method. The chromatographic peaks were confirmed by comparing their retention time and Diode-Array-UV spectra with those of the reference standards. All chromatographic operations were carried out at room temperature and in triplicate.

### **Analysis of salicylic acid in extract**

The analysis of salicylic acid was performed using the method described by British Pharmacopoeia, (15) slightly modified. For quantification of salicylic acid, reverse phase chromatographic analyses was carried out in isocratic conditions using Shimadzu C-18 column (4.6 mm x 150 mm) packed with 5 µm diameter particles. The mobile phase was water-methanol (60:40, v/v) containing 1% Glacial acetic acid (v/v). The salicylic acid was quantified at 300nm; injection volume was 40µl and the flow rate was 1 mL/min.

### **Validation method for quantification of rutin in plant extract**

The method was validated according to the Guidelines of International Conference on Harmonization (16).

*Preparation of standard solution:* A rutin reference standard solution was prepared in methanol-water (1:1, v/v). Standard calibration solutions at seven levels were prepared by serial diluting of a stock solution at concentrations of 10 - 700  $\mu\text{g/mL}$ .

*Test solution of the extract:* Amount of 0.05 g of the extract was weighed in a flask, methanol-water (1:1, v/v) solution was added to 10 mL, and the solution was placed in an ultrasonic bath during 15 min.

*Chromatographic conditions:* For the quantification of rutin, reverse phase chromatographic analyses were carried out under isocratic conditions using a *Shimadzu* C-18 column (4.6 mm x 150 mm) packed with 5  $\mu\text{m}$  diameter particles; the mobile phase was water-methanol (1:1, v/v) containing 0.002% (v/v) phosphoric acid. The rutin was quantified at 356nm; injection volume was 20 $\mu\text{l}$  and the flow rate was 1 mL/min.

*Specificity:* The specificity defined as the ability of the method to measure the analyte accurately and specifically in the presence of components in the sample matrix, was determined by analysis of chromatograms of the standard solution and the sample solutions. Photodiode-array detector described was employed to compare the sample and the reference standard profile.

*Linearity and range:* The linearity between peak area and concentration was analyzed using three calibration curves obtained with standard solutions of rutin at eight different concentrations each, 10 - 700  $\mu\text{g/mL}$ . The data for peak area *versus* rutin concentration were treated by linear regression analysis. The range was obtained from standard linear curve.

*Sensitivity:* The limit of detection (LOD) and the limit of quantization (LOQ) were determined from the calibration curves of the rutin standard. LOD was calculated

according to the expression  $3\sigma/S$ , where  $\sigma$  is the standard deviation of the response and  $S$  is the slope of the calibration curve. LOQ was established by using the expression  $10\sigma/S$  (16).

*Accuracy:* The accuracy was evaluated by means of recovery tests carried out by adding known amounts (18%, 25% and 33% of rutin reference standard) in the sample, at three different levels, three solutions each in triplicate. The percent recovery was determined by comparing the results of the analyses of the fortified samples.

*Precision:* The test of repeatability was carried out using eight samples, in the same concentrations, and same day. For the intermediate precision, the same experiment was conducted in another day. The relative standard deviation (RSD) was used as statistic parameter.

*Robustness:* The robustness of a method is its ability to remain unaffected by small deliberate variations in method and was evaluated by changing of the mobile phase pH and flow rate, in triplicate.

### **Method validation for quantification of rutin in gel**

The gel was prepared by utilizing Natrosol QP 400H (Farmaquímica<sup>®</sup>), EDTA (Proquimios<sup>®</sup>), Nipagin (Belga<sup>®</sup>) and the extract of *V. tricolor*. The method was validated according to the guidelines of International Conference on Harmonization (16). The chromatographic conditions and parameters sensitivity, precision and robustness were the same used in the validation method for quantification of rutin in the extract.

*Preparation of standard solution:* A rutin reference standard stock solution was prepared in methanol-water (1:1; v/v). Calibration standard solutions at seven levels were prepared by serially diluting the stock solution to concentrations of 5 - 400  $\mu\text{g/mL}$ .

*Test solution of the gel:* Amount of 1 g of the gel was weighed in a flask, methanol-water, (1:1, v/v) solution was added to 10 mL, and the solution was placed in an ultrasonic bath during 60 min.

*Linearity and range:* The linearity between peak area and concentration was analyzed using three calibration curves obtained with standard solutions of rutin at seven different concentrations each, 5 - 400 µg/mL. The data for peak area *versus* rutin concentration were treated by linear regression analysis. The range was obtained from standard linear curve.

*Specificity:* The specificity was determined by analysis of chromatograms of sample solutions of the gel without extract, with the purpose to verify the absence of gel interferences.

*Accuracy:* The accuracy was evaluated by means of recovery tests carried out by adding known amounts (4%, 8% and 16% of rutin reference standard) in the sample, at three different levels, three solutions each in triplicate. The percent recovery was determined by comparing the results of the analyses of the fortified samples.

## **Results and discussion**

Several extracts have antioxidant capacity, among the compounds found in extracts, flavonoids and other phenolic substances play an important role (17). The result of the phytochemical analysis is presented in Table I and it revealed the presence of active constituents. The quantity of polyphenols found was 109.32 mg of GAE/g and flavonoids 99.40 mg of RE/g, showing that most of the polyphenols existent in the extract are flavonoids. Vukics et al., (18), also found considerable quantities of flavonoids in this species by the method of the European Pharmacopoeia.

Similar antioxidant capacity was found for the extract of flowers of *V. tricolor* compared with the standard ascorbic acid (figure I). The DPPH radical scavenging capacity of samples were dose-dependent, and the IC<sub>50</sub> values was of 16.57± 0.78 µg/mL for the standard ascorbic acid and 16.00 ± 0.95 (SD)µg/mL for the extract of the flowers, these excellent results may be due to the amounts of polyphenols and flavonoids found in extract. Vukics et al., (18) found a positive correlation between the amounts of flavonoids and antioxidant capacity in this species. Results from study by Mustafa et al., (19) suggested that phenolic compounds, in particular, the flavonoids, are the major contributor to the antioxidant capacity of the plants tested and consequently, can be utilized in the development of functional ingredients with potent antioxidants properties for commercial exploration.

Considerable quantities of condensed tannins were found, 10.83 mg of CE/g, superior to the results of Rimkienė et al., (2) that found amounts ranging from 1.3 to 4.5% tannin, between 1995 and 2002. In vitro tests of extracts rich in tannins showed bactericidal and fungicidal activity, inhibition of lipid peroxidation and free radical scavenging. They also can help in the healing process of wounds, burns and in the inflammation process, by the formation of a protective layer (tannin-protein complex) in the damaged skin (20). Additionally, quantities of 5.73 ± 0.45 mg of salicylic acid/100g of extract were found (figure II). Studies by Toiu et al., (22) encountered higher quantities of this metabolite in the aerial parts of this plant. Salicylic acid also has anti-inflammatory and antibacterial properties (23).

So far, the literature had only qualitative data about the existence of alkaloids in *V. tricolor* (21), in our study we found small amounts of alkaloids, 0.55 mg of alkaloids/g, therefore, is probable that this metabolite has little influence on the therapeutic effect and antioxidant capacity of this species.

The various phytochemicals present in plants have been reported to possess great potential in treatment of various diseases. These constituents act directly in activities like antioxidant, anti-inflammatory and anti-microbial (24). The compounds found as polyphenols, flavonoids, tannins and salicylic acid, make this species a promise for the development of formulations and to ensure the quality of the extract and of the gel, appropriate analytical methods must be established. Rutin is one of the constituents of the flowers of this species, so it was used as a marker to evaluate the quality of the extract and of the gel.

The validation method for the quantification of rutin in the extract showed linearity and sensitivity between the concentrations of 10 - 700  $\mu\text{g/mL}$ , as shown in table II. The results of the relative standard deviation (RSD) obtained from the analyses of precision in extract were of 0.26 and for the intermediate precision of 0.86. The results were satisfactory because the RDS was less than 2. Analysis of the chromatogram of the sample by means of photodiode-array detector indicated the specificity of the method (data not shown). The accuracy was determined by analyzing a sample of known concentration and comparing the measured value with the true value, using the method of standard addition. The table III shows the results for accuracy expressed as the percentage of recovery and RSD, the method showed adequate accuracy.

There was no relevant change when the mobile phase pH and flow rate were modified, this shows the robustness of the method, under the conditions evaluated.

Our results showed higher amounts of rutin, 79.16 mg/g of rutin in extract (figure II). Vuckis et al., (18) found as the main constituent of the flowers of *V. tricolor* the flavonoids rutin and its concentration found in studies by Vuciks et al., (1) was 420  $\mu\text{g/g}$  rutin, this difference may be due to differences in soil, climate, time of collection, and parts of plant analyzed.

The same way, the results of linearity and sensitivity of the validation method for quantification of rutin in gel were adequate in the concentration range of 5 - 400  $\mu\text{g/mL}$  as shown in table IV. The results obtained for the analyses of precision in gel were RSD of 0.75 and for the intermediate precision obtained RSD of 0.07. The absence of interferences in the chromatograms of the samples of the gel without the extract at 356 nm confirmed the specificity of the method (data not shown). The results for the accuracy of the method are shown in Table V and were considerate adequate. There was no relevant change when the mobile phase pH and flow rate were modified, this shows the robustness of the method. Additionally, it was observed that the sonication time of 45 minutes was ineffective for complete extraction of rutin from the gel, because the method indicated quantities of  $209.94 \pm 0.11\text{mg}$  of rutin/ 100 g of gel (below of 90% ). On the other hand, after 60 min of sonication the gel presented 233 mg of rutin/ 100 g of gel (figure IV).

## **Conclusion**

*V. tricolor* presents a considerable amount of polyphenols and flavonoids, large amounts of rutin that contribute to the antioxidant capacity of this species, constituents such as condensed tannins, alkaloids and salicylic acid which may also help in this capacity. The proposed method for quantification of rutin in the extract and in gel has been linear, sensitive, precise, specific, accurate, and robust. This validated method can be used to the quality control of the extract and the gel.

