

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR ESPECTROSCOPIA  
MOLECULAR PARA A QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS EM  
SOLUÇÃO EXTRATIVA DE *Cissus sicyoides* (VITACEAE)

Bolsista: Marcelo Augusto Mota Brito

MANAUS  
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL  
OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR ESPECTROSCOPIA  
MOLECULAR PARA A QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS EM  
SOLUÇÃO EXTRATIVA DE *Cissus sicyoides* (VITACEAE)  
PIB-S/0029/2009

Bolsista: Marcelo Augusto Mota Brito  
Orientador (a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiane Pereira de Souza

MANAUS  
2010

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- <i>Cissus sicyoides</i> L. ....	12
Figura 2- <i>Cissus sycioides</i> L. ....	12
Figura 3- Núcleo básico de um flavonóide.....	13
Figura 4- Complexação de flavonóides com cloreto de Alumínio.....	16
Figura 5- Histograma de distribuição da MPV de <i>C. sicyoides</i> .....	26
Figura 6- Curva de retenção e passagem da MPV de <i>C. sicyoides</i> .....	26
Figura 7- Espectro de varredura da solução extrativa de <i>Cissus sicyoides</i> após hidrólise ácida e complexação com cloreto de alumínio .....	27
Figura 8- Espectro de varredura da do padrão quercetina após complexação com cloreto de alumínio. ....	28
Figura 9- Comparação dos espectros de varredura do padrão 9 (azul) com a solução extrativa (preto) .....	28
Figura 10- Influência de tempo de reação e concentração de $AlCl_3$ nas aborbâncias da solução extrativa de <i>C. sicyoides</i> .....	30
Figura 11- Curva de calibração do padrão quercetina.....	31
Figura 12- Curva de calibração da solução extrativa de <i>Cissus sicyoides</i> .....	32

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Caracterização da matéria-prima vegetal de <i>Cissus sicyoides</i> L. ....	25
Tabela 2- Parâmetros de regressão da curva de calibração para a quercetina.....	31
Tabela 3- Parâmetros de regressão da curva de calibração para a solução extrativa de <i>Cissus sicyoides</i> .....	32
Tabela 4- Reprodutibilidade do padrão quercetina e da solução extrativa.....	33
Tabela 5- Repetibilidade do padrão quercetina e da solução extrativa .....	33

## RESUMO

Dentre as diversas espécies vegetais da região Amazônica com potencial terapêutico, ainda pouco conhecido, destaca-se a espécie *Cissus sicyoides*, chamada popularmente de insulina vegetal e utilizada na medicina popular na terapia de distúrbios hipoglicemiantes, principalmente no combate do diabetes. A escassez de estudos analíticos sobre a espécie, aliada às perspectivas de potencial terapêutico da mesma estimulam o presente trabalho. Alguns estudos fitoquímicos realizados com as partes aéreas da espécie apontam à existência de diversas classes de metabólitos vegetais, os quais podem ser apontados como responsáveis pelas atividades farmacológicas atribuídas a esse vegetal, dentre eles o potencial hipoglicemiante. ALMEIDA et al. (2008), descreve a presença de grande quantidade de  $\alpha$ -tocoferol, glicosídeos cumarínicos, esteróides, quinonas e compostos fenólicos, dentre eles antocianinas e flavonóides como o canferol 3-raminosídeo e a quercetina 3-raminosídeo. Com base neste e em diversos outros estudos fitoquímicos que comprovam a existência de quantidade significativa de flavonóides nas partes aéreas da espécie, vê-se a necessidade de realizar estudos de otimização de metodologia analítica para que se possa fazer a quantificação de compostos flavonoídicos, visto a escassez de estudos analíticos. O presente estudo baseia-se na leitura espectrofotométrica de soluções extrativas das folhas de *Cissus sicyoides* em espectrofotômetro de varredura UV/Vis. A partir da obtenção de duas diferentes soluções extrativas das folhas de *C. sicyoides*, sendo a primeira solução resultante de uma extração sob refluxo da matéria vegetal utilizando metanol como solvente e a segunda solução extrativa obtida através da decocção das folhas em acetona, seguida de hidrólise ácida e partição líquido-líquido em acetato de etila. O método de detecção de flavonóides por espectroscopia utilizado baseia-se no efeito de deslocamento batocrômico das bandas espectroscópicas geradas pela complexação dos flavonóides com cloreto de alumínio. Os ensaios demonstraram que só foi possível a quantificação de flavonóides totais na solução extrativa obtida após hidrólise ácida. Os estudos de otimização mostraram resposta máxima do método quando utilizada a solução extrativa a 1,5% m/v de *C. sicyoides* complexada com solução de cloreto de alumínio a 1,5% no tempo de reação de 15 minutos, apresentando esta conteúdo de flavonóides de  $1,11\text{g}\% \pm 0,006\text{g}\%$ . A partir dos ensaios de validação, verificou-se que o método utilizado apresentou linearidade com  $r^2$  acima de 0,99 e precisão abaixo de 2%.

**Palavras-chaves:** Flavonóides; *Cissus sicyoides*; Metodologia Analítica

## ABSTRACT

Among the various plant species in the Amazon region with therapeutic potential, with lack of research, highlight *Cissus sicyoides* species, popularly called insulin and widely used in folk medicine in the treatment of hypoglycemic disorders, especially in combating diabetes. The lack of analytical studies on the species, combined with the prospects of therapeutic potential in the same foster this work. Some phytochemical study with the aerial parts of the species point to the existence of several classes of plant metabolites, which can be seen as responsible for the pharmacological activities attributed to this plant, among them the potential hypoglycemic agents. ALMEIDA et al. (2008), describes the presence of large amounts of  $\alpha$ -tocopherol, coumarin glycosides, steroids, quinones and phenolic compounds, among them anthocyanins and flavonoids such as kaempferol and quercetin 3-3-raminosídeo raminosídeo. Based on this and several other phytochemicals that studies show the presence of significant amounts of flavonoids in the aerial parts of the species, one sees the need for optimization studies of an analytical methodology that can be done for the quantification of flavonoid compounds, whereas the lack of analytical studies. This study is based on the extractive spectrophotometric determination of solutions of the leaves of *Cissus sicyoides* scanning spectrophotometer UV/Vis. After prepared two different extractives solutions from the leaves of *C. sicyoides*, the first solution resulting from extraction under reflux of plant material using methanol as solvent and the second extractive solution obtained by decoction of the leaves in acetone, followed by acid hydrolysis and liquid-liquid partition into ethyl acetate. The method of detecting flavonoids used for spectroscopy is based on the displacement effect spectroscopy batocromical bands generated by complexation of flavonoids with aluminum chloride. The tests showed that it was only possible to quantify total flavonoids in the extraction solution obtained after acid hydrolysis. The optimization studies showed maximum response of the method when using the extractive solution 1.5% w/v of *C. sicyoides* complexed with aluminum chloride solution to 1.5% in the reaction time of 15 minutes, showing that the flavonoid content was of  $1.11\text{g}\% \pm 0.006\text{g}\%$ . From the validation tests, it was found that the method was linear with  $r^2$  above 0.99 and below 2% accuracy.

**Key-words:** Flavonoids; *Cissus sicyoides*; Analytical Methodology

## SUMÁRIO

Lista de Figuras .....	III
Lista de Tabelas .....	IV
Resumo .....	V
Abstract.....	VI
1.Introdução.....	9
2.Objetivos.....	11
3.Revisão Bibliográfica .....	12
3.1. Características gerais da espécie .....	12
3.2. Composição fitoquímica.....	12
3.3. Metodologia para a detecção de flavonóides.....	14
3.4. Doseamento de flavonóides através de complexação .....	14
3.5. Características Farmacológicas de <i>Cissus sicyoides</i> .....	16
3.6. Controle de Qualidade do Material Vegetal .....	18
4. Materiais e Métodos .....	20
4.1. Matéria-prima Vegetal.....	20
4.1.1. Material Vegetal .....	20
4.1.2. Tratamento do material vegetal e obtenção da matéria prima vegeta .....	20
4.1.3. Caracterização da matéria-prima vegetal .....	20
4.2. Obtenção de soluções extrativas e fracionamento.....	21
4.2.1. Obtenção da solução extrativa sem hidrólise ácida.....	21
4.2.2. Obtenção das soluções extrativas com hidrólise ácida.....	21
4.3. Doseamento de flavonóides por espectroscopia molecular.....	22
4.3.1.Doseamento de flavonóides C-glicosilados e O-glicosilados .....	22
4.3.2. Doseamento de flavonóides O-glicosilados .....	22
4.4. Estudo de otimização.....	23
4.5. Validação da metodologia analítica.....	23
4.6. Análise estatística .....	23
5. Resultados.....	25
5.1. Caracterização da matéria-prima vegetal .....	25
5.2. Ensaios de otimização de metodologia analítica .....	26
5.2.1. Avaliação da influência da relação droga:solvente .....	27

