

MURILO MASSAO ASSONUMA

**DETERMINAÇÃO DE ALANTOÍNA E
AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE
Cordia ecalyculata VELL.
(CHÁ DE BUGRE)**

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

**Orientadora: Prof. Dra. Dulce Helena
Siqueira Silva**

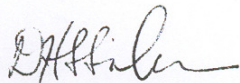
**ARARAQUARA
2009**

MURILO MASSAO ASSONUMA

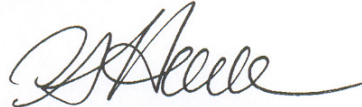
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 30 de outubro de 2009.

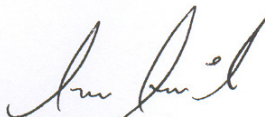
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Dulce Helena Siqueira Silva (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Clélia Akiko Hiruma-Lima
Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu



Profª Drª Carmen Lucia Cardoso
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP, Ribeirão Preto

***Dedico este trabalho aos meus pais,
pelos ensinamentos de dedicação e
humildade...***

***Aos meus tios Sueli e Luis Antônio por
todo o incentivo e créditos em mim
depositados...***

***A todos os amigos que estiveram do meu
lado e fizeram com que os momentos
felizes superassem as preocupações,
tristezas e angústias...***

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Dulce H. S. Silva pela orientação, apoio e ensinamentos depositados durante o desenvolvimento do trabalho.

À colega de trabalho e bióloga Raquel Silveira pelo auxílio na busca e coleta do material vegetal.

Ao Prof. Dr. Fernando de Oliveira pelo auxílio na correta identificação da espécie vegetal.

À Prof^a. Dr^a. Clélia A. Hiruma-Lima e à aluna de mestrado Catarine M. Nishijima pela exímia presteza e ensinamentos dispensados nos ensaios para atividade antihemorrágica realizada.

Ao Grupo Centroflora que muito contribuiu e me apoiou desde o nascimento deste projeto até a sua finalização.

À todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

“O sábio nunca diz tudo o que pensa, mas pensa sempre tudo o que diz”

ARISTÓTELES

RESUMO

É notável a crescente demanda comercial pelos extratos das folhas de “Chá de Bugre” (*Cordia ecalyculata* Vell.) principalmente para a sua aplicação como supressor de apetite e agente cicatrizante. Trata-se de uma planta de origem sul americana sendo no Brasil muito comum nos estados de Minas Gerais, Bahia, Goiás, Paraná e Santa Catarina. É uma planta da família boraginaceae utilizada na fitoterapia brasileira como diurético, febrífugo, estimulante circulatório e também como inibidora do apetite, embora poucos relatos científicos comprovem tais atividades. Uma ampla revisão bibliográfica foi realizada e até o momento verificou-se que são poucos os estudos referentes aos constituintes químicos presentes na espécie, destacando-se alcalóides como a cafeína, a alantoína e ácido alantóico; glicosídeos como a consolidina; taninos e pigmentos, além de compostos inorgânicos como o potássio.

Órgãos regulatórios nacionais e internacionais responsáveis pela avaliação dos parâmetros de qualidade dos extratos comercializados tem sido cada vez mais incisivos quanto à padronização focando em marcadores específicos, metodologias analíticas validadas para a determinação de tais marcadores, estudos de estabilidade e também comprovações científicas que atestem as atividades biológicas esperadas.

De acordo com os objetivos propostos, realizou-se inicialmente uma ampla revisão bibliográfica focando aspectos botânicos, químicos e farmacológicos da espécie. Posteriormente, realizou-se o desenvolvimento e também a validação de uma metodologia analítica cromatográfica capaz de determinar a alantoína nas folhas e também nos extratos obtidos de chá de bugre. Por fim, foi realizada a avaliação farmacológica da espécie, focando em ensaios do tipo antihemorrágico, antifúngico, antioxidante e citotóxico para células normais e tumorais. Os ensaios biológicos realizados mostraram que a partição acetato de etila do extrato hidroetanólico das folhas apresentou uma porcentagem de inibição hemorrágica em torno de 75%. As avaliações de atividade antifúngica e antioxidante não apresentaram resultados significativos e também não foi observada citotoxicidade tanto para células normais como para células tumorais.

Palavras-chave: *Cordia ecalyculata*, alantoína, atividade antihemorrágica, atividade antifúngica, atividade antioxidante e citotoxicidade.