## **Acknowledgements**



The authors thank the financial support of CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development)/Brazil.

## References

1. Vukics, V. et al.; Quantitative and qualitative investigation of the main flavonoids in heartsease (*Viola tricolor* L.). *Journal of Chromatographic Science*, (2008); 46: 97 - 101.
2. Rimkienė, S., Ragazinskienė, O. and Savickienė, N; The cumulation of Wild pansy (*Viola tricolor* L.) accessions: the possibility of species preservation and usage in medicina, *Medicina*, (2003); 39: 411 - 416.
3. Merfort, I., Heilmann, J., Hagedorn-Leweke, U. and Lippold, B.C.; In vivo skin penetration studies of chamomile flavones; *Pharmazie*, (1994); 49: 509 - 511.
4. Arct, J., Oborska, A., Mojski, M., Binkowska, A. and Swidzikowska, B.; Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids; *International Journal of Cosmetic Science*, (2002); 24: 57 - 66.
5. Jácome, R.L.R., Oliveira, A.B., Raslan, D.S., Müller, A. and Wagner H.; Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria montana* M. (Bolsa-de-pastor); *Química Nova*, (1999); 22: 175 - 177.
6. Schulz, V., Hänsel, R. and Tyler, V. *Fitoterapia racional: Um guia para as ciências da saúde*, editora Manole, Barueri, SP, (2002).
7. *Brazilian Pharmacopoeia*. Atheneu, São Paulo, SP (2001).
8. Isaac, V.L.B., Cefali, L.C., Chiari, B.G., Oliveira, C.C.L.G., Salgado, H.R.N. and Corrêa, M.A.; Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de

- fitocosméticos; *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, (2008); 29: 81- 96.
9. Hefnawy, M.M., Sultan, M.A and Al-shehri, M.M; Direct enantiomeric resolution of betaxolol with application to analysis of pharmaceutical products; Mohamed M. *Analytical Chemistry Insights*, (2006); 1: 13 - 20.
  10. Chandra, S. and De Mejia, E. G. ; Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparision to Mate (*Ilex paraguaiensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas; *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, (2004); 52: 3583 - 3589.
  11. Woisky, R. G. and Salatino, A.; Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control; *Journal Apicultural Research*, (1998); 37: 99 - 105.
  12. Morrison, I.M., Asiedu, E.A., Stuchbury, T. and Powell, A.A.; Determination of lignin and tannin contents of *Cowpea seed coats*; *Annals of Botany*, (1995); 76: 287 - 290.
  13. Sreevidya, N. and Mehrotra, S.; Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials; *Journal of AOAC International*, (2003); 86: 1124 - 1127.
  14. Choi, C.W. et al.; Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparision; *Plant Science*, (2002); 163: 1161 - 1168.
  15. British Pharmacopoeia. Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances, (2009).
  16. ICH, Harmonised tripartite guideline, Validation of analytical procedures: text and methodology, 2005.

17. Hinneburg, I., Mrestani, Y. and Neubert, R. H. H.; Development and application of a CE method for quantification of phenolic compounds in extracts from buckwheat herb and in semi-solid formulations containing the extracts; *Chromatographia*, (2004); 59:591 - 594.
18. Vukics, V.; Kery, A. and Gutfman, A.; Analysis of polar antioxidants in heartsease (*Viola tricolor* L.) and Garden Pansy (*Viola x wittrockiana* Gams.). *Journal of Chromatographic Science*, (2008); 46: 1 - 5.
19. Mustafa, R.A., Abdul Hamid, A., Mohamed, S. and Abu Bakar, E.; Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *Journal of food and Science*, (2010); 75: 28 - 35.
20. Santos, S. C. and Mello, J. C. P. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora da UFRGS, Porto Alegre, RS, (2004).
21. Ciagri. Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares. [http://ci-67.ciagri.usp.br/pm/ver\\_1pl.asp](http://ci-67.ciagri.usp.br/pm/ver_1pl.asp) (accessed April, 2012)
22. Toiu, A., Vlase, L., Oniga, I. and Tamas, M.; Composition of essential oils of *Viola tricolor* and *V. arvensis* from Romania; *Chemistry of Natural Compounds*, (2009); 45: 91 - 92.
23. Joseph, B., Justin R.S.; Pharmacognostic and phytochemical properties of *Aloe vera* Linn – an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences. Review and Research*, (2010); 4: 106 - 110.
24. Nayeem, N. and Karvekar, M.D.; Stability studies and evaluation of the semi solid dosage form of the rutin, quercitin, ellagic acid, gallic acid and sitosterol isolated from the leaves of *Tectona grandis* for wound healing activity; *Archives of Applied Science Research*, (2011); 3: 43 - 51.

Table I - Total of polyphenols, flavonoids, condensed tannins and alkaloids in crude extract of *V. tricolor*.

Secondary metabolite	Amount $\pm$ RSD
Polyphenols	109.32 mg of GAE/g of ext $\pm$ 1.29
Flavonoids	99.40 mg of RE/g of ext $\pm$ 1.27
Condensed tannins	10.83 mg of CE/g of ext $\pm$ 0.49
Alkaloids	0.55 mg of alkaloids/g of ext $\pm$ 0.79

RSD: relative standard deviation; ext: extract

Table II - Results of linearity and sensitivity of method for quantification of rutin in crude extract of *V. tricolor*

Parameter statistic	rutin
Linearity range	10 - 700 $\mu$ g/mL
Standard curve	$Y = 39481x + 98918$
Correlation coefficient	$R = 0.9994$
Limit of detection	10.06 $\mu$ g/mL
Limit of quantitation	33.49 $\mu$ g/mL

Table III – Recovery of the standard solution of rutin added the samples analyzed by the proposed method

added amount (%)	% Recovered <sup>a</sup>	RSD
18	100.8	0.49
25	96.76	0.22
33	96,07	0.33

<sup>a</sup> = mean of three measurements, RSD: relative standard deviation

Table IV - Results of linearity and sensitivity of method for quantification of rutin in gel of *V. tricolor*.

Parameter statistic	Rutin
Linearity range	5 - 400 $\mu$ g/mL
Standard curve	$Y = 32890x + 21599$
Correlation coefficient	$R = 0.9994$
Limit of detection	1.99 $\mu$ g/mL
Limit of quantitation	6.64 $\mu$ g/mL

Table V – Recovery of the standard solution of rutin added the samples, analyzed by the proposed method.

added amount (%)	% Recovered <sup>a</sup>	RSD
4	100.37	0.67
8	99.32	0.23
16	98.79	0.68

<sup>a</sup> = mean of three measurements, RSD: relative standard deviation

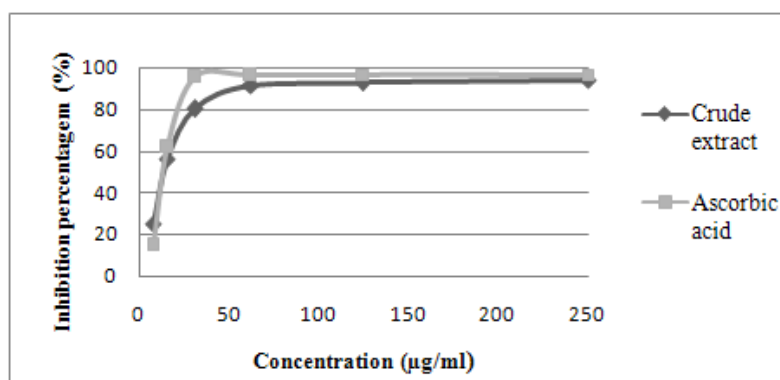


Figure I - Percentage of antioxidant capacity of ascorbic acid standard and of the crude extract of *V. tricolor* evaluated by DPPH method.

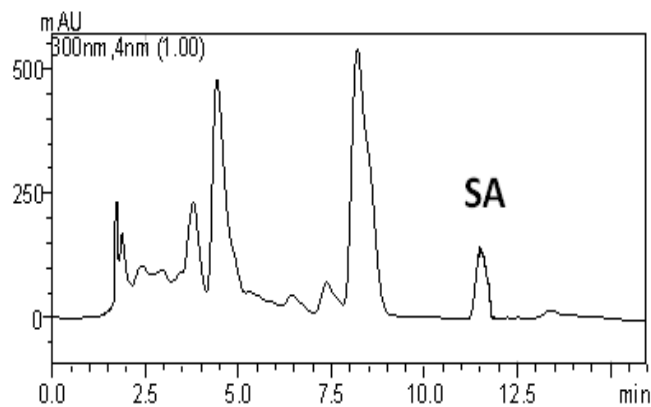


Figure II – Chromatogram of the quantification of salicylic acid in crude extract of *V. tricolor*. (SA) salicylic acid.

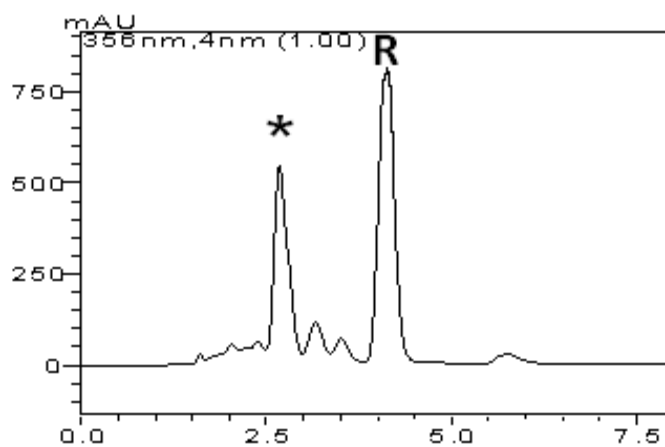


Figure III – Chromatogram of the quantification of rutin in crude extract of *V. tricolor*. R ( rutin); (\*) unknown peak, probably related to flavonoid glycosides.