5.2.2. Doseamento de flavonóides totais na solução extrativa sem hidrólise ácida .	29
5.2.3. Doseamento de flavonóides na solução extrativa com hidrólise ácida e influência da concentração do agente complexante e do tempo de reação ...	29
5.2.4. Validação de Metodologia Analítica .....	30
6. Conclusão .....	34
7. Referências Bibliográficas.....	35



## 1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas desde os primórdios das civilizações para a cura dos mais diferentes males. Entretanto, o desenvolvimento e a utilização segura de um medicamento fitoterápico esbarra inicialmente na dificuldade de definição de critérios para a avaliação da qualidade da matéria-prima vegetal e produtos derivados. A problemática no estabelecimento dessas especificações reside no fato de que a constituição química e as características da matéria-prima dependem tanto de fatores agronômicos quanto tecnológicos, relacionados aos procedimentos empregados na transformação de uma droga vegetal em um medicamento. Tais condições dificultam a caracterização da droga vegetal, podendo suas propriedades variar de acordo com a origem e processamento do vegetal. (MAGALHÃES, 1997; LIST E SCHIMIDT, 1989; FARIAS, 2003; MAGLIATO et al 2007)

A identificação e a quantificação química de produtos vegetais constituem outro problema, pois apesar da existência de modernas técnicas de análise química, o controle de qualidade analítico fica dificultado ou mesmo inviabilizado em razão da complexidade química presente no vegetal, onde as substâncias ativas, quando identificadas, geralmente encontram-se presentes em pequenas concentrações, obrigando a utilização de outras substâncias existentes em maiores quantidades, como marcadores químicos, que nem sempre participam da atividade terapêutica (CALIXTO, 2000; BAST et al., 2002). Além disso, cada espécie vegetal representa uma matriz biológica particular, exigindo adequação técnica das metodologias analíticas à sua constituição química a fim de garantir uma quantificação fidedigna das substâncias em estudo. Nesse sentido, as metodologias analíticas devem ser otimizadas e validadas para cada espécie vegetal.

A família *Vitaceae* possui 16 gêneros e cerca de 400 espécies lenhosas em sua maioria trepadeiras, com uma distribuição pantropical. Estudos realizados com algumas espécies de *Cissus* têm revelado várias atividades farmacológicas, dentre as quais, destacam-se as atividades: antioxidante e antimicrobiana, inibidor da enzima acetilcolinesterase, hipoglicemiante, na prevenção da osteoporose, entre outras (VASCONCELOS et al., 2007).

A espécie vegetal *Cissus sicyoides* L. é conhecida popularmente como anil trepador, cipó-pucá, cortina japonesa, uva brava e insulina vegetal. As folhas são empregadas externamente contra o reumatismo e a cura de abscessos. A infusão das folhas e do caule utilizadas na inflamação muscular, epilepsias, derrame cerebral, hipertensão e ativadora da circulação sanguínea. Recentemente, esta espécie vem sendo muito empregada pela população para o tratamento de diabetes, sendo por isso conhecida como "insulina" e motivo para estudos botânicos, químicos e farmacológicos no Brasil e no exterior (VASCONCELOS e col., 2007).

Estudos fitoquímicos realizados com a *Cissus sicyoides* demonstram a presença de polifenóis, destacando os flavonóides como possíveis responsáveis químicos pela atividade hipoglicemiante (BELTRAME et al., 2001; BELTRAME et al., 2002).

A escassez de estudos analíticos sobre a espécie *Cissus sicyoides*, aliada às perspectivas do potencial terapêutico da mesma estimulam o presente trabalho. A caracterização físico-química do material vegetal, visando o estabelecimento de especificações para a qualificação da matéria-prima vegetal, associada ao desenvolvimento de metodologia analítica para o controle de qualidade é de relevada importância para o desenvolvimento de um fitoterápico, uma vez que um dos requisitos fundamentais para assegurar a eficácia e segurança é o estabelecimento de métodos analíticos validados, para o controle tanto da matéria-prima vegetal quanto de produtos intermediários e finais (WORLD, 1998).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral:**

- Otimizar metodologia analítica por espectroscopia molecular para a quantificação de flavonóides totais em solução extrativa de *Cissus sicyoides*.

### **2.2. Específico:**

- Estabelecer as condições ótimas do método analítico para a quantificação de flavonóides totais por espectroscopia;

- Verificar a viabilidade da utilização do método no controle de qualidade de matéria-prima vegetal e produtos derivados;

- Validar metodologia analítica para a quantificação de flavonóides totais por espectroscopia em solução extrativa de *Cissus sicyoides*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Características gerais da espécie

Esta espécie é uma planta herbácea trepadeira, perene, vigorosa, com ramos e folhas um pouco carnosas, possui gavinhas opostas as folhas e raízes aéreas pêndulas, nativa da região norte do Brasil. Folhas simples, membranáceas, glabras, de 4-7cm de comprimento. Flores pequenas, de cor creme, dispostas em inflorescências corimbiformes. Fruto drupa ovóide-globosa, de cor roxo-escuro, com polpa carnosa, contendo uma única semente de cerca de 6 mm de comprimento. Multiplica-se tanto por sementes como pelo enraizamento dos ramos (BELTRAME et al., 2001).



(1)



(2)

**Figuras 1 e 2:** *Cissus sicyoides* L. (Fonte: EMBRAPA, 2009)

#### 3.2. Composição Fitoquímica

Os principais componentes químicos da parte aérea da planta são taninos, esteróides triterpenos, aminoácidos, lipídios e flavonóides. Outra análise fitoquímica da planta mostrou a presença dos alcalóides, quinonas, compostos fenólicos, cumarinas, glicosídeos e de saponinas (ABREU et al., 2002).

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, sendo particularmente importantes para o controle de qualidade de fitoterápicos (ZUANAZZI, 2001).

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Entre elas podemos citar: proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioletas e visíveis, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atraentes de animais com finalidade de polinização; proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; antioxidantes; controle de ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos e inibição de enzimas. Podem ser usados também como marcadores taxonômicos e isto é devido, sobretudo, à sua abundância relativa em quase todo o reino vegetal, especificidade em algumas espécies, relativa estabilidade e seu acúmulo com menor influência do meio ambiente (ZUANAZZI, 2001).

Podem-se encontrar flavonóides em diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes desta classe possui quinze átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas.

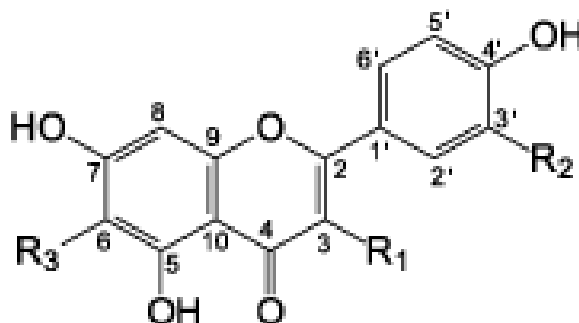


Figura 3. Núcleo básico de um flavonóide (Fonte: Moreira, 2003)

São conhecidos, até o presente, mais de 4200 flavonóides diferentes, sendo que o número de estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos 20 anos. Os flavonóides de origem natural apresentam-se, frequentemente, oxigenados e um grande número deles ocorre conjugado com açúcares. Esta forma, chamada conjugada, também é conhecida como heterosídeo. São denominados de O-heterosídeos quando a ligação se dá por intermédio de uma hidroxila e de C-heterosídeos quando a ligação se dá com um átomo de carbono. Quando o metabólito se encontra sem o açúcar é chamado de aglicona ou genina, sendo frequentemente denominados de forma livre (ZUANAZZI, 2001).

O interesse econômico pelos flavonóides é decorrente de suas diferentes propriedades, como por exemplo, o fato de alguns apresentarem cor e poderem ser usados como pigmentos, sua importância no processo de tanagem do couro, na fermentação do chá-da-índia, na manufatura do cacau e por conferirem cor e valor nutricional para alguns alimentos. Além disso, esses compostos possuem também importância farmacológica, resultado de algumas propriedades atribuídas a alguns representantes da classe, como por exemplo: antitumoral, antiinflamatória, antioxidante, antiviral, entre outras (ZUANAZZI, 2001).