ABSTRACT

The increasing demand for commercial extracts of "Chá de Bugre" (*Cordia ecalyculata* Vell.) is remarkable, especially for its use as appetite suppressant and wound healing agent. The specie is a plant originated from South America and widely spread in Brazil, in the states of Minas Gerais, Bahia, Goiás, Parana and Santa Catarina. It is a plant of the family boraginaceae, used in the Brazilian phytotherapy as diuretic, antipyretic, circulatory stimulant and appetite suppressant, but few scientific reports corroborate such activities. An extensive literature review has been carried out and so far it appears that there are few studies regarding the chemical constituents present in this species like alkaloids such as caffeine, allantoin and allantoic acid, glycosides as consolidine, in addition to tannins, pigments, and inorganic compounds such as potassium.

National and international regulatory departments responsible for assessment of parameters related to the quality of the extracts have been increasingly incisive focusing on the standardization of specific markers, validation of analytical methods for the determination of such markers, stability studies and also scientific evidence that demonstrates the expected biological activities.

According to the proposed objectives, a deep literature review has been initially carried out focusing on botanical, chemical and pharmacological aspects of *C. ecalyculata*. Subsequently, a chromatographic analytical methodology capable of determining allantoin in the leaves and also in extracts of "chá de bugre" has been developed and validated. Finally, we performed a pharmacological evaluation of the species, focusing on the antihemorrhagic, antifungal, antioxidant and cytotoxic activities to both normal and tumor cells. Biological assays evidenced that the ethyl acetate phase of aqueous ethanol extract of leaves showed hemorrhage inhibition around 75%. The antifungal and antioxidant activity were not significant, and cytotoxicity was not observed for both normal and tumor cells.

Key words: *Cordia ecalyculata*, allantoin, anti hemorrhage activity, antifungal activity, antioxidant activity and citotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. <i>Cordia ecalyculata</i> Vell com destaque para as folhas e frutos (LORENZI, 2002).....	16
Figure 2. Ramos contendo as folhas e flores de <i>C. ecalyculata</i> Vell.....	17
Figure 3. Corte transversal da folha de <i>Cordia ecalyculata</i> Vell.....	18
Figure 4. Corte paradérmico abaxial da folha de <i>C. ecalyculata</i> Vell.	19
Figure 5. Estruturas químicas das substâncias espatulenol (1) e β -sitosterol (2)....	20
Figure 6. Estrutura química da alantoína	22
Figure 7. Esquema geral do metabolismo de ureídeos glioxílicos em vegetais.	23
Figure 8. Efeito do extrato de <i>C. salicifolia</i> nos níveis séricos de colesterol e triglicérides.....	26
Figure 9. Fluxograma com o procedimento experimental para a partição líquido-líquido do extrato hidrialcoólico.....	32
Figure 10. Planejamento experimental referente à extração de alantoína da matéria prima.....	34
Figure 11. Cromatoplaça em Camada Delgada Comparativa referente ao extrato bruto e as partições.	44
Figure 12. Cromatogramas exploratórios referentes ao extrato bruto e as partições líquido-líquido.....	45
Figure 13. Cromatogramas comparativos referentes à análise de Alantoína utilizando diferentes tipos de fase móvel.	47
Figure 14. Resultados experimentais referentes ao diagrama com as condições de extração para a alantoína.	48
Figure 15. Cromatograma referente ao teste de seletividade na matéria prima de Chá de Bugre.....	49
Figure 16. Cromatograma referente ao teste de seletividade na matéria prima de Chá de Bugre. Comparação entre a amostra, padrão alantoína e respectivos espectros UV.	50
Figure 17. Curva analítica referente ao padrão alantoína.	51
Figure 18. Cromatogramas dos padrões de alantoína nos diferentes níveis de concentração (mg/L).....	52
Figure 19. Cromatograma da matéria prima de Chá de Bugre apresentando o sinal/ruído para a determinação do limite de detecção do método.....	53