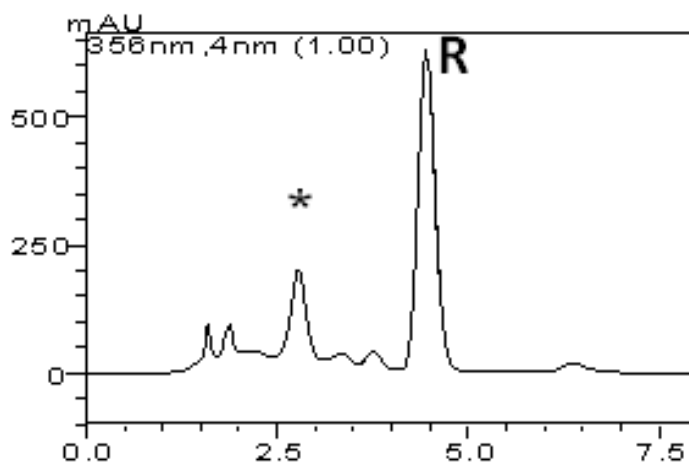


Figure IV - Chromatogram of the quantification of rutin in gel of *V. tricolor*. (R) rutin; (\*) unknown peak, probably related to flavonoid glycosides.

**MANUSCRITO 3** – Submetido ao Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

**Development and stability study of gel containing *Viola tricolor* L.**

Mariana Piana, Thiele Faccim de Brum, Marina Zadra, Aline Augusti Boligon,  
Luciane Varini Laporta, Robson Borba de Freitas, Adiene Fernandes Kieling  
Gonçalves, Gizele Scotti do Canto, Margareth Linde Athayde

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Development and stability study of gel containing *Viola tricolor* L.

Article Type: Full Length Article

Keywords: *V. tricolor*, Violaceae, rutin, stability, gel

Corresponding Author: Dr Margareth Linde Athayde, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Federal University of Santa Maria

First Author: Mariana Piana, Miss

Order of Authors: Mariana Piana, Miss; Thiele F de Brum, Miss; Marina Zadra, Miss; Aline A Boligon, Miss; Luciane V Laporta, Miss; Adiene F Gonçalves, Miss; Gizele S do Canto, Dr; Margareth Linde Athayde, Ph.D.

Abstract: *Viola tricolor* L. (Violaceae), also known Heartsease, has rutin as one of the main component. A gel containing 3% of extract of the flowers of *V. tricolor* was developed and preliminary and accelerate stability study was realized, analyzing organoleptical aspects (appearance, color, smell), analysis of pH, viscosity and quantification of rutin in gel by HPLC. No important changes were detected in preliminary study, in all aspects analyzed, which does not occurred in the accelerated stability at high temperatures, possibly due to hydrolysis and/or oxidation. The gel shows good stability at low temperatures and room temperatures. This formulation is stable since maintained at temperatures below 20°C.



## Development and stability study of gel containing *Viola tricolor* L.

Mariana Piana<sup>a</sup>, Thiele Faccim de Brum<sup>a</sup>, Marina Zadra<sup>a</sup>, Aline Augusti Boligon<sup>a</sup>,  
Luciane Varini Laporta<sup>b</sup>, Robson Borba de Freitas<sup>a</sup>, Adiene Fernandes Kieling  
Gonçalves<sup>a</sup>, Gizele Scotti do Canto<sup>c</sup>, Margareth Linde Athayde<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Phytochemical Research Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil;

<sup>b</sup>Laboratory Quality Control of Drugs, Franciscan University Center, Build 3, room S011, 97010-032, Santa Maria, RS, Brasil;

<sup>c</sup>Pharmacotechnics Research Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build. 26, room 1141, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil;

\*Correspondence: Tel: + (55) 32208950 Fax: +55 (55) 32208248

E-mail address: marga@ccs.ufsm.br (Margareth Linde Athayde)

Postal address: Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

### Abstract

*Viola tricolor* L. (Violaceae), also known Heartsease, has rutin as one of the main component. A gel containing 3% of extract of the flowers of *V. tricolor* was developed and preliminary and accelerate stability study was realized, analyzing organoleptical aspects (appearance, color, smell), analysis of pH, viscosity and quantification of rutin in gel by HPLC. No important changes were detected in preliminary study, in all aspects analyzed, which does not occurred in the accelerated stability at high temperatures, possibly due to hydrolysis and/or oxidation. The gel shows good stability at low temperatures and room temperatures. This formulation is stable since maintained at temperatures below 25°C.

**Keywords:** *V. tricolor*, Violaceae, rutin, stability, gel

## 1. Introduction

The interest in plant-derived compounds for health issues has risen significantly during the last years. It is available a rich variety of dietary and cosmetic products containing different plants extracts. Some of these extracts have a nice effect on the premature skin aging. Among the compounds that were found in these extracts, the flavonoids and some other phenolic substances are the most important [1]. Since the flavonoids are required to prevent the photooxidative stress in the skin, it is important know about the action of these substances and how they may affect the physical stability after the inclusion of the extract in the topical formulation [2].

The stability tests represent an indispensable part of the testing program for pharmaceutical or cosmetic products, since the instability of the preparation modifies requisites, like: quality, efficacy and safety [3]. The stability can be affected by environmental factors such as pH, light, air, and temperature variation [4], that is the main parameter used to induce fast chemical and physical alterations in formulations [4, 5]. Accelerated stability studies using temperature stress, HPLC analysis and viscosity determinations are useful to characterize formulations in a short time period [1,4,6].

*Viola tricolor* (Violaceae) also known as Wild Pansy and Heartsease, has been identified in the treatment of various skin conditions, such as eczema, seborrhea, impetigo and acne [7]. Most of heartsease's biological activities are attributed to their antioxidant flavonoid compounds [8,9]. The antioxidants are chemical compounds that can inhibit the oxidation reaction promoted by free radicals. They can reduce the skin damage by neutralizing the destructive action of the free radicals [10]. Studies by Vukics et al. [9] considered rutin as main flavonoid present in this species.

A content analysis of the main biologically active components in the raw materials of plant and herbal medicines is an important step for the safety and efficacy of its use in the preparation of pharmaceutical products. The quantitative determination of the active ingredients in herbal medicines is just beginning and the presence of an active phytocomplex of plants and its extracts difficult the analysis [11,12].

The organoleptic analysis, pH, viscosity and quantification of rutin were realized with the objective of analyze the preliminary and the accelerated stability of the gel containing the extract of *V. tricolor*.

## 2. Material and Methods

The spectrophotometric grade methanol was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and the rutin, from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All others chemicals and reagents were purchased locally and were of analytical grade. The reagents used in the formulation have been provided by the pharmacotechnics laboratory of the Federal University of Santa Maria.

### 2.1 Collection and extraction of plant

The flowers of *V. tricolor* were collected in the city of Gaurama (Rio Grande do Sul, south Brazil) between September and November of 2009. A dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria (SMBD 12.958). The flowers were dried in stove (temperature < 40° C) and chopped in a knife mill. The chopped flowers were macerated at a room temperature with ethanol 70% during a week, with daily shake-up, the solvent was renewed for four weeks. After filtration, the hydroalcoholic extract was evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator to remove the ethanol. The aqueous extract was dried in stove (temperature above 40°C) getting the crude extract.

### 2.2 Development of gel containing extract of *V. tricolor*

The crude extract of *V. tricolor* was incorporated into the gel in a concentration of 3% (w/w). The composition of the gel is shown in Table I and was prepared by dispersion, in accordance with the physical characteristics of the polymer. EDTA, Nipagin and distilled water were placed in a mortar, heated to 65°C in hot plate. After, the Natrosol was added slowly. After cool down to 40°C, Germal was added and the extract was added previously dissolved in distilled water. The agitation was performed with a pistil during the whole process.

One day after the preparation, the gel samples were fractioned in triplicates of 60g and kept in impermeable polypropylene containers.

### 2.3 Stability study

The preliminary and accelerated stability tests were conducted following the Guide of Stability to Cosmetic Products [13]. Organoleptic tests, measurements of pH, viscosity and concentration of rutin were the parameters analyzed.

In preliminary stability three samples were submitted to cycles freeze/defrost (storage temperature  $4^{\circ}\text{C} \pm 2$  and  $38^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), intercalating the samples every 24h, during 2 weeks. The pH measurement and organoleptic tests were performed daily. Viscosity measurements and the content of rutin in the gel were performed at zero time and after two weeks.

In accelerated stability three batches of each sample were stored and analyzed in triplicate at low temperature ( $4^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), room temperature ( $25^{\circ}\text{C} \pm 5$ ) and high temperature ( $38^{\circ}\text{C} \pm 2$ ). All tests (organoleptic, pH, viscosity, quantification of rutin) were performed at zero time, 1, 7, 15, 30, 60 and 90 days after the gel preparation.

### 2.3.1 Organoleptic characteristics

The evaluations of the organoleptic characteristics were performed considering any change of color, smell and appearance. The samples were evaluated at the same temperature, lighting and packaging conditions.

### 2.3.2 pH measurements

One gram of each formulation was weighed and diluted with distilled water to 10 mL [14]. After homogenized, the pH measurements of the samples were performed at  $25^{\circ}\text{C}$  with a potentiometer model Digimed (DM-22), Digicrom Analytical, previously calibrated with buffer solutions of pH 4.0 and 7.0.

### 2.3.3. Viscosity analysis

The viscosity measured was performed through rotational viscosimeter (Brookfield LV SPINDLE SET), was used the rotation speed of the spindle immersed in the sample. The viscosity of the formulations were measured at  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$  during the analysis. A LV4 spindle and 30 rpm of rotation were used. The results were expressed in centipoises (cP).

### 2.3.4 Analysis of rutin in gel by High performance liquid chromatography

The analysis rutin were performed using the validated method by PIANA [15]. Analysis in High Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD) was utilized with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), Prominence Auto-Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20 AT reciprocating pumps connected to the degasser DGU 20A5 with integrator CBM 20A, UV-VIS detector DAD SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1. The mobile phases and all solutions and samples were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter (Millipore, Bedford, USA) and then degassed by an ultrasonic bath before use. The quantification was carried out by integration of the peaks using the external standard method. The chromatographic peaks were confirmed by comparing their retention time and Diode-Array-UV spectra with the reference standard. All chromatographic operations were carried out at room temperature and in triplicate. For the quantification of rutin, reverse phase chromatographic analyses were carried out under isocratic conditions using a Shimadzu C-18 column (4.6 mm x 150 mm) packed with 5  $\mu\text{m}$  diameter particles; the mobile phase was water-methanol (1:1, v/v) containing 0.002% (v/v) phosphoric acid. The rutin was quantified at 356 nm the flow rate was 1 mL/min. and the injection volume was 20 $\mu\text{l}$ .