### **3.3. Metodologia para a detecção de flavonóides**

A espectroscopia no ultravioleta é a principal técnica tanto para a detecção quanto para o monitoramento da pureza de derivados flavônicos durante os processos de isolamento. Possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinados pelo núcleo comum da benzopirona, com dois máximos de absorção: um ocorrendo entre 240-285 nm (banda 2) e outro entre 300-400 nm (banda 1). Em geral, a banda 2 pode ser considerada devida a existência do anel A e a banda 1 devida ao anel B. O aumento do grau de hidroxilação do núcleo leva ao aumento do efeito batocrômico e, conseqüentemente, os espectros deslocam-se no sentido dos maiores comprimentos de onda (ZUANAZZI, 2001).

### **3.4. Doseamento de flavonóides através da complexação com $AlCl_3$**

A determinação dos flavonóides em plantas medicinais, como proposto pelas farmacopéias Alemã, Helvética e Italiana, consiste na análise espectrofotométrica do complexo quelato de alumínio após hidrólise e extração com acetato de etila. Este é um método geral e é preconizado para *Passiflora incarnata* e outras espécies ricas em flavonóides tais como *Camomila recutita*, *Crataegus spp* e *Betula alba*. Muitos autores têm atribuído a metodologia muitas fontes de erro analítico, uma vez que o método foi desenvolvido especificamente para analisar flavonóides O-glicosilados e não para flavonóides C-glicosilados, que resistem à hidrólise ácida. Os C-glicosilados são menos solúveis em acetato de etila (solvente utilizado para a extração) do que as agliconas de flavonas e podem permanecer na fase aquosa após hidrólise, fase esta que é descartada.

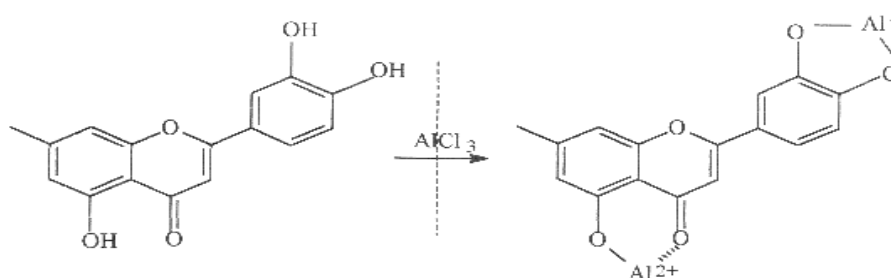
Durante a hidrólise ácida, podem sofrer isomerização, denominada rearranjo de Wesseley-Moser, formando misturas de 8-C-glicosídeo e 6-C-glicosídeo (MARKHAM, 1982).

O uso do cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) no diagnóstico da presença de alguns grupamentos químicos foi, pela primeira vez, empregado para antocianinas. Trata-se de uma classe de pigmentos do grupo dos flavonóides, encontrados principalmente em flores, mas muitas vezes também em frutos, e que dão ao órgão vegetal colorações que podem variar do vermelho ao azul, passando por todos os matizes intermediários. Em 1954, Harborne sugeriu o uso do cloreto de alumínio para a determinação espectrofotométrica da presença de certos grupamentos químicos em flavonóides (MABRY et al., 1970). Da década de 60 em diante, o composto passou a ser largamente empregado como um reagente de desvios ("shift reagent") em espectrometria no UV-visível para a determinação estrutural de flavonóides (MABRY et al., 1970; MARKHAM, 1982).

Mais recentemente, foi proposta a utilização de métodos espectrofotométricos para a determinação de flavonóides totais em plantas, utilizando-se  $\text{AlCl}_3$  (SCHMIDT e ORTEGA, 1993). VENNAT et al. (1992) desenvolveram um método para determinar o teor de flavonóides em uma planta, adaptando o método descrito por DOWD (1959) para a quercetina, o qual se baseia no uso de cloreto de alumínio (WOISKY, 1996). O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. A leitura é feita em espectrofotômetro a 425 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 2% em metanol (WOISKY, 1996; WOISKY e SALATINO, 1998). Nessas condições, o complexo flavonóide-Al absorve em comprimento de onda bem maior do que o flavonóide sem a presença do agente complexante. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com  $\text{AlCl}_3$ , absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorbância.

O uso do cloreto de alumínio para a determinação da quantidade de flavonóides

totais não é, no entanto, um procedimento isento de limitações. O método é preciso, reproduzível, fornecendo desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro com a mesma amostra. No entanto, ele pode ser pouco exato, ou seja, o valor que ele fornece pode ser diferente (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonóides totais realmente presente na amostra analisada. O valor medido e o valor real são tanto mais próximos entre si quanto maior a proporção de flavonóis na amostra, e tanto mais distantes quanto maior a proporção de flavonas. Isso se deve ao fato de que o comprimento de onda selecionado (425 nm) corresponde à banda de absorção do complexo quercetina-Al. A quercetina é um flavonol, certamente o mais comum dos flavonóides encontrado nas plantas. Os complexos dos outros flavonóis com alumínio absorvem bem próximo de 425 nm, mas os complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que causa uma subestimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas (ZUANAZZI, 2001).



**Figura 4: Complexação de flavonóides com cloreto de Alumínio.**  
(Fonte: ZUANAZZI, 2001)

### 3.5. Características Farmacológicas de *Cissus sicyoides*

A espécie vegetal *Cissus sicyoides* L. é conhecida popularmente principalmente com o nome de insulina vegetal. As folhas são empregadas externamente contra o reumatismo, a cura de abscessos, a infusão das folhas e do caule é utilizada na inflamação muscular, epilepsias, derrame cerebral, hipertensão e ativadora da circulação sanguínea. Recentemente, esta espécie vem sendo muito empregada pela população para o tratamento de diabetes, sendo por isso conhecida como "insulina" e motivo para estudos botânicos, químicos e farmacológicos no Brasil e no exterior (VASCONCELOS e col., 2007).

O uso popular da planta ocorre concomitantemente ou em substituição ao tratamento médico convencional. Porém, verificou-se a inexistência de estudos que



comprovem o potencial antidiabético desta planta. Outro aspecto preocupante é o fato de que o diabetes tipo 2, embora assintomático, quando não tratado adequadamente, leva ao desenvolvimento de complicações crônicas (neuropatia diabética, dislipidemia, insuficiência renal etc.), que comprometem a qualidade de vida do paciente diabético. (BELTRAME, 2001)

BELTRAME e col. (2001) realizaram ensaios *in vitro* com extratos das folhas de *Cissus sicyoides*, com o intuito de verificar seu potencial antidiabético ou relacionar a presença de flavonóides como causa deste efeito hipoglicemiante, no entanto seus resultados não apontaram a diminuição da glicemia, o que não forneceu ferramentas para confirmar tal hipótese, apesar da presença de grande quantidade de substâncias com potencial antidiabético na espécie. Por outro lado, VASCONCELOS (2004) e VASCONCELOS et al. (2007), observaram em estudos pré-clínicos, utilizando a fração aquosa das folhas de *Cissus sicyoides*, em camundongos *Swiss* machos normais que a glicemia teve tendência à queda sem caracterizar diferença significativa entre o tempo basal e sete dias de tratamento e em humanos, clinicamente normais, de ambos os sexos, o infuso não foi capaz de diminuir a glicemia, significativamente, num período de oito semanas.

BARBOSA et al. (2002), administraram extrato aquoso (5 folhas = 12 g em 1000 mL de água por 1 minuto) de *Cissus verticillata*, em substituição da água, em ratos normoglicêmicos por 30 dias. Constataram efeito hipoglicemiante que foi atribuído à presença de flavonóides encontrados em grande quantidade no chá e de canferol livre possivelmente acompanhado de seu glicosídeo, o que justificaria, ao menos em parte, a atividade hipoglicemiante do vegetal *in vivo*. Em estudos pré-clínicos, MORI et al., (2001) verificaram atividade hipoglicemiante com o extrato da folhas de *Cissus sicyoides*. Verificaram que a glicemia plasmática dos animais diminuiu significativamente 1 hora após uma carga de sacarose e concluíram que a ingestão do extrato do vegetal impede o aumento da glicose depois da refeição. Desse modo, a literatura relata que tem sido investigado possível efeito hipoglicemiante com as folhas *Cissus sicyoides*, havendo relatos contraditórios quanto a essa atividade. SILVA et al. (1996), BELTRAME et al. (2001), BELTRAME et al. (2002), VASCONCELOS, (2004) e LIMA (2007) não observaram essa atividade diferentemente de MORI et al. (2001), BARBOSA et al. (2002), PEPATO et al. (2003) e VIANA et al. (2004).

FERREIRA e col. (2008) em seus estudos com a espécie, comprovaram através de ensaios in vivo com a espécie que a mesma possui relevante efeito gastroprotetor quando comparado às drogas padrão, inibindo consideravelmente o desenvolvimento de lesões gástricas mesmo em doses menores.