Figure 20. Cromatograma da matéria prima de Chá de Bugre apresentando o sinal/ruído para a determinação do limite de quantificação do método.	54
Figure 21. Cromatograma referente à análise de Exatidão do método para a análise de <i>C. ecalyculata</i>	55
Figure 22. Curva analítica referente ao padrão Ácido Ascórbico.	56
Figure 23. Cromatogramas referentes ao padrão Ácido Ascórbico nos diferentes níveis de concentração.	57
Figure 24. Cromatogramas referentes às análises de robustez utilizando-se diferentes lotes de coluna.	61
Figure 25. Cromatogramas referentes às análises de robustez utilizando-se diferentes valores de pH para a Fase Móvel.	62
Figure 26. Cromatogramas referentes às análises de robustez modificando-se a vazão da Fase Móvel.	64
Figure 27. Representação gráfica dos resultados observados para a atividade antihemorrágica no extrato bruto e frações de <i>C. ecalyculata</i>	65
Figure 28. Cortes na região dorsal dos animais utilizados na avaliação da atividade antihemorrágica.	65
Figure 29. Cromatograma referente à fase acetato de etila em 254nm destacando o espectro ultravioleta de algumas substâncias.	66
Figure 30. Ensaio de citotoxicidade (MTT). Porcentagem de células viáveis em queratinócitos normal de pele humana HaCaT, tratadas com Extrato Bruto, Fase Hexânica, Fase Acetato de Etila e Fase Aquosa nas concentrações de 3.9 a 125µg/mL por 24 horas. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). CP (controle positivo). CV (controle de veículo).	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdos de lipídeos totais das amostras analisadas das sementes de algumas espécies de <i>Cordia L.</i> , obtidos por gravimetria.	20
Tabela 2. Conteúdo das frações de lipídeos das amostras analisadas das sementes de algumas espécies de <i>Cordia L.</i>	21
Tabela 3. Gradiente exploratório para avaliação do Extrato Bruto.	31
Tabela 4. Condições experimentais para o teste 1 na análise de matéria prima.....	33
Tabela 5. Condições experimentais para o teste 2 na análise de matéria prima.....	33
Tabela 6. Condições experimentais para o teste 3 na análise de matéria prima.....	34
Tabela 7. Massas das frações referentes à partição do extrato hidroalcoólico.	43
Tabela 8. Resultados experimentais encontrados na otimização da análise de Matéria Prima.....	47
Tabela 9. Valores de concentração do padrão alantoína aplicados.	51
Tabela 10. Respostas de área em função das concentrações de alantoína.	51
Tabela 11. Valores de área e concentração do sinal/ruído para a determinação do Limite de Detecção.	53
Tabela 12. Valores de área e concentração do sinal/ruído para a determinação do Limite de Quantificação.	54
Tabela 13. Valores de concentração do padrão Alantoína aplicados.....	55
Tabela 14. Resultados obtidos no ensaio de exatidão.	55
Tabela 15. Respostas de área em função da concentração referentes à curva analítica do Ácido Ascórbico.	56
Tabela 16. Resumo dos resultados obtidos no teste de repetibilidade.....	58
Tabela 17. Resumo dos resultados obtidos no teste de precisão intermediária.....	58
Tabela 18. Resumo dos resultados obtidos no teste de Reprodutibilidade (Lab. Pesquisa e Desenvolvimento).....	59
Tabela 19. Resumo dos resultados obtidos no teste de Reprodutibilidade (Lab. Controle de Qualidade).....	59
Tabela 20. Resumo dos resultados obtidos no teste de Reprodutibilidade entre laboratórios.	59
Tabela 21. Resultados experimentais quali e quantitativos da análise de robustez em diferentes tipos de coluna.	60

Tabela 22. Resultados experimentais quali e quantitativos da análise de robustez em diferentes pHs da Fase Móvel (A).....	62
Tabela 23. Resultados de concentração em função da vazão no teste de robustez.	63
Tabela 24. Efeito antihemorrágico do extrato bruto e frações de <i>Cordia ecalyculata</i>	65
Tabela 25. Resultados experimentais referentes à avaliação da atividade antifúngica.	67
Tabela 26. Atividade antioxidante de extrato e frações de partição de <i>Cordia ecalyculata</i>	68
Tabela 27. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50µg/mL para extrato bruto e 25µg/mL para partições. Valores são médias ± DPM.	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt – Acetato de Etila

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CCDC - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE/DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à um Detector do tipo Arranjo de Diodos.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CS – *Cordia salicifolia*

CT – Colesterol Total

DAD – “Diode Array Detector”

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetil-Sulfóxido

DPPH – Difenilpicrilhidrazila

DPR – Desvio Padrão Relativo

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

FL – Fosfolipídeos

GL – Glicolipídeos

HeLa cells – Tipo de linhagem celular tumoral chamadas de “células imortais”

HEPES – Agente tamponante Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-Piperazinoetanossulfônico

Hex – Hexano

HMG-CoA – Hidroximetil Glutaril Coenzima A

HSV-1 – Herpes Simplex Virus tipo 1

IBB – Instituto de Biociências de Botucatu

IBt – Instituto Botânico

LUV – “Large Unilamellar Vesicles”

MeCN - Acetonitrila

MOPS – Tampão Zwitteriônico ativo em pH 6,5 – 8,0. Ácido-3-(N-Morfolino)-propanossulfônico.