## 2.4 Results and discussion

For development of any formulation, several studies are necessary. In relation to flavonoids there are only studies about interference of the excipients in the formulations. Studies by Arct et al. [16] reported that the increase in solubility of the flavonoids in the presence of hydrophilic substances causes a significantly decreases the driving force for the permeation process. These results suggested that the presence of hydrophilic additives in the cosmetic formulation changes the permeation profile of flavonoids.

Diffusion studies performed by Valenta et al. [17] using an artificial membrane showed that gel of hydroxyethylcellulose obtained a good release profiles and permeation of the rutin, better result was meet for Na-deoxycholate, substance not marketable in our country. For these reasons, our formulation was developed using

hydroxyethylcellulose polymer and not using hydrophilic additives in order to promote a better permeation of flavonoids and better results.

In the herbal gel formulations the incompatibilities may occur between the gel forming polymer and the other constituents of the formulation, especially after the addition of extracts or tinctures that can generate incompatibilities as: turbidity, precipitation, crystallization, color change, smell change or disruption of the polymer chain [18].

The stability study is the primary testing phase to a product development. Using extreme temperature (heat stress) to accelerate possible reactions between its components and the possible appearance of signs of instability that must be observed and analyzed according to the specific features of each product [13,18].

No relevant changes were detected in relation to the organoleptic characteristics, pH, viscosity and quantification of rutin during the preliminary stability study. Because of these good results an accelerated stability study was conducted.

The results of the accelerated stability of the organoleptic tests are shown in table II. Results showed that there were water liberation from the gel that was submitted to high temperature (intense within 60 days), and, at room temperature, slight at 90 days. The *V. tricolor* extract contains saponins [7], that are steroid glycosides, have a part of molecule with lipophilic character (steroid or triterpene), and part with hydrophilic character (sugar), that determines the characteristic of reducing the surface tension of water and its emulsifier action [19]. For non ionic surfactant, the mechanism of dissolution in water is the hydrogen bonding between its hydrophilic head and the water molecules. An increase in the thermal energy (temperature rise) can weaken the bonding, causing dehydration and consequent micellar aggregation [20]. This fact may explain why at the end of the accelerated stability study at high temperature the formulation presented two phases, one with liberated water and other with characteristics of the gel.

The pH values of the gel during the accelerated stability, ranged between 5.14 to 5.37 at low temperature, between 5.09 to 5.43 at room temperature and between 5.04 to 5.38 at high temperature. The pH values were stable and compatible with the physiological pH value, 4.6 - 5.8 [21], this result was expected because non-ionic gels are stable in wide pH range, with possible incorporation of substances of acid character [22]. In accordance with Ansel et al. [23], the determination of pH is very important because alterations may be indicative of impurities and decomposition.

During the accelerated stability, the viscosity decreased in the three temperature analyzed, this decrease was not visually perceptible in the samples subjected to low and room temperatures. A big decrease in viscosity occurred after 15 days in the samples submitted to high temperature; this change was visually perceptible at 30 days (figure 1). The temperature is one of the most important factors to the viscosity system because it can change the molecular bonds and then cause different effects [24, 2].

The plants have several molecules that can affect the viscosity of the gel. The *V. Tricolor* contains 10% of mucilages (polysaccharides), composed of flucose (35%), galactose (33%), arabinose (18%), and rhamnose (8%) [7], these polysaccharides at high temperatures may change the gel viscosity. Marcotte et al. [25] conducted a study of the rheological properties of various polysaccharides (carrageenan, pectin, xanthan and starch) at different temperatures (20, 40, 60 and 80 °C). According to the authors' observations, high temperatures cause reduction in viscosity.

A decrease in the viscosity also were found in studies of Anchisi et al. [26] in formulations containing *Salvia officinalis* and *Centella asiatica* and in studies of Di Mambro and Fonseca [2] after the incorporation of *Glycyrrhiza glabra* extract in the formulation.

Flavonoids are phenolic compounds with moderate solubility in water and sensitive to the presence of metal ions, ultraviolet radiation, and high temperature and tend to the hydrolysis, which is accelerated direct and proportionally to an increase of the temperature [27].

In our study, even with the addition of EDTA, there was a decrease of the concentration of rutin of 15.86% at 15 days and of 36.9% at 90 days, at high temperature in the accelerated stability study (figure 2), this decreased was expected because of the elevated storage temperature which caused an acceleration of the chemical degradation of the rutin. But, this did not occur at low temperature and room temperature, whose concentrations of rutin decreased less than 10%, it is possible that EDTA has helped, at least in part, in stability of rutin, due to characteristic of complexation with metals.

Studies by Nishikawa et al. (2007) reported a reduction of 28% in the content of phenolic compounds in the formulation at 45 days, in facial peel-off masks, in all storage conditions. The same author added EDTA, in the formulations and verified an increase in the stability of the formulations at low temperature and at room temperature [28].

The decrease of the concentration of rutin can be due to hydrolysis, studies by Bilia et al [3] observed that the absence of water in formulations maintained stable active substances, because the hydrolysis does not occurs. The gel is usually composed by more water than a cream, and the oxygen dissolved can cause oxidation [10]. In fact, the gels have plenty water in its constitution, which is one of the reasons responsible for the decrease of the concentration of rutin, even when EDTA was added to the formulation [3].

## 2.5 Conclusion

Organoleptic parameters such as smell, color and appearance, which are imperative to the consumer acceptance of gel formulations did not showed relevant changes during all the time of study. Additionally, the gels exposed to low and room temperature were stable for all the analyzed parameters, indicating the well suitability of the formulation developed. However, the samples submitted to high temperatures presented instability problems, mainly related to a decrease of rutin contents and gel viscosity. Given that viscosity is an important parameter to consumers acceptance, whereas rutin concentration is a fundamental factor in the pharmaceutical development of herbal formulations, because it may influence the effectiveness of the gel, our study demonstrate that this formulation was stable ever since maintained at temperatures below 25°C. These promising results will permit new studies seeking for the improvement of these formulations.

## References

- [1] I. Hinneburg, Y. Mrestani, R. H. H. Neubert, Development and Application of a CE Method for Quantification of Phenolic Compounds in Extracts from Buckwheat Herb and in Semi-Solid Formulations Containing the Extracts, *Chromatographia*, 59 (2004) 591 – 594.
- [2] V. M. Di Mambro, M. J.V. Fonseca, Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts, *J Pharmaceut Biomed Anal.* 37 (2005) 287 – 295.



- [3] A. R. Bilia, M. C. Bergonzi, F. G. Morgenni, G. Mazzi, F. F. Vincieri, Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations, *Int. J. Pharm.* 213 (2001) 199 - 208.
- [4] T. Guaratini T. M. D. Gianeti, P. M. B.G.M Campos, Stability of cosmetic formulations containing esters of Vitamins E and A: Chemical and physical aspects, *Int. J. Pharm.* 327 (2006) 12 – 16.
- [5] A. R. Baby, K. F. Migliato, C. P. M. Maciel, V. Zague, C.A.S.O.Pinto, H. R. N. Salgado, T.M.Kaneko, M.V.R. Velasco. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham, *Braz. J. Pharm. Sci.* 43 (2007) 405 – 412.
- [6] T. Tadros, P. Izquierdo, J. Esquena, C. Solans. Formation and stability of nano-emulsion, *Adv. Colloid Interface Sci.* 108 (2004) 303 – 318.
- [7] S. Rimkienė, O. Ragapinskienė, N. Savickienė, The cumulation of Wild pansy (*Viola tricolor* L.) accessions: the possibility of species preservation and usage in medicine, *Medicina.* 39 (2003) 411 – 416.
- [8] V. Vukics, T. Ringer, A. Kery, G.K. Bonn, A. Guttman, Analysis of heartsease (*Viola tricolor* L.) flavonoid glycosides by micro-liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry, *J. Chromatog. A*, 1206 (2008) 11 – 20.
- [9] V. Vukics, A. Kery, A. Gutfman, Analysis of polar antioxidants in heartsease (*Viola tricolor* L.) and Garden Pansy (*Viola x wittrockiana* Gams.), *J Chromatogr Sci.* 46 (2008) 1 – 5.
- [10] S. Yotsawimonwat, J. Rattanadechsakul, P. Rattanadechsakul, S. OkonogiSkin Improvement and stability of *Echinacea purpurea* dermatological formulations, *Int J Cosmet Sci.* 32 (2010) 340 – 46.
- [11] E.M. Williamson, Synergy and other interactions in phytomedicines, *Phytomedicine.* 8 (2001) 401 – 409.
- [12] M. T. F. Bara, P.A.M Ribeiro, M.C.B. Arantes, L.S.S Amorim.. J.R.Paula, Determinação do Teor de Princípios Ativos em matérias-primas Vegetais, *Braz J. Pharmacogn.* 16 (2006) 211 – 215.
- [13] Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, first ed., Brasília, 2004.
- [14] Brazilian Pharmacopoeia, fourth ed., São Paulo, 2000.
- [15] M. Piana, Avaliação etnofarmacológica de *Jatropha isabellei*, *Tabernaemontana catharinensis* e *Viola tricolor* visando desenvolvimento de formulação farmacêutica. University Federal of Santa Maria (Masters dissertation), 2012.