GARCIA et al (1997) sugeriram um mecanismo do efeito moderador nos níveis de cálcio plasmático e celular, possível responsável por efeitos cardíacos e vasculares da planta.

GARCIA et al (1999) e DORO et al (1997) comprovaram a eficácia de extratos da planta contra bactérias dos tipos Gram-negativas e Gram-positivas e atribuíram esta atividade farmacológica à presença de grande quantidade de compostos fenólicos. Além disso, através da administração tópica e oral de extratos obtidos a partir de decocção das folhas de *Cissus sicyoides*, GARCIA et al (1999) comprovaram a existência de grande potencial antiinflamatório na espécie.

### **3.6. Controle de Qualidade do Material Vegetal**

Em nível mundial, uma série de resoluções vem sendo estabelecida no sentido de desenvolver critérios científicos e métodos de comprovação da segurança e eficácia dos produtos de origem vegetal (WORLD, 2002). No Brasil, a RDC n. 48 de março de 2004, mais recente resolução, normatiza a regulamentação para registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária, e dentre as exigências para o registro de um fitoterápico, destacam-se as especificações sobre a qualidade da matéria-prima vegetal, comprovação da eficácia e segurança, relatório descritivo de fabricação com especificação das operações e métodos utilizados, bem como de metodologia analítica para o controle de qualidade em todas as etapas do processo (BRASIL, 2004).

A transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de sua utilização, sem deixar de valorizar seu potencial terapêutico. Para alcançar esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer estudos

prévios relativos ao desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas. É justamente essa fundamentação científica que diferencia o produto fitoterápico propriamente dito das plantas medicinais e das preparações utilizadas na medicina popular (SONAGLIO et al., 2001)

Desta forma, justamente por serem menos estáveis, as soluções extrativas de produtos fitoterápicos passam por um controle de qualidade mais acirrado. O método de extração deve estar de acordo com as necessidades dos constituintes, como pH, temperatura e solubilidade. Também é de vital importância o conhecimento das circunstâncias da matéria-prima vegetal. Também devem ser estabelecidos marcadores químicos, a propósito de identificação analítica (ONG, 2004; CALIXTO, 2000).

A caracterização físico-química do material vegetal, visando o estabelecimento de especificações para a qualificação de matéria-prima vegetal, associada ao desenvolvimento de metodologia analítica para o controle de qualidade é de relevada importância para o desenvolvimento de um fitoterápico, uma vez que um dos requisitos fundamentais para assegurar a eficácia e segurança é o estabelecimento de métodos analíticos validados, para o controle tanto da matéria-prima vegetal quanto de produtos intermediários e finais (WORLD, 1998).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Matéria-prima Vegetal**

#### **4.1.1. Material Vegetal**

O material vegetal é constituído de folhas de *Cissus sicyoides* fornecido pela EMBRAPA Amazônia Ocidental. As plantas foram colhidas com aproximadamente um ano de idade em fase reprodutiva.

#### **4.1.2. Tratamento do material vegetal e obtenção da matéria-prima vegetal**

O material vegetal recebido foi selecionado, manualmente, sendo separadas as folhas dos ramos para tratamento individual. As folhas foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante à temperatura de 45,0 °C, até estabilização da umidade residual. Após a secagem, o material foi moído em moinhos de facas.

#### **4.1.3. Caracterização da matéria-prima vegetal**

##### **Determinação de perda por dessecação (F. Bras. IV, 1988)**

Aproximadamente 0,500 g de matéria-prima vegetal foi colocado em um pesa-filtro, devidamente tarado, levada a estufa e aquecida a 105°C até que a amostra atingisse peso constante. Após estabilização do peso, foi calculada a diferença de peso inicial e final da amostra, determinando-se a perda por dessecação.

##### **Análise granulométrica por tamisação (VOIGT, 2000)**

Realizada através de tamisação utilizando equipamento com velocidade controlada e tamises com aberturas de malhas previamente conhecidas. A partir das curvas de retenção e passagem foi calculado o diâmetro médio de partícula e histograma de distribuição granulométrica.

## **Teor de extrativos (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)**

Determinado por gravimetria a partir de uma solução extrativa aquosa a 1% de droga vegetal utilizando decocção como método de extração.

### **4.2. Obtenção das soluções extrativas e fracionamento**

#### **4.2.1. Obtenção da solução extrativa sem hidrólise ácida**

A solução extrativa foi obtida a partir da decocção das folhas de *Cissus sicyoides*. Pesou-se 0,4g da matéria-prima vegetal e fez-se a extração sob refluxo com metanol. O processo de extração consistiu em adicionar 30 ml de metanol aos 0,4g de matéria vegetal e fazer a decocção sob refluxo por 15 minutos. O decocto foi então filtrado em algodão e posto novamente sob refluxo adicionando-se 30 ml de metanol. Esse processo foi repetido por duas vezes. O filtrado resultante foi colocado em um mesmo balão volumétrico e o volume completado para 100 ml.

#### **4.2.2. Obtenção das soluções extrativas com hidrólise ácida (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)**

As três soluções extrativas foram obtidas através do método de decocção sob refluxo, utilizando 0,4g, 1,0g e 1,5g de matéria-prima vegetal de *Cissus sicyoides* adicionadas de 1 ml de solução aquosa de metenoamina 0,5% (m/v), 2 ml de ácido clorídrico e 20 ml de acetona. A mistura foi aquecida em banho de água sob refluxo durante 30 minutos, posteriormente, após resfriada, a solução foi filtrada em algodão. O resíduo da planta juntamente com o algodão utilizado na filtração foram submetidos a decocção sob refluxo por mais duas vezes juntamente com 20 ml de acetona durante 10 minutos. Após filtração e resfriamento, os filtrados foram juntados em um balão volumétrico de 100 ml. O volume foi completado com acetona, obtendo-se a solução extrativa hidrolisada.

A segunda etapa consiste na partição líquido-líquido da solução extrativa hidrolisada obtida, com solvente orgânico, no caso, acetato de etila. Em um funil de separação, 20ml da solução extrativa hidrolisada juntamente com 20 ml de água foram

tratados com 15 ml de acetato de etila. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes com porções de 10 ml de acetato de etila. Descartou-se a fase aquosa resultante da partição e lavou-se a fase orgânica com duas porções de 50 ml de água para retirada de impurezas. Após lavada, a fase orgânica foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL no qual o volume foi completado com acetato de etila.

### **4.3. Doseamento de flavonóides por espectroscopia molecular**

#### **4.3.1. Doseamento de flavonóides totais (C-glicosilados e O-glicosilados) (SCHIMIDT e GONZÁLEZ ORTEGA, 1993; PETRY et al, 1998)**

O doseamento de flavonóides totais foi realizado utilizando-se o extrato metanólico das folhas de *Cissus sicyodes*, ou seja, a partir do extrato sem hidrólise. A análise foi realizada em espectrofotômetro molecular de varredura utilizando-se como método de quantificação de flavonóides a complexação dos mesmos com agente complexante adequado, neste experimento foi utilizado o cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) como agente complexante. A leitura foi realizada em comprimento de onda determinado através de varredura. O experimento foi feito em triplicata.

#### **4.3.2. Doseamento de flavonóides O-glicosilados (SOARES et al, 2003)**

O doseamento de flavonóides O-glicosilados foi realizado fazendo-se a varredura em espectrofotômetro molecular a partir da solução fracionada de flavonóides, ou seja, a solução em que foi realizado o processo de hidrólise ácida seguido de partição líquido-líquido com acetato de etila. A solução utilizada na leitura espectrofotométrica foi obtida a partir da diluição de quantidades iguais da solução fracionada e cloreto de alumínio em solução metanólica de ácido acético (solução de compensação). Fez-se a quantificação dos flavonóides no espectrofotômetro tomando-se como base o deslocamento batocrômico do espectro característico do flavonóide após complexação com cloreto de alumínio. A leitura foi realizada em comprimento de onda determinado através de varredura (416 nm). O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.4. Estudo de otimização do tempo de leitura e da concentração de AlCl<sub>3</sub> (cloreto de alumínio)

O estudo de otimização foi realizado utilizando como base um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, tendo como fatores variantes o tempo de leitura e a concentração de cloreto de alumínio. A variante tempo de leitura se baseia em tempos de 15 e 30 minutos para a leitura do espectro após a adição do cloreto de alumínio à solução extrativa e a variante concentração de cloreto de alumínio se baseia no uso de soluções de 1,5% ;3,0% e 5,0% de cloreto de alumínio.