MTT – Ensaio colorimétrico utilizando o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio

NCI – “National Cancer Institute”

OMS – Organização Mundial da Saúde

PA – Para Análise

PBS – “Phosphate Buffer Saline”

REC% – Porcentagem de Recuperação

TG – Triglicerídeos

TRIS – Componente de soluções tampão Tris(hidroximetil)-Aminometano

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UV – Ultravioleta

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Prótons

RMN¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

%ΔA – Variação Percentual da Absorbância

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
OBJETIVOS	15
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 – ASPECTOS BOTÂNICOS DE <i>CORDIA ECALYCVLATA VELL.</i>	16
3.1.1 – Aspectos Macroscópicos	16
3.1.2 – Aspectos Microscópicos	17
3.2 – ASPECTOS QUÍMICOS DE <i>CORDIA ECALYCVLATA VELL.</i>	19
3.2.1 – Alantoína	22
3.3 – ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DE <i>CORDIA ECALYCVLATA VELL.</i>	25
3.3.1 – Atividade Anti <i>Helicobacter pylori</i> in vitro	25
3.3.2 – Atividade Hipolipidêmica	25
3.3.3 – Atividade Antiviral	27
3.3.4 – Avaliação da Toxicidade	27
3.3.5 – Avaliação da Atividade Antiúlcera	28
MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 – SOLVENTES	29
4.2 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	29
4.3 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	29
4.4 – COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	29
4.5 – PREPARAÇÃO DA DROGA VEGETAL	30
4.6 – PREPARAÇÃO E ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO	30
4.7 – PARTIÇÃO COM SOLVENTES	31
4.8 – DETERMINAÇÃO DA ALANTOÍNA	32
4.9 – VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA ALANTOÍNA ...	34
4.10 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIHEMORRÁGICA CONTRA O VENENO DE <i>BOTHROPS</i> <i>JARARACA</i>	38
4.11 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	40
4.12 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	40
4.13 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS NORMAIS	41
4.14 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS	42
RESULTADOS E DISCUSSÕES	43

<i>5.1 – ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO BRUTO E DAS PARTIÇÕES</i>	43
<i>5.2 – DETERMINAÇÃO DE ALANTOÍNA POR CLAE</i>	46
<i>5.3 – OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE ALANTOÍNA NA MATÉRIA PRIMA</i>	47
<i>5.4 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ALANTOÍNA POR CLAE</i>	49
<i>5.5 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIHEMORRÁGICA</i>	64
<i>5.6 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA</i>	67
<i>5.7 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</i>	68
<i>5.8 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS NORMAIS</i>	68
<i>5.8 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS</i>	69
CONCLUSÕES	71

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A busca do homem pela cura de seus males com a utilização de plantas é tão antiga quanto ele próprio e, considerando esta antiguidade, não há mais espaço para dúvidas sobre a efetiva atuação farmacológica das substâncias de origem vegetal. O uso terapêutico de plantas acompanha a humanidade pelo menos desde o período tribal, ou seja, antes mesmo da constituição de cidades – o evento que marcou o início do que se pode chamar hoje de civilização. A noção arquetípica de que o homem era mais um componente da totalidade da criação sobre o planeta guiou a humanidade em sua busca pela cura, levando-o até seres igualmente criados – as plantas, com uma certeza ancestral de que o Princípio Criador proveria, através de sua própria criação, as soluções para os problemas humanos (SILVA, 2004).

Assim como no passado, o homem continua buscando a cura de suas doenças nas fontes de origem natural. É notável a crescente evolução dos fitoterápicos ou mesmo o desenvolvimento de novos fármacos sintéticos que utilizam como protótipo moléculas isoladas a partir de um dado produto natural. Esta demanda faz com que a preocupação com a qualidade das matérias primas utilizadas em sua fabricação seja cada vez mais rigorosa, exigindo o estabelecimento de parâmetros que possam assegurar a identidade e também a autenticidade de uma dada matéria prima utilizada no processo de fabricação (SIMÕES, 2001).

Os parâmetros relacionados ao controle de qualidade para matérias primas de uso farmacêutico são, muitas vezes, estabelecidos nas Farmacopéias e Compêndios Oficiais. No caso das matérias-primas vegetais oriundas de plantas clássicas, ou seja, já estudadas química e farmacologicamente, existem monografias específicas que definem critérios de identidade, autenticidade, pureza e teor dos constituintes químicos ativos (FARIAS, 2001).

Contudo, uma das vertentes da pesquisa científica com produtos naturais está na prospecção de novas espécies, buscando moléculas e atividades biológicas que possam servir de base para o desenvolvimento de novos fármacos. Ao contrário

daquelas que chamamos de clássicas, as novas espécies apresentam uma escassez muito grande de dados que possam servir de base para a caracterização dos parâmetros de