- [16] J. Arct, A. Oborska, M. A. Mojski, A. Binkowska, B. Świdzikowska. Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids, *Int J Cosmet Sci.* 24 (2002) 57 – 66.
- [17] C. Valenta, E. Nowack, A. Bernkop-schnürch, A. Deoxycholate-hydrogels: novel drug carrier systems for topical use, *Int. J. Pharm.* 185 (1999) 103 – 111.
- [18] V.L.B. Isaac, L.C. Cefali, B. G. Chiari, C.C.L.G. Oliveira, H.R.N. Salgado M.A. Corrêa, Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos, *J. Basic and App Pharm Scie.* 29 (2008) 81 – 96.
- [19] E. P. Schenkel, G. Gosmann, M. L. Athayde, Saponinas, In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, Porto Alegre, 2004.
- [20] G. Zhao, C.C. Khin, S. B. Chen, S. B, Nonionic surfactant and temperature effects on the viscosity of hydrophobically modified hydroxyethylcellulose solutions. *J. phys chem B*, 109 (2005) 14198 – 14204.
- [21] G.R. Leonardi, L.R. Gaspar, P.M.B.G. Maia Campos, Study of pH variation on the skin using cosmetic formulations with and without vitamins A, E or ceramide: by a non-invasive method. *An Bras Dermatol.* 77 (2002) 563 – 569.
- [22] N.M. Corrêa, F.B, Camargo Júnior, R.F Ignácio, G.R. Leonardi. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Braz J. Pharm. Sci.* 41 (2005) 73 – 78.
- [23] H.C. Ansel, N.G. Popovich, L.V. Allen, *Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*, sixth ed., São Paulo, 2000.
- [24] J. M. M. Soriano, F.M.J. Contreras, S. E. Flores. Proposal and pharmacotechnical study of a modern dermo-pharmaceutical formulation for cold cream, *Boll Chim Farm.* 135 (1996) 364 – 367.
- [25] M. Marcotte, A. R. T. Hoshahili, H. S. Ramaswamy, Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature, *Food Res. Int.* 34 (2001) 695 – 703.
- [26] C. Anchisi, A. M. Maccioni, C. Sinico, D. Valenti, Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agents, *Il Farmaco.* 56 (2001) 427 – 431.
- [27] M. Friedman, H.S. Jürgens, Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 2101 – 2110.

[28] D.O. Nishikawa, V. Zague, C.A.S.O Pinto, R.P. Vieira, T.M. Kaneko, M.V.R. Velasco, A.R. Baby, Avaliação da estabilidade de máscaras faciais *peel-off* contendo rutina, J. Basic and App Pharm Scie. 28 (2007) 227 – 232.

Table I Percent composition (w/w) of the gel.

Components	Suppliers	%
Natrosol® QP 400H	Farmaquímica	2.3
EDTA	Proquimios	0.1
Nipagin®	Belga	0.2
Germal®	Delaware	0.2
Extract of <i>V. tricolor</i>	-	3.0
distilled water qsp	-	100

Table II – Results of the organoleptic characteristics (appearance, color and smell) of the samples analyzed during the period of 90 days in low, room and high temperatures.

	Time (days)						
	0	1	7	15	30	60	90
Low temperature							
Appearance	N	N	N	N	N	N	N
Color	N	N	N	N	N	N	N
Smell	N	N	N	N	N	N	N
Room temperature							
Appearance	N	N	N	N	N	N	SMA <sup>a</sup>
Color	N	N	N	N	N	N	N
Smell	N	N	N	N	N	N	N
High temperature							
Appearance	N	N	N	N	N	MA <sup>b</sup>	MA <sup>b</sup>
Color	N	N	N	N	N	N	N
Smell	N	N	N	N	N	N	N

N normal; SMA slight modification of the appearance; MA modification of the appearance; <sup>a</sup> slight liberation of water from the gel; <sup>b</sup> intense liberation of water from the gel

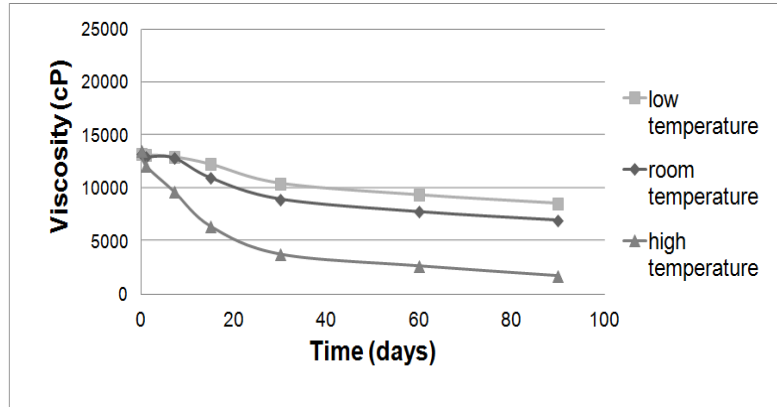


Figure 1. Viscosity values of the gels of extract of the *V. tricolor* during the accelerated stability study. Relative standard deviation below 2.

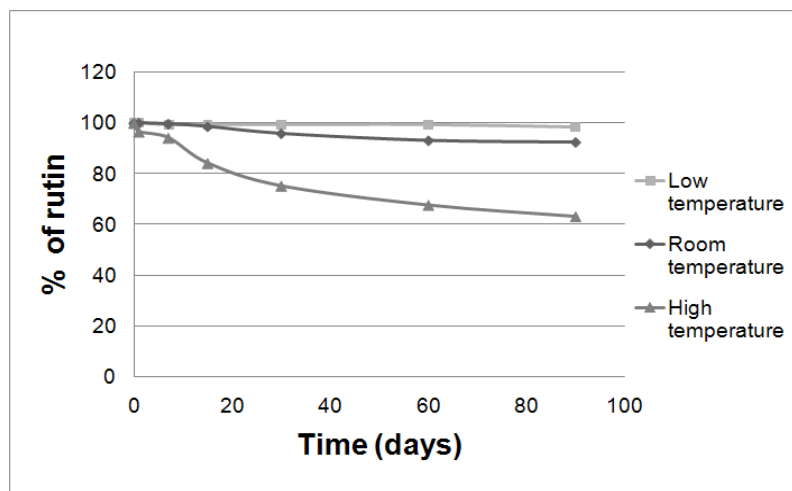


Figure 2 – Decrease (%) of the concentration of the rutin in relation to the initial concentration in samples of gel. Relative standard deviation below 2.

## 5 DISCUSSÃO GERAL

A avaliação científica de plantas usadas em formulações com fins terapêuticos, pode representar um ponto de partida no desenvolvimento de novos fármacos (TAWAHA et al. 2007). Extratos naturais de origem vegetal, ricos em moléculas bioativas, têm se revelado bastante benéfico, o que influencia o crescente interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de pesquisas e criação de novas alternativas terapêuticas naturais de qualidade (CAPECKA et al., 2005). É de fundamental interesse o estudo da composição das plantas e a atividade antioxidante e farmacológica, sobretudo a parte relativa a fração dos compostos fenólicos (WOJDYLO et al. 2007). A forte vertente antioxidante das plantas confere-lhes a propriedade de restringir os danos provocados pelo estresse oxidativo nos sistemas celulares (LIGOR; BUSZEWSKI, 2007).

Quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos que deve ser observado consiste nas informações da medicina popular. Dados da literatura revelam que é mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso. Como a constituição química, na maioria dos casos, difere significativamente em relação às distintas partes da planta, parece mais viável estudar inicialmente aquela que é empregada na medicina popular (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Existem várias metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais, visando o isolamento ou identificação de seus constituintes químicos. Um dos métodos considerado mais adequado para a análise químico-farmacológica é a preparação de extrato hidroalcoólico. Posteriormente, este extrato deve ser submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes, como hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, visando uma semipurificação das substâncias através de suas polaridades. No sentido de localizar os princípios ativos, todos os extratos semipuros devem ser testados (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Os flavonoides contribuem para as propriedades anti-inflamatórias, pois podem inibir tanto a via da ciclooxigenase quanto da 5-lipoxigenase no metabolismo do araquidonato. Essas moléculas possuem propriedades antioxidantes, incluindo

eliminação de radicais livres, e podem prevenir a peroxidação de lipídeos que está intimamente relacionada a processos inflamatórios (SILVA et al., 2002).

Este estudo foi delineado de forma que a espécie que apresentasse pronunciada capacidade antioxidante ou menor IC<sub>50</sub> pelo método DPPH, seria utilizada para o desenvolvimento de uma formulação, levando em consideração que quanto melhor a capacidade antioxidante, maior a probabilidade de se obter um extrato potencial para a atividade anti-inflamatória. O método do DPPH baseia-se na redução do radical DPPH em solução alcoólica na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio. Este radical captura os hidrogênios sofrendo descoloração, isto é, mudando a coloração de violeta para amarelo. Esta diminuição de cor indica a eficiência das frações na eliminação do radical (KUSILIC et al., 2004).

A análise da capacidade antioxidante evidencia que os solventes extraem compostos diferentes de acordo com a sua polaridade, e assim, estas frações se comportam de maneira diferente frente ao radical DPPH. Alguns estudos demonstram que os compostos mais polares são extraídos mais facilmente pelos solventes polares, como por exemplo acetato de etila e n-butanol, e apresentam os melhores resultados para a capacidade antioxidante devido à presença das hidroxilas (MENSOR et al, 2001).

Por meio de estudos etnofarmacológicos, foi verificado que a atividade anti-inflamatória é comum as três espécies: *V. tricolor*, *J. isabellei* e *T. catharinensis*. Portanto, informações sobre a capacidade antioxidante e a relação entre seus metabólitos secundários, principalmente, flavonoides, foram analisados a fim de direcionar o estudo. Na literatura, até o momento, não havia estudos disponíveis sobre metabólitos secundários e capacidade antioxidante em frações de polaridades crescentes em *T. catharinensis*. Esta ausência motivou o estudo das características fitoquímicas e antioxidantes dessa espécie.

Nos frutos de *T. catharinensis*, as frações acetato de etila e n-butanol apresentaram melhores capacidades antioxidantes, em acordo com Mensor et al. (2001), porém esse resultado não pode ser relacionado com o conteúdo de polifenóis, alcaloides ou taninos. O maior conteúdo de flavonoides (218,81 mg EQ/g de fração) foi encontrado na fração acetato de etila, e esta apresentou melhor capacidade antioxidante, porém nas frações clorofômica, butanólica e extrato bruto, a relação entre quantidade de flavonoide e capacidade antioxidantes não pode ser evidenciada.