#### 4.5. Quantificação do teor de flavonóides totais

O teor de flavonóides totais (TFT), expressos como quercetina, foi calculado segundo a equação 1.

$$TFT = \frac{A1 \cdot FD}{(m - pd) \cdot A_{1cm}^{1\%}} \text{ (Equação 1)}$$

Onde: TFT = teor de flavonóides totais (g%), FD = fator de diluição, m = massa da amostra (g), pd = perda por dessecação da amostra (g%) e  $A_{1cm}^{1\%}$  = Coeficiente de absorção específico da quercetina (500)

#### 4.6. Validação da metodologia analítica (USP, 25; ICH, 1995)

Os métodos foram validados através da realização de ensaios de linearidade e precisão.

##### *Linearidade*

A linearidade foi determinada através da construção de curvas de calibração para o padrão quercetina e para a solução extrativa de *Cissus sicyoides*. Foram construídas três curvas de calibração.

### ***Precisão***

A precisão intermediária foi determinada através da reprodutibilidade e repetibilidade. A reprodutibilidade foi determinada pela análise de três concentrações diferentes (média, baixa e alta) do padrão e solução extrativa em três dias diferentes em triplicata cada. A repetibilidade foi determinada pela análise de uma mesma concentração, no mesmo dia, em sextuplicata.

### ***Exatidão***

O ensaio de exatidão foi realizado através do ensaio de recuperação, onde quantidades conhecidas do padrão de quercetina foram adicionados em triplicata à solução extrativa em três níveis de concentração baixo, médio e alto (40 µg/mL). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 416 nm após complexação com  $\text{AlCl}_3$ .

## **4.7. Análise Estatística**

A análise estatística consta de análise de variância (ANOVA) *two-way* e regressão linear realizada utilizando o pacote estatístico Excel v. 2003.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização da matéria-prima vegetal

Foram realizados três diferentes ensaios de caracterização de matéria-prima vegetal, para obtenção de informações tecnológicas relevantes sobre a amostra utilizada nos ensaios espectrofotométricos, os ensaios de caracterização consistiram em: ensaio de gravimetria por perda por dessecação (grau de umidade da matéria-prima vegetal), granulometria (diâmetro médio das partículas da matéria-prima vegetal) e método de teor de extrativos. As três metodologias foram realizadas e os resultados obtidos encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Resultados da caracterização da matéria-prima vegetal de *Cissus sicyoides L.*

<b>Ensaio</b>	<b>Resultado</b>
Perda por dessecação (%)	14,19 ± 0,32
Teor de extrativos (g%)	9,59 ± 0,86
Diâmetro (µm)	468,96

Pode ser observado que o teor de umidade encontra-se um pouco acima do recomendado para armazenamento segura da MPV que é de 14%. Além disso, o teor de extrativo, o qual representa o teor de sólidos solúveis pela água, é bastante baixo quando comparado com outras espécies vegetais, indicando assim que a água não é um bom líquido extrator.

A figura 5 e figura 6 demonstram o perfil de distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal. Pode ser verificado, destacadamente, duas faixas granulométricas predominante, entre 600- 500 nm e abaixo de 355 nm. No entanto, o diâmetro médio de partícula é de 468,96 nm, valor este, adequado para obtenção de soluções extrativas.

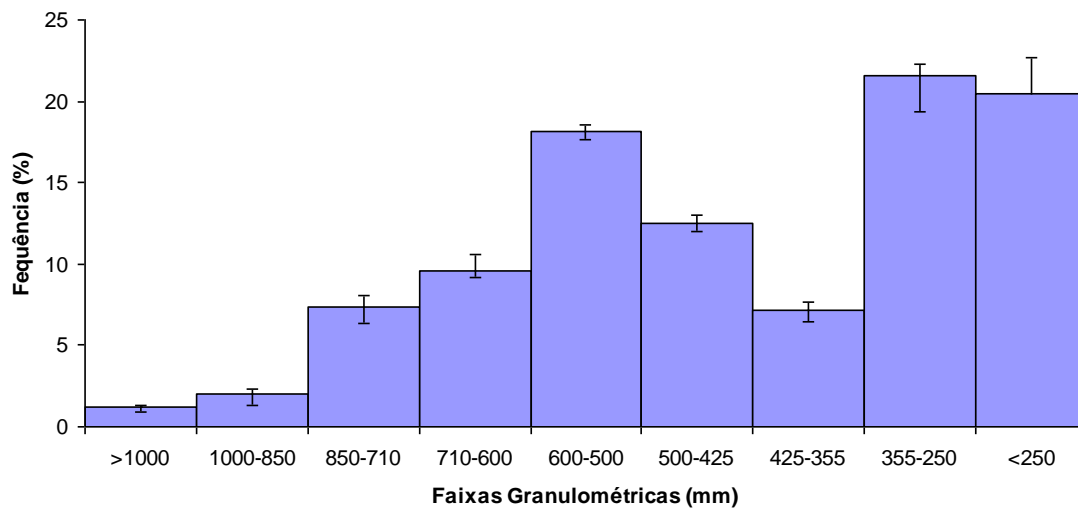


Figura 5: Histograma de distribuição da MPV de *C. sicyoides*

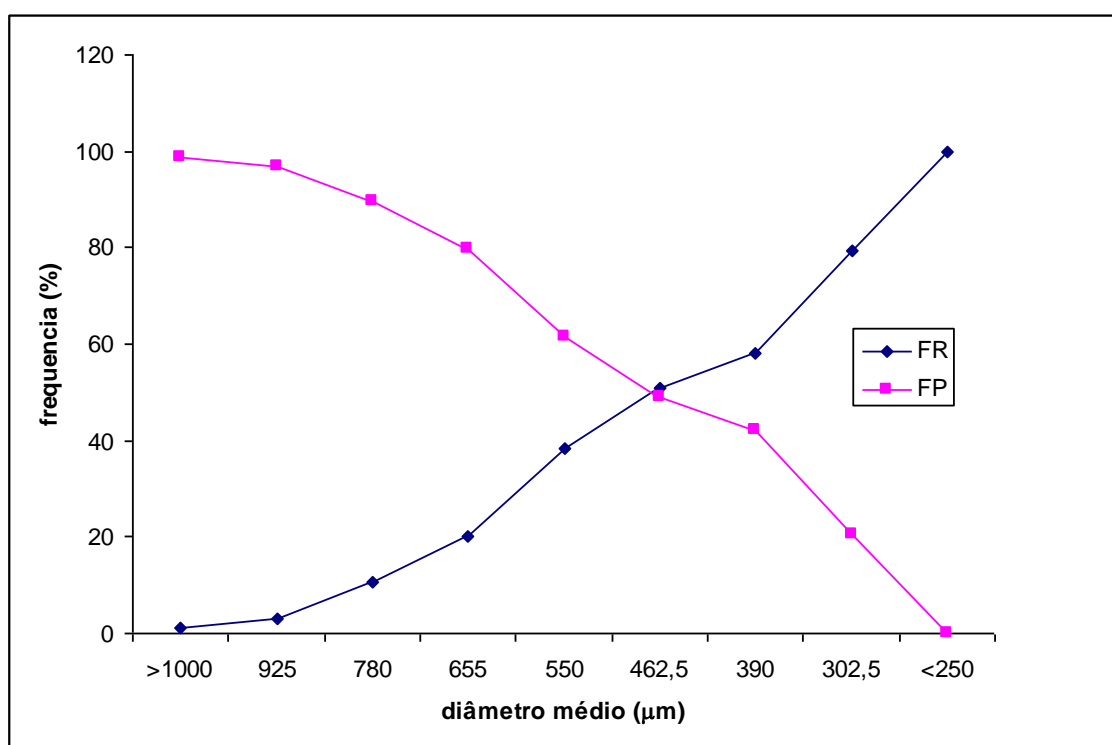


Figura 6: Curva de retenção e passagem da MPV de *C. sicyoides*

## 5.2. Ensaios de otimização de metodologia analítica

### 5.2.1 Avaliação da influência da relação droga:solvente na determinação do teor de flavonóides

A quantidade de matéria-prima vegetal utilizada na preparação das soluções extrativas mostrou-se um fator determinante na determinação do teor de flavonóides, visto que, as soluções extrativas feitas a partir de 0,5g e 1,0g de matéria-prima vegetal não apresentaram espectro de absorção favorável à quantificação de flavonóides. A solução extrativa contendo 1,5g de matéria-prima vegetal foi a solução preconizada para a realização das análises espectrofotométricas, visto que apresentou espectro de absorção favorável ao doseamento de flavonóides (figura 7) no comprimento de onda utilizado (416 nm). Sendo assim, os resultados obtidos corresponderam às expectativas, pois o aumento da relação droga:solvente demonstrou um maior rendimento quanto ao teor de flavonóides.

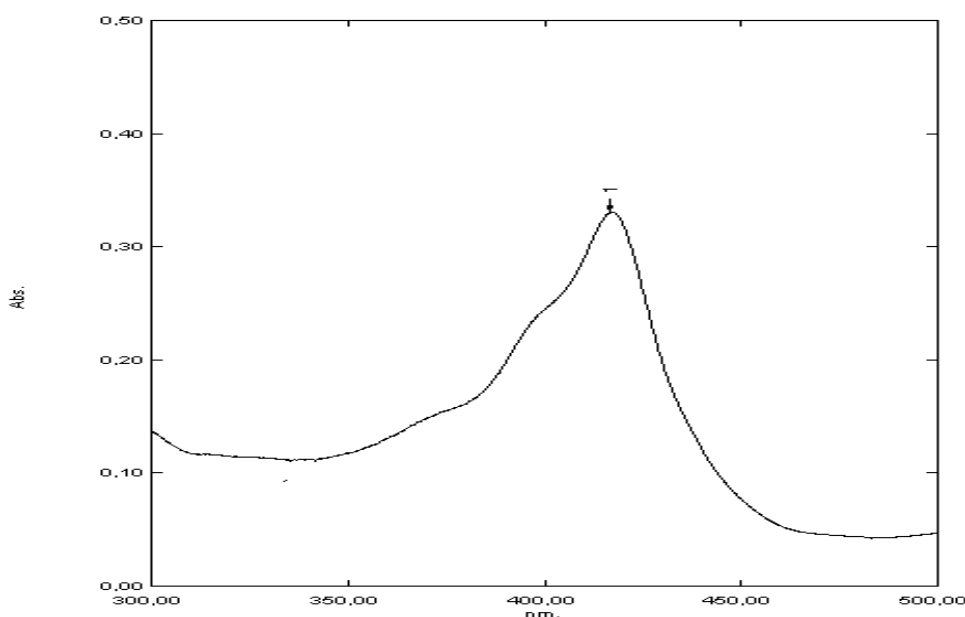


Figura 7: Espectro de varredura da solução extrativa de *Cissus sicyoides* após hidrólise ácida e complexação com cloreto de alumínio

A seleção do comprimento de onda foi feita com base na comparação entre os espectros de varredura da solução extrativa e da quercetina (figura 8 e figura 9). Pode ser observado uma semelhança no máximo de absorção na região do visível de 416 nm. Sendo este o comprimento de onda selecionado para a realização dos experimentos.

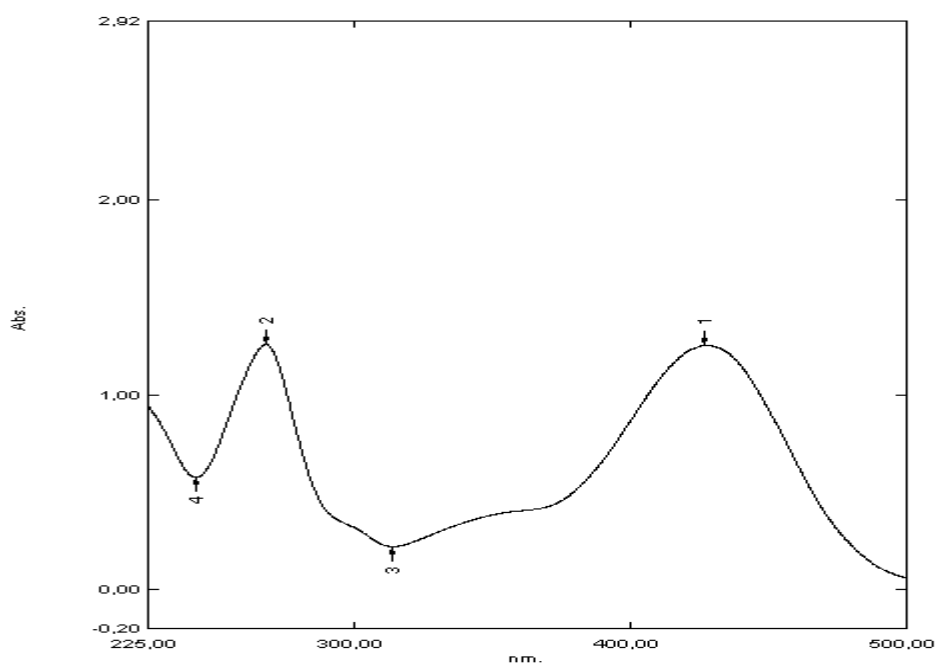


Figura 8: Espectro de varredura da do padrão quercetina após complexação com cloreto de alumínio.

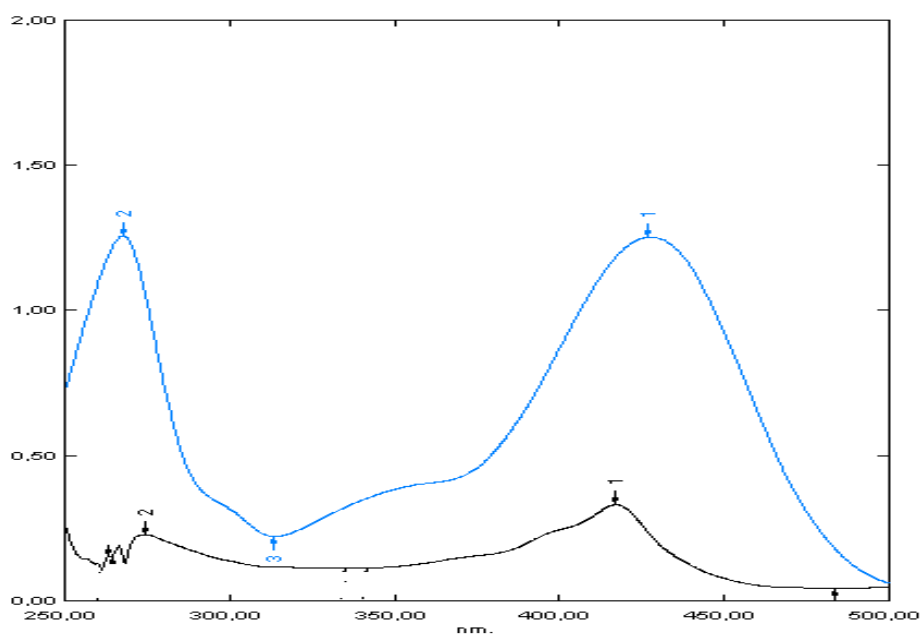


Figura 9: Comparação dos espectros de varredura do padrão 9 (azul) com a solução extrativa (preto)

### **5.2.2 Doseamento de flavonóides totais na solução extrativa sem hidrólise ácida**

A metodologia utilizada não apresentou resultados satisfatórios, visto que o extrato metanólico sem hidrólise ácida não apresentou as bandas características dos flavonóides no espectro de absorção e portanto não foi possível realizar estudos de otimização ou mesmo o doseamento de flavonóides através desta técnica. Sendo assim, concluiu-se que seguindo esta metodologia não é possível determinar a quantidade de flavonóides na espécie vegetal *C. sicyoides*.

### **5.2.3 Doseamento de flavonóides na solução extrativa com hidrólise ácida e influência da concentração do agente complexante e do tempo de reação**

Os estudos de otimização mostraram que não há influência significativa da concentração do agente complexante sobre o teor de flavonóides totais (figura 9). As análises espectrofotométricas realizadas através da complexação dos flavonóides contidos na solução extrativa de *C. sicyoides* com as soluções de cloreto de alumínio a 1,5; 3,0 e 5,0% determinaram uma pequena variação de resposta em absorbância. Quando utilizada a solução de cloreto de alumínio a 1,5%, a absorbância manteve-se em torno de 0,450, sendo que com o aumento da concentração de cloreto de alumínio não houve aumento significativo desta absorbância. Quanto ao tempo de reação, observou-se pequena variação na absorbância quando medida em 15 e 30 minutos, com aparente estabilização da absorbância no tempo de 30 minutos, ou seja, essa variável também não é de influência significativa na análise.

Assim, o teor de flavonóides totais encontrado na solução extrativa de *C. sicyoides* a 1,5% m/v foi de 1,11g%  $\pm 0,006$ .