Nos frutos a fração butanólica apresentou maior quantidade de flavonóides de do que polifenóis. O método Folin-ciocalteu, não é um método específico, pois detecta

outros grupos fenólicos presentes no extrato, um dos principais fatores limitantes da utilização do reagente está relacionado com a interferência de agentes redutores naturalmente presentes nos produtos vegetais, tais como ácido ascórbico e bissulfito, e outros constituintes como aminoácidos, proteínas e xantinas (AGOSTINI-COSTA et al., 1999.)

Nas análises fitoquímicas dos ramos, a fração n-butanol demonstrou melhor capacidade antioxidante, seguidamente pela fração clorofórmica. Esse resultado não pode ser relacionado ao conteúdo de polifenóis e apesar das quantidades de taninos condensados seguirem a mesma tendência da capacidade antioxidante não se pode afirmar que estes são os principais responsáveis pela capacidade antioxidante, pois se encontram em pequenas quantidades. As grandes quantidades de alcaloides encontradas na fração clorofórmica podem ter contribuído muito na excelente capacidade antioxidante dessa fração, uma vez que apresentou o segundo melhor  $IC_{50}$ , de 93,11  $\mu\text{g/mL}$ .

Ao contrário dos frutos, nos ramos a fração com maior capacidade antioxidante não foi aquela que apresentou maior quantidade de flavonoides (clorofórmica). Segundo Rice-evans et al., (1997) o padrão de hidroxilação altera a capacidade antioxidante dos flavonoides (figura 1), assim como, a glicosilação.

A configuração 3, 4-orto-dihidroxi no anel B e grupo carbonil no anel C, é essencial para a capacidade antioxidante, e a presença de hidroxila na posição 3 e 5 é benéfica, assim como a presença de dupla ligação entre C2-C3 configurado com 4-ceto (WOJDYŁO et al. 2007). Outro fator importante é a glicosilação que torna a molécula menos reativo para os radicais livres (RICE-EVANS et al., 1997).

Nos ramos e nos frutos dessa espécie, a associação entre a quantidade de flavonoides e padrão de hidroxilação desses podem ter influenciado na capacidade antioxidante de cada fração, assim como a existência de outras classes de compostos como, por exemplo, os alcaloides.

A fração acetato de etila dos frutos e a fração clorofórmica dos ramos, apresentaram boa capacidade antioxidante e maiores quantidades de flavonoides, por este motivo foram submetidas à análise em CLAE. Foi encontrada quantidade de  $3,45 \pm 1,66$  mg/g de rutina na fração acetato de etila e  $8,96 \pm 0,47$  mg/g na fração clorofórmica. Esses compostos podem contribuir na capacidade antioxidante dessa espécie.

O extrato bruto tanto dos frutos quanto ramos apresentaram altos valores de  $IC_{50}$ , 1.155,91  $\mu\text{g/mL}$  e 202,17  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, o que dificultaria a utilização da



planta em estudos anti-inflamatórios, uma vez que essa atividade está relacionada a capacidade antioxidante. Além disso, haveria necessidade de elevadas quantidades do extrato para se obter os efeitos desejados, e isso também inviabilizaria a incorporação do extrato no gel.

Estudos sobre metabólitos secundários e capacidade antioxidante em frações de polaridades crescentes realizados por Fröhlich (2012) nas partes subterrâneas de *J. isabellei* demonstraram que a fração acetato de etila apresentou a melhor capacidade antioxidante ( $IC_{50}$  de 14,78  $\mu\text{g/mL}$ ). A quantificação de polifenóis, flavonoides e taninos condensados do extrato bruto e das frações dessa espécie revelou que a fração acetato de etila apresentou os melhores valores para estes metabólitos e que existe uma correlação positiva entre o conteúdo destas substâncias com a atividade antioxidante. O extrato bruto e a fração butanólica também apresentaram uma correlação positiva e proporcional com a atividade antioxidante. No entanto, o extrato bruto e a fração butanólica apresentaram  $IC_{50}$  de 124,60 e 121,05  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, valores relativamente superiores, o que dificultaria a sua incorporação no gel, pois seriam necessários quantidades relativamente altas de extrato para se obter o efeito desejado. Além disso, essa espécie é utilizada popularmente no tratamento da gota (BASUALDO et al., 1995; PERTINO et al., 2007), doença inflamatória decorrente da deposição de cristais de monourato de sódio nas articulações e nos tecidos periarticulares (CASSETTA; GOREVIC, 2004). Não existem na literatura estudos que relacionem a capacidade de penetração de flavonoides através da articulação, sendo pouco viável a utilização dessa espécie na forma de gel para o tratamento de gota.

Estudo de Gonçalves (2008) em *V. tricolor* mostrou que a capacidade antioxidante das frações diclorometano, acetato de etila e n-butanol das flores apresentaram excelentes resultados ( $IC_{50}$  de 13,40  $\mu\text{g/mL}$ , 13,25  $\mu\text{g/mL}$ , 14,18  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), esses resultados foram melhores do que os encontrados nas frações das outras partes da planta. Além disso, o mesmo estudo confirmou a rutina como um importante marcador fitoquímico, pois foi encontrada uma concentração de 182,72 mg/g de rutina na planta, valor relativamente alto. As excelentes capacidades antioxidantes de todas as frações indica que a extrato das flores dessa espécie possui potencial para desenvolvimento do gel, além disso, a rutina pode ser utilizada como um marcador fitoquímico em análise de estabilidade e controle de qualidade. Em relação às outras espécies, seriam necessárias quantidades inferiores do extrato de *V. tricolor* para se obter um efeito considerável em relação à atividade anti-inflamatória. O uso popular em

afecções cutâneas faz dessa espécie promissora, uma vez que o gel foi desenvolvido para uso tópico.

Segundo López (2006), as maiores concentrações de glicosídeos concentram-se à tarde e no início da floração, fato que justifica a coleta das flores de *V. tricolor* nestes períodos. Nessa planta a quantidade encontrada de polifenóis foi 109,21 mg EAG/g de extrato bruto, flavonoides 99,40 mg de ER/g de extrato bruto. Os taninos condensados encontram-se em quantidade considerável, 10,83 mg EC/g de extrato bruto. Até o momento, havia apenas dados qualitativos sobre alcaloides presentes nessa espécie, através deste estudo pode-se perceber que esse metabólito encontra-se em baixíssimas concentrações (0,55 mg de alcaloides/g de extrato bruto) podendo contribuir muito pouco nas atividades terapêuticas dessa planta. Além disso, o extrato bruto apresentou 5,73 mg de ácido salicílico/100g de extrato bruto, esse componente pode contribuir em parte nos efeitos terapêuticos dessa espécie pois o ácido salicílico possui propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e queratolíticas (LEONARDI et al., 2002).

Devido a grande demanda de medicamentos no Brasil, as indústrias farmacêuticas precisam estar preparadas para analisar grandes quantidades e variedades de medicamentos em curto espaço de tempo, para isso, necessitam de métodos rápidos de análise. Neste estudo, foi validado um método cromatográfico para quantificar rutina no extrato bruto, o qual serviu como referência para validação do gel desenvolvido, possuindo como vantagens simplicidade e rapidez no método.

O método validado para quantificação de rutina no extrato bruto mostrou-se linear ( $R = 0,9994$ ), o mesmo apresentou limite de detecção e quantificação de 10,06  $\mu\text{g/mL}$  e 33,49  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A precisão apresentou DPR de 0,26 e a precisão intermediária DPR de 0,86, em acordo com Brasil (2003), em que o valor máximo permitido para DPR é 5. A porcentagem de recuperação através da adição de quantidades conhecidas do padrão rutina nas amostras demonstrou valores dentro do limite de variação de 15% (BRASIL, 2003). O método apresentou-se robusto, pois tanto as alterações fluxo quanto o pH da fase móvel não interferiram na quantificação da rutina. O extrato bruto apresentou 79,16 mg/g de rutina, valor consideravelmente alto.

Da mesma forma, para quantificação da rutina no gel, o método validado mostrou-se linear ( $R = 0,9994$ ), apresentou limite de detecção e limite de quantificação de 1,99  $\mu\text{g/mL}$  e 6,64  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A precisão apresentou DPR de 0,75 e a precisão intermediária DPR de 0,07, bem como a porcentagem de recuperação pela adição de quantidades conhecidas de rutina nas amostras mostraram-se dentro dos

limites estabelecidos (BRASIL, 2003). O método apresentou-se robusto, pois tanto as alterações de fluxo quanto o pH da fase móvel não interferiram na quantificação da rutina. O gel apresentou 0,233mg de rutina/ 100g de gel .

Uma das preocupações com relação ao estudo de validação para quantificação de rutina no gel foi quanto a especificidade, o gel possui excipientes, como o complexante e os conservante, que podem interferir na detecção da rutina. No entanto, o cromatograma do gel sem o extrato não apresentou absorção no tempo retenção da rutina e no comprimento de onda de 356nm, comprovando a especificidade do método.

O estudo de estabilidade preliminar e acelerada foi realizado de acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004a) em que foi avaliado as análises organolépticas, pH e viscosidade. Além disso, a concentração de rutina no gel também foi avaliada. Segundo Isaac et al. (2008) o teste de estabilidade preliminar, realizado em um curto intervalo de tempo, pode direcionar no desenvolvimento de produtos. Este ensaio consiste em submeter as amostras sob condições extremas de temperatura, objetivando acelerar processos de instabilidade, para auxiliar na triagem de formulações, porém não é utilizado para se estimar a vida útil do produto. O estudo da estabilidade fornece subsídios para o aperfeiçoamento das formulações; estimar o prazo de validade e fornecer informações para sua confirmação; auxilia no monitoramento da estabilidade organoléptica e físico-química, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos.