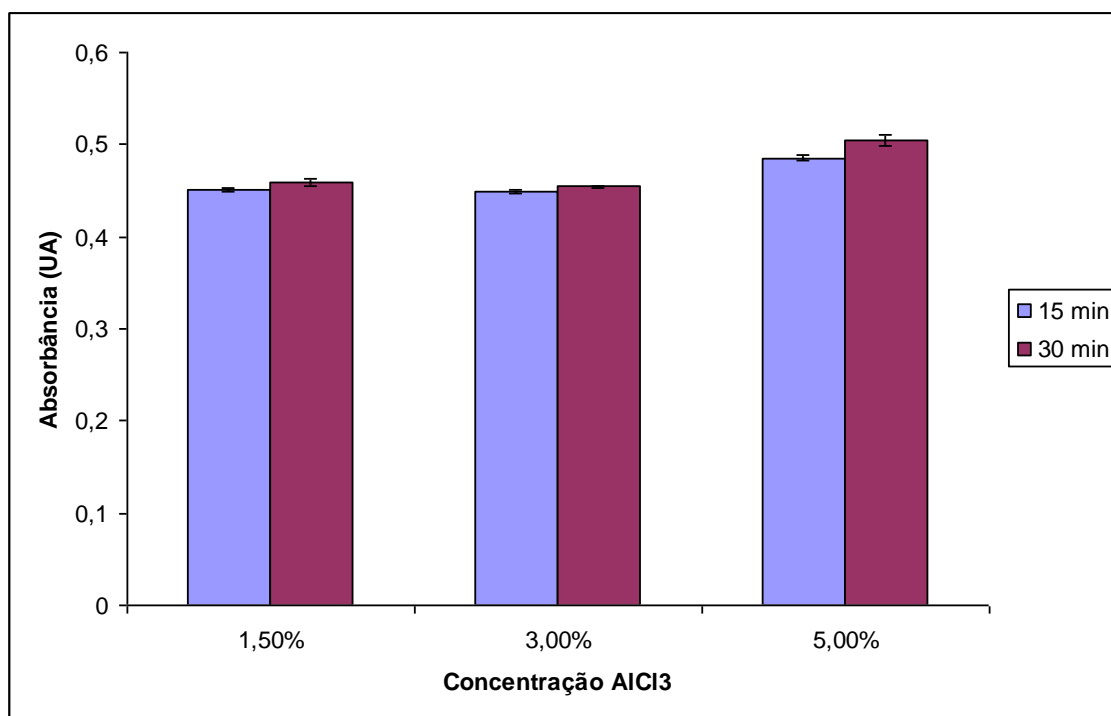


Figura 10: Influência de tempo de reação e concentração de AlCl<sub>3</sub> nas aborbâncias da solução extrativa de *C. sicyoides*

#### 5.2.4 Validação de Metodologia Analítica

O ensaio de validação analítica foi realizado apenas para o método com hidrólise ácida, uma vez que a metodologia sem hidrólise não foi viável para quantificação dos flavonóides. Além disso, não foi

##### *Linearidade*

A curva de calibração do padrão de quercetina (figura 10, tabela 2) apresentou linearidade significativa com  $r^2$  de 0,9984, da mesma forma a curva de calibração da solução extrativa também demonstrou linearidade com  $r^2$  de 0,9950 (figura 11, tabela 3). Esses resultados evidenciam que o método apresenta faixa de trabalho adequado a quantificação dos flavonóides totais em solução extrativa de *C. sicyoides*.

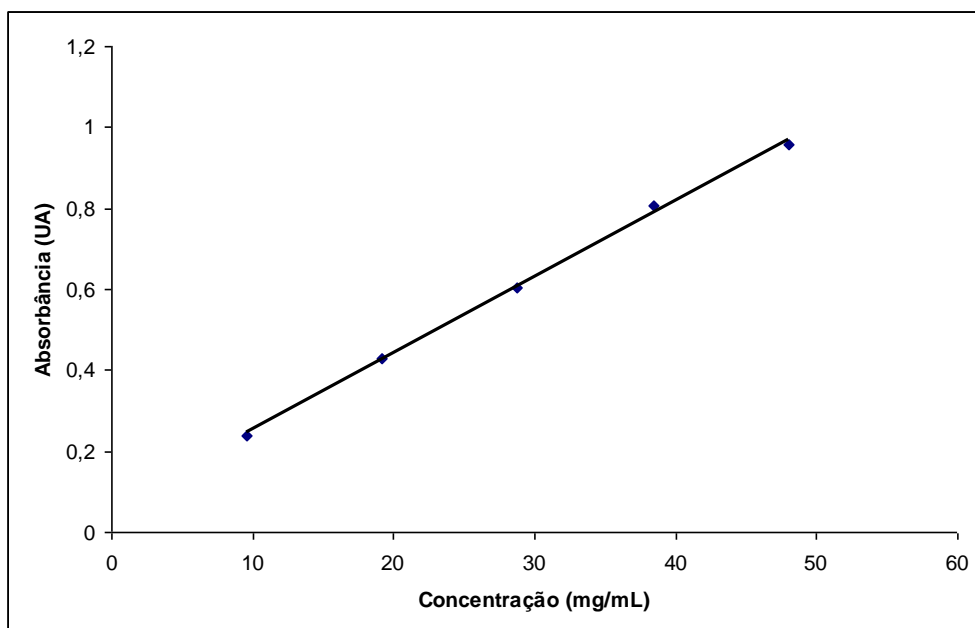


Figura 11: Curva de calibração do padrão quercetina

Tabela 2 - Parâmetros de regressão da curva de calibração para a quercetina

Parâmetros da regressão	$\lambda = 416 \text{ nm}$
Interseção	0,0632
Inclinação	0,0189
$R^2$	0,9984

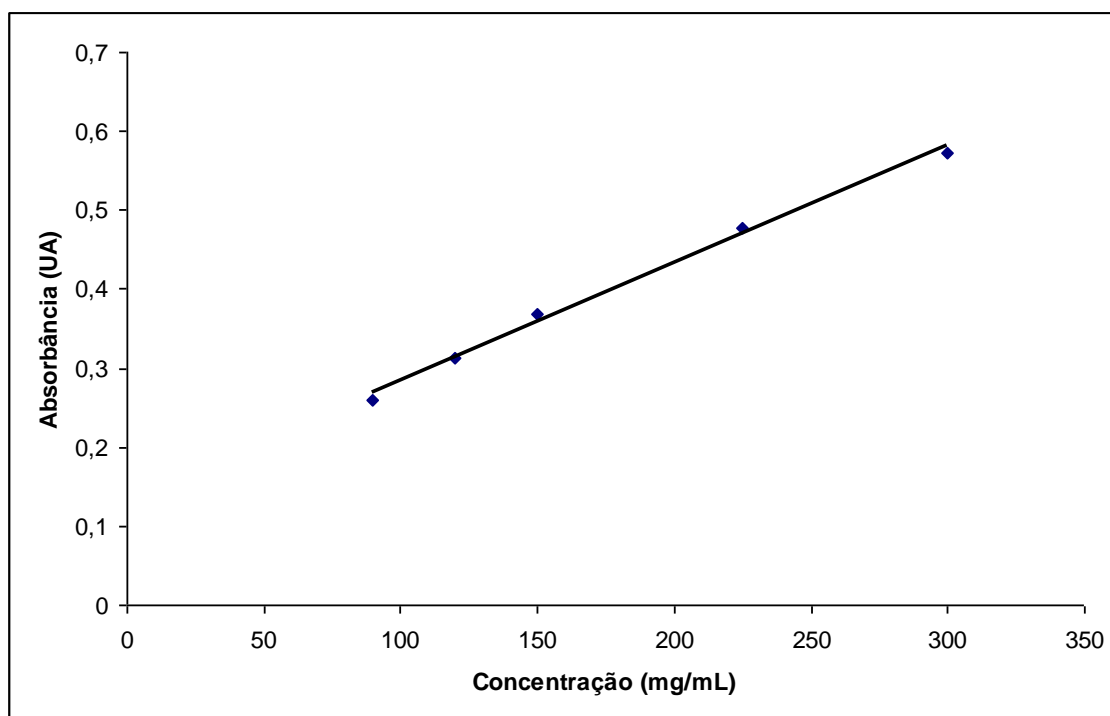


Figura 12: Curva de calibração da solução extrativa de *Cissus sicyoides*

Tabela 3 - Parâmetros de regressão da curva de calibração para a solução extrativa de *Cissus sicyoides*

Parâmetros da regressão	$\lambda = 416 \text{ nm}$
Interseção	0,1346
Inclinação	0,00149
$R^2$	0,9950

### **Precisão**

Os resultados do ensaio de reprodutibilidade pode ser visualizados na tabela 4 e de repetibilidade na tabela 5, para as amostras padrão de quercetina e solução extrativa.

Verifica-se que em ambos os casos os resultados de coeficiente de variação foram bem baixos, abaixo de 2%, indicando a excelente precisão da metodologia.