O gel é uma forma farmacêutica que possui liberação do ativo mais facilmente em comparação com as formas de creme e pomada, além de apresentar boa viscosidade, bioadesão satisfatória e nenhuma ação irritante ou de sensibilização (TAS et al. 2003). Diante disso, utilizou-se neste estudo a essa forma farmacêutica para incorporação do extrato. Na literatura, há evidências da utilização de *V. tricolor* topicamente (RIMKIENÈ et al., 2003), porém não foram encontrados dados da concentração ideal do extrato a ser adicionada à formulação. Estudo de Calvo (2006) encontrou boa atividade anti-inflamatória e analgésica na formulação tópica contendo 3% do extrato de *Verbena officinalis* L, assim foi empregada essa concentração no desenvolvimento do gel.

Estudo de difusão realizado por Valenta et al. (1999) utilizando membrana artificial mostrou que o gel de hidroxietilcelulose obteve bom perfil de liberação e permeação da rutina, melhores resultados somente foram encontrados quando foi utilizado deoxicolato de sódio, substância não comercialmente disponível no Brasil.

Outros estudos realizados por Arct e Oborska (2002) demonstraram que o aumento da solubilidade dos flavonoides na presença de substâncias hidrofílicas causa um decréscimo no processo de permeação do flavonoide.

Além disso, Nishikawa et al. (2007) avaliaram o efeito da adição de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) como agente complexante em máscaras faciais *peel-off* e seus resultados mostraram que essa substância foi capaz de contribuir na estabilização do teor da rutina evitando a redução do teor desse flavonoide em 10% em relação ao teor inicial no 30º dia de análise, nas temperaturas de  $5^{\circ}\text{C} \pm 5$  e  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

No estudo de estabilidade preliminar, as amostras foram submetidas a ciclos de gelo/degelo, os resultados não demonstraram alterações consideráveis quanto às análises organolépticas e de viscosidade, os valores de pH mantiveram-se entre 5,42 - 5,65, o decréscimo do teor de rutina no 15º dia de análise foi de apenas 7,45%. Esse excelente resultado conduziu aos estudos de estabilidade acelerada com a mesma formulação.

O estudo de estabilidade acelerada foi realizado durante 90 dias, análises organolépticas, medidas de pH, viscosidade e concentração de rutina foram realizadas em amostras submetidas a três temperaturas (baixa temperatura,  $4^{\circ}\text{C} \pm 2$ ; temperatura ambiente,  $25^{\circ}\text{C} \pm 5$  e alta temperatura  $38^{\circ}\text{C} \pm 2$ ).

As análises organolépticas apresentaram-se estáveis quanto à aparência, cor e odor, em amostras submetidas à baixa temperatura, durante todo o período do estudo. As amostras submetidas à temperatura ambiente também foram estáveis durante 60 dias de estudo, porém aos 90 dias, notou-se leve alteração da aparência e foi possível verificar que houve pequena liberação de água da formulação. O mesmo também ocorreu em amostras que foram submetidas a altas temperaturas aos 60 dias de estudo, podendo-se verificar aos 90 dias uma notável alteração da aparência.

Em relação ao pH, as amostras não apresentaram variações consideráveis, pois se encontraram entre 5,14 e 5,37 em baixa temperatura, 5,09 e 5,43 em temperatura ambiente e 5,04 e 5,38 em altas temperaturas. Além do gel possuir valores de pH compatíveis ao pH fisiológico, esses valores são importantes para a estabilidade dos compostos fenólicos. Estudos realizados por Friedman e Jürgens (2000), demonstraram que estes compostos podem ser alterados quando expostos a altos valores de pH, podendo alterar seus efeitos antioxidantes.

Durante os 90 dias de análise foi possível verificar decréscimo da viscosidade do gel submetido a baixa temperatura e temperatura ambiente, esse decréscimo não

foi perceptível visualmente, podendo ser considerada estável. O mesmo não se pode afirmar do gel submetido a altas temperaturas, que apresentou diminuição considerável de viscosidade aos 15 dias de análise, sendo que aos 30 dias essa redução foi visualmente perceptível, afetando a estabilidade do gel. Alguns estudos relataram diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura em hidrocolóides de polissacarídeos, outros estudos atribuíram a diminuição da viscosidade aos extratos incorporados na formulação. As plantas possuem uma grande variedade de moléculas em seus metabólitos, *V. tricolor* é constituída por polissacarídeos que em altas temperaturas podem causar diminuição da viscosidade do gel.

A concentração de rutina em baixas temperaturas e em temperatura ambiente, apresentou diminuição da concentração de apenas 1,73% e 7,6%, respectivamente, aos 90 dias de estudo, sendo que para ser considerada estável, não pode ocorrer desvio de concentração superior a 15% (BRASIL, 2003). O mesmo não ocorreu em altas temperaturas, em que a diminuição da concentração da rutina foi de 32,41% aos 60 dias de estudos, esse resultado já era esperado, pois os flavonoides são extremamente sensíveis a altas temperaturas. O excelente resultado obtido em baixa temperatura e em temperatura ambiente pode ser devido ao EDTA, agente complexante, adicionado.

A degradação da rutina em altas temperaturas pode ser também, devido a hidrólise ou a oxidação, pois conforme Bilia et al. (2001), os géis apresentam grande quantidade de água, o que pode favorecer a hidrólise. Além disso, em estudo de estabilidade em formulação contendo extrato de *Echinacea purpurea* realizado por Yotsawimonwat et al. (2010), revelou que a adição de um agente quelante ou outros antioxidantes poderiam melhorar a estabilidade, mas não a um nível satisfatório em relação ao conteúdo fenólico total. Segundo o mesmo autor, o gel é geralmente composto por mais água do que um creme, e o oxigênio dissolvido na água pode causar oxidação. Portanto, os compostos bioativos dissolvidos no gel são mais expostos ao oxigênio, podendo sofrer oxidação.

O gel exposto a baixa temperatura e a temperatura ambiente demonstrou estabilidade para os parâmetros analisados. O mesmo não se pode dizer das amostras submetidas a alta temperatura, provavelmente, os constituintes do extrato interagiram com o polímero utilizado no gel alterando a aparência e viscosidade. Adicionalmente, altas temperaturas associadas à hidrólise e/ou oxidação podem degradar a rutina, uma vez que o EDTA foi adicionado a formulação. O gel pode ser considerado estável desde que se mantenha a temperaturas inferiores a 20°C.

## 6 CONCLUSÕES

- A análise de metabólitos secundários nos frutos de *T. catharinensis* apresentou maior quantidade de polifenóis na fração clorofórmica, de flavonoides na fração acetato de etila, de alcaloides na fração clorofórmica e taninos condensados na fração clorofórmica. A mesma análise nos ramos de *T. catharinensis* apresentou maior quantidade polifenóis na fração acetato de etila, flavonoides na fração clorofórmica, alcaloides na fração clorofórmica e taninos condensados na fração butanólica. Quantidades consideráveis de polifenóis, flavonoides e taninos condensados e baixíssimas quantidades de alcaloides foram encontradas no extrato bruto das flores de *V. tricolor*.
- A capacidade antioxidante dos ramos de *T. catharinensis* foi superior a dos frutos nesta mesma espécie, sendo que para os ramos a fração butanólica apresentou melhor capacidade antioxidante e para os frutos a fração acetato de etila. Excelente resultado desse teste foi encontrado para o extrato bruto das flores de *V. tricolor*.
- Nas análise de compostos fenólicos por HPLC, foi possível quantificar rutina na fração acetato de etila dos frutos de *T. catharinensis* e ácido clorogênico na fração clorofórmica dos ramos dessa mesma espécie e rutina foi quantificada no extrato bruto das flores de *V. tricolor*.
- Comparando-se *T. catharinensis*, *J. Isabellei* e *V. tricolor*, melhor capacidade antioxidante foi encontrada no extrato bruto das flores de *V. tricolor*, sendo considerada potencial para desenvolvimento de formulação.
- Os métodos validados para a quantificação da rutina (marcador analítico) tanto no extrato bruto quanto no gel desenvolvido apresentaram-se rápidos, específicos, sensíveis, precisos, exatos e robustos.
- No estudo de estabilidade o gel apresentou-se estável desde que se mantenha a temperaturas inferiores à 25°C.
- Entre as espécies *T. catharinensis*, *J. Isabellei* e *V. tricolor*, o melhor resultado encontrado para a análise da capacidade antioxidante foi obtido pelo extrato bruto das flores de *V. tricolor*, o que foi definitivo para a escolha dessa espécie como potencial para desenvolvimento do gel. O estudo de estabilidade realizado

através de análise organoléptica, pH, viscosidade e quantificação de rutina pelo método validado demonstrou que o gel foi estável a temperaturas inferiores a 25°C. Estes resultados promissores permitirão novos estudos buscando o aperfeiçoamento dessa formulação.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI-COSTA, T.S.; GARRUTI, D.S.; LIMA, L. et al. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju. **B.CEPPA**, v. 17, n. 2, 1999.

AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 472 - 508, 2008.

ALMEIDA, L. et al. Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Parte C 137 p.19 - 27, 2004.

ANSEL, H. C.; ALLEN, L.; POPOVICH, N. G. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8 ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2007.

ARCT, J.; OBORSKA, A. Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 24, n. 3, p. 57 - 66, 2002.

AULTON, E. M. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BARA, M. T. F. et al. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16 n. 2, p. 211 - 215, 2006.

BARREIRA, J. C. M. et al. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1106 - 1113, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M., DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113 - 123, 2006.



BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos, Farmacopéia Brasileira, 1 ed., 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, v.1, 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004**. Aprova o regulamento técnico de

Medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução específica (RE/899) de 29 de maio de 2003**. Determina Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, 2003.

BASUALDO, I.; ZARDINI, E.M.; ORTIZ, M. Medicinal plants of Paraguay: underground organs, II. **Economic Botany**, v. 49, n. 4, p. 387 - 394, 1995.

BENETT, R. N.; WALSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**, v.127, p. 617 - 633, 1994.

BILIA, A. R. et al. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 213, p. 199 - 208, 2001.

BONINA, F. et al. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 145, p. 87 - 94, 1996.