Tabela 4: Reprodutibilidade do padrão quercetina e da solução extrativa

Concentração (mg/mL)	Quercetina (UA) $X \pm s$ (CV%)	Concentração (mg/mL)	Solução extrativa (UA) $X \pm s$
19,2	$0,4287 \pm 0,003$ (0,82)	120,0	$0,3127 \pm 0,003$ (0,92)
28,8	$0,6027 \pm 0,005$ (0,78)	150,0	$0,3690 \pm 0,005$ (1,43)
38,4	$0,8056 \pm 0,004$ (0,50)	225,0	$0,4763 \pm 0,005$ (1,03)

Tabela 5: Repetibilidade do padrão quercetina e da solução extrativa

Concentração (mg/mL)	Quercetina (UA) $X \pm s$ (CV%)	Concentração (mg/mL)	Solução extrativa (UA) $X \pm s$
25,6	$0,4518 \pm 0,0004$ (0,09)	150,0	$0,3528 \pm 0,0004$ (0,11)

### ***Exatidão***

Não foi possível a realização desse ensaio uma vez que as amostras de solução extrativa ao serem contaminadas com concentrações conhecidas dos padrão quercetina apresentavam absorvância acima de 1,0 UA, ou seja, contrariando a lei de Lambert-Beer, que diz que as absorvâncias de leitura em UV/VIS devem sempre está na faixa de 0,2 a 0,9 UA.

As amostras, padrão e solução extrativa, quando lidas individualmente apresentavam absorvância na faixa aceitável e mesmo misturando as duas amostras, também estariam na faixa aceitável, no entanto, experimentalmente não foi o que aconteceu, uma vez que houve uma aumento considerável da absorvância impedindo, inclusive a leitura. Tal fato, indica que não há exatidão da metodologia.

## 6. CONCLUSÃO

O estudo revelou que o método utilizado para a quantificação de flavonóides totais, através de hidrólise ácida, é adequado para soluções extrativas da espécie *Cissus sicyoides* desde que feitas algumas alterações, tais como relação droga:solvente, com o intuito único de melhorar a técnica de quantificação de flavonóides, considerando as características intrínsecas desta espécie vegetal.

Levando em consideração o estudo de otimização feito a partir das soluções extrativas de *C. sicyoides*, as condições escolhidas como mais favoráveis à resposta positiva do método foram a realização dos ensaios analíticos utilizando a solução extrativa a 1,5% m/v seguida de hidrólise ácida e partição líquido-líquido, complexada com cloreto de alumínio a 1,5% em 15 minutos de reação.

Não foi observada influência significativa dos fatores tempo de reação e concentração do agente complexante na resposta da metodologia analítica.

Os resultados mostraram-se satisfatórios às expectativas devido à observação da presença maior de flavonóides em soluções extrativas com maior quantidade de droga vegetal e devido ao fato de que o método de melhor resposta utiliza menor quantidade de agente complexante e um menor tempo de reação para resposta máxima, considerando necessidade do desenvolvimento de métodos extrativos e analíticos menos dispendiosos.

O método foi viável de validação através de linearidade e precisão, não apresentando no entanto exatidão. Assim, pode ser concluído que a metodologia pode ser utilizada para a quantificação de flavonóides apenas como parâmetro de qualidade e reprodutibilidade de resultados, não servindo, no entanto para a quantificação exata dessas substâncias na espécie vegetal estudada.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I.N.; PINTO, B.P.; FURTININETO, A.E.;BERTOLUCCI S.K.V.; LADEIRA A & GEROMEL C. Nitrogênio e fósforo na produção vegetal e na indução de mucilagem em plantas de insulina. Horticultura Brasileira 20: 536-540, 2002.

ALMEIDA, R.E.; OLIVEIRA, K.R.O.; COUTO, R.G.B.L.; ISHIGAMI, A.B.M. Anxiolytic and Anticonvulsant Effects on Mice of Flavonoids, Linalool and  $\alpha$ -Tocopherol Presents in the Extract of Leaves of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). Journal of Biomedicine and Biotechnology. Vol. 2009, 6 p., 2009.

BARBOSA W.L.R, SANTOS W.R.A, PINTO L.N., TAVARES I.C.C. Flavonóides de *cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. Rev. Bras. Farmacogn. 12: 13-15, 2002.

BARBOSA-FILHO JM, MEDEIROS KCP, DINIZ MFFM, BATISTA LM, ATHAYDE-FILHO PF, SILVA MS, CUNHA EVL, ALMEIDA JRGS, QUINTANS-JÚNIOR LJ. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. Rev Bras Farmacogn 16: 258-285, 2006.

BELTRAME F.L.; SARTORETTO, J.L.; BAZOTTE, R.B.; CUMAN, R.N.; CORTEZ, D.A.G. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). Quim Nova 24: 783-785, 2003.

BRASIL, Ministério da saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 48 de 16 de março de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 18 de mar. 2004.

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

CORREA M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil. Imprensa Nacional; Rio de Janeiro, Vol. IV, p 130, 1926.

DORO, D.L.; PESSINI, G.L.; CAMPOS, E.J.V.; NAKAMURA, C.V. CORTEZ, L.E.R.; CORTEZ, D.A.G. Estudo fitoquímico e avaliação antimicrobiana de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). Arq. Ciênc. Saúde Unipar 1 (1): 45-47, 1997.

FERREIRA, M.P.; NISHIJIMA, C.M.; SEITO, L.N.; DOKEDAL, A.L.; FERREIRA, M.P.; STASI, L.C.; VILEGAS, W.; LIMA, C.A.H. Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide. Journal of Ethnopharmacology 117: 170–174, 2008.

GARCIA, X.; HEREDIA, L.C.; JIMENEZ, M.L.; GIJÓN, E. Vasoconstrictor Effect of *Cissus sicyoides* on Guinea-Pig Aortic Rings. Gen. Pharmac. Vol. 29, No. 3, pp. 457-462, 1997.

GARCIA, M.D.; SAENZ, R.P.; QUILEZ, A.; FERNANDEZ, M.A. Antibacterial activity of *Agave intermixta* and *Cissus sicyoides*. Sevilla, Espanha. 1998.

GARCIA, M.D.; SAENZ, R.P.; QUILEZ, A.; DOMINGUEZ, M.; DE LA PUERTA, R. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. And *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. Sevilla, Espanha. 1999.

MARKHAM, K.R. Techniques of flavonoid identification. New York: Academic Press, p. 113, 1982.

MURTHY K.N.C., VANITHA A., SWAMY M.M., RAVISHANKAR G.A. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cissus quadrangularis* L. J. Med Food 6: 99-105, 2003.

PEPATO, M.T.; BAVIERA A.M.; VENDRAMINI, R.C., PEREZ, M.P.M.S, KETTELHUTT, I.C., BRUNETTI, I.L. *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. Biotechnol Appl Biochem 37: 15-20, 2003.

SANTOS, H.B.; FILHO, J.M.; DINIZ, M.F.F.M.; VASCONCELOS, T.H.C.; PEREIRA, F.S.B.; RAMALHO, J.A.; DANTAS, J.G.; SANTOS, E.B. Avaliação do efeito hipoglicemiante de *Cissus sicyoides* em estudos clínicos fase II. Rev. bras. farmacogn. vol.18 no.1 João Pessoa Jan./Mar. 2008.

SILVA L., ONIKI G.H., AGRIPINO D.G., MORENO P.R.H., YOUNG M.C.M., MAYORM M.A.S., LADEIRA A.M. Bicyclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). Ver. Bras. Farmacogn. 17: 361-367, 2007.

SHIRWAIKAR A, KHAN S, S. MALINI S. Antiosteoporotic effect of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Linn. on ovariectomized rat. J. Ethnopharmacol. 89: 245-250, 2003.

SONAGLIO, D. GEORGE, G.O., PETROVICK, PR.; BASSANI, V.L.; Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos, In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org) Farmacognosia: da planta a medicamento, 5 ed. Ver. ampl. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, cap. 12, p.263-288, 2003.

VASCONCELOS, THC; DINIZ, M.F.F.M., CEZARINO, E.L.; MEDEIROS, I.A.; LIMA, I.M.B.D.; GADELHA, N.R.A. Ensaios toxicológicos clínicos com as folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). Anais do X Encontro de Iniciação Científica da UFPB, Ciências da Vida, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa - João Pessoa: Editora Universitária, p.99, 2002.

WORLD Health Organization. Good Manufacturing Practices: supplementary guidelines for manufactures of herbal medicine products. Geneve: WHO, 1996.

WORLD Health Organization. Quality Control Methods for Medicine Plants Materials. Geneve: WHO, 1998.