BUHLER, F. V.; FERREIRA, J. R. N. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações contendo extratos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. a 5 e 10%. **Revista Perspectiva**. v. 32, p. 47 - 55, 2008.

CALVO, M.I. Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, p. 380 – 382, 2006.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749 -760, 1997.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A. LEKA M. Antioxidant activity of fresh and dried herbs of some Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 93, p. 223 - 226, 2005.

CASSETTA, M.; GOREVIC, PD. Crystal arthritis. Gout and pseudogout in the geriatric patient. **Geriatrics**, v. 59, n. 9, p. 25 - 30, 2004.

CECHINEL FILHO, V; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação Estrutural para otimização da atividade. **Química. Nova**, v. 21 n. 1, p. 99 - 105, 1998.

CHORILLI, M. et al. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88 p.113 - 118, 2007.

CIAGRI. Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares. Disponível em < [http://ci-67.ciagri.usp.br/pm/ver\\_1pl.asp](http://ci-67.ciagri.usp.br/pm/ver_1pl.asp) > Acesso em 10 de maio. 2012.

COMALADA, M.; BALLESTER, I.; BAILON, E. et al. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure–activity relationship. *Biochemical pharmacology*, v. 72, p. 2010 – 2021, 2006.

CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p.73 - 78, 2005.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241 - 256, 2009.

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Av. de Berna/Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 38 - 58, 2005.

DI MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 287 - 295, 2005.

**FARMACOPEIA BRASILEIRA**. 5 ed. Brasília, 2010.

FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H.S. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2101 - 2110, 2000.

FRÖHLICH, J. K. et al. Compostos isolados de *Jatropha isabelli* (Müell Arg) como atividade gastroprotetora. **Saúde**, v. 36, n. 2, p. 19 - 28, 2010.

FRÖHLICH, J. K. Estudo fitoquímico e farmacológico de *Jatropha isabellei* Müll Arg. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2012.

GENNARO, A. R. **Remington**: A ciência e a prática da Farmácia. 20 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

GILANI, A. H.; ATTA-UR-RAHMAN. Trends in ethnopharmacology. **Journal Ethnopharmacology**, v. 100, p. 43 - 49, 2005.

GONÇALVES, A. F. K. **Investigação fitoquímica e avaliação da estabilidade de formulações semi-sólidas contendo *Viola tricolor* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2008.

GUIDA, A.; DE BATTISTA, G.; BARGARDI, S. Actividad antibacteriana de alcaloides de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Ars Pharmaceutica**, v. 44, n. 2, p. 167 - 173, 2003.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 96, n. 2 - 3 p. 202 - 267, 2002.

HERANE, M. I. Actualización terapéutica en acne vulgaris. **Dermatología Pediátrica Latinoamericana**, v. 3, p. 5 - 19, 2005.

HIRATA, L. L. et al. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 418 - 424, 2004.

ISAAC, V.L.B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos; **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 81-96, 2008.

JANNING, D.; ALBUQUERQUE, C. A. C.; BARAUNA, S. C. Avaliação preliminar do extrato hidroalcoólico de *tabernaemontana catharinensis* no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos (*rattus norvegicus*). **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 8, n. 3, p. 53 - 64, 2011.

JOLY A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 12. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

KIBBE, A H. **Handbook of Pharmaceutical Excipientes**, 3 ed. London: Ed. United Kingdom, 2000.

KUSILIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633 - 640, 2004.

LEEUWENBERG, A. J. M. **A Revision of Tabernaemontana: the new World species and Stemmadenia**, The Royal Botanic Gardens: Kew, 1994.

LEONARDI, G. et al. Avaliação e aplicação cosmética de extratos vegetais integrais com atividade antioxidante. **Infarma**. v. 14, n. 7 - 8, 2002.

LIEBERMAN, H. A.; LACHMAN, L.; SCHARTZ, J. B. **Pharmaceutical dosage forms: tablets**. 2. ed. New York: Marcel Dekker; 1989. p.1 - 69

LIGOR, M.; BUSZEWSKI, B. Thin layer chromatographic techniques (TLC, OP TLC) for determination of biological activated compounds from herb extracts. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v. 30, n. 17, p. 2617 - 2628, 2007.

LOPES, A. R. A. et al. Plantas e seus extratos - administração e biodisponibilidade de fitoterápicos aplicados na pele. **Natureza on line**. v. 4, n. 2, p. 62 - 66, 2006.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais Ambiente. **Gestão e Desenvolvimento**, v.1, n.1, p. 19 - 27, 2006.

LORENZI, H.; SANTOS, H. M. Plantas ornamentais no Brasil - arbustos, herbáceas e trepadeiras. São Paulo: Editora Plantarum, 1995.

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

MENSOR, L. L. et al, Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*. v. 15, p. 27-30, 2001.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, G. O. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, 1999.

MORALES, J. F. La familia apocynaceae s. str. (Apocynoideae, Auvolfioideae) en Uruguay. **Darwiniana**, v. 48, n.1, p. 68 - 86, 2010.

NAIRN, J. G. Soluções, emulsões, suspensões e extratos. In: Gennaro AR (Ed.). **Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia**. 20 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 2004.

NISHIKAWA, D. O. et al. Avaliação da estabilidade de máscaras faciais *peel-off* contendo rutina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 227 - 232, 2007.

NUNES, G. P. et al. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 83 - 92, 2003.

PEREIRA, C. G., et al. SFE of pharmacological compounds from *Tabernaemontana catharinensis*: analysis of the antioxidant and antimycobacterial activity. *Proceedings of 6th International Symposium on Supercritical Fluids*, (6th ISSF), Versailles (França), 2003.

PEREIRA, C. G. et al. Antioxidant and antimycobacterial activities of *Tabernaemontana catharinensis* extracts obtained by supercritical CO<sub>2</sub> + cosolvent. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 4, p. 533 - 538, 2005.

PEREIRA, C.G.; CARVALHO, J. E.; MEIRELES, M. A. A.; Anticancer activity of *Tabernaemontana catharinensis* extract obtained by supercritical fluid extraction. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 8, n. 4, p. 144 - 149, 2006.

PEREIRA, P. S. et al. Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and in vitro cytotoxicity. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 20 - 24, 2008.

PERTINO, M. et al. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from Paraguayan crude drug "yagua rova" (*Jatropha isabelli*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 553 - 559, 2007.

PRISTA, L. N et al. **Tecnologia farmacêutica**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

RICE-EVANS, C. A. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, n. 4, p. 375 - 383, 1995.

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

RIMKIENÈ, S.; RAGAZINSKIENÈ, O.; SAVICKIENÈ, N. The cumulation of Wild pansy (*Viola tricolor* L.) accessions: the possibility of species preservation and usage in medicine. **Medicina**, v. 39, n. 4, p. 411 - 416, 2003.

SANTOS, I. S. N. **Avaliação antioxidante dos compostos fenólicos de extracto de planta da flora portuguesa**. (Licenciado), Universidade Fernando Pessoa/Faculdade de Ciências da Saúde (Porto), 2011.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 403 - 434, 2010.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RAZMILIC, I. Antiprotozoal activity of Jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and Jatrophone from *Jatropha isabellii*. **Phytotherapy research**, v. 10, p. 375 - 378, 1996

SILVA R. R. Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina**, Ribeirão Preto, 35: 127 - 133, 2002.

SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed Universidade /UFRGS/ Ed. Universidade/ UFSC, 2004.

SOUZA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351 - 355, 2007.

STASI, L. C. D. **Plantas medicinais: Arte e Ciência**. São Paulo: Ed. Afiliada, 1996.

SULTANA, B.; ANWAR, F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. **Food Chemistry**. v. 108, p. 879 - 884, 2008.

SVANGÅRD, E. et al. Cytotoxic Cyclotides from *Viola tricolor*. **Journal of Natural Product**, v. 67, n. 2, p. 144 - 147, 2004.

TAS, Ç. et al. In vitro release studies os chlorpheniramine maleate from gels prepared by different cellulose derivates. **Il Farmaco**, v. 58, p. 605 - 611, 2003.

TAWAHA, K. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1372 - 1378, 2007.

THEODULOZ, C. et al. Antiproliferative activity of the diterpenes jatrophone and jatropholone and their derivatives. **Planta Medica**, v. 75, n. 14, p. 1520 - 1522, 2009.

TOIU, A. et al. Hplc analysis of salicylic acid derivatives from *Viola* species. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 44, n. 3, p. 357 - 358, 2008.

TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, p. 7 - 13, 2003.

YOTSAWIMONWAT, S. et al. Improvement and stability of Echinacea purpurea dermatological formulations. **International Journal of Cosmetic Science**. v. 32, p. 340 - 46, 2010.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. In: **Plantas medicinais - sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 500p, 2001.

VALENTA, C.; NOWACK, E.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Deoxycholate-hydrogels: novel drug carrier systems for topical use. **International Journal of Pharmaceutics**, v.185, n. 1, p.103 - 111, 1999.

VANHAELEN, M.; LEJOLY, J.; HANOCQ, M. et al. **The Medicinal Plant Industry**, USA, 1991.



VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 4 n. 2, p. 119 - 130, 2007.

VUKICS, V.; KERY, A.; GUTFMAN, A. Analysis of polar antioxidant in heartsease (*Viola tricolor L.*) and Garden Pansy (*Viola x wittrockiana Gams.*). **Journal of Chromatographic Science**. v.46, p. 1 - 5, 2008.

VERONESE, E. L. G. et al. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). **Phytomedicine**, v. 12, p. 123 - 130, 2005.

WITKOWSKA-BANASZCZAK, E. et al. Antimicrobial activity of *Viola tricolor* herb. **Fitoterapia**. v. 76, n. 5, p. 458 - 461, 2005.

WOJDYŁO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, p. 940 - 949, 2007.

ZAGUE, V. Manipulação de Géis Hidrofílicos. **Revista Anfarmag**, n. 60, 2006. Encarte técnico.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165 - 5170, 2001.

ZUANAZZI J. A. S. Flavonóides. In: Simões C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2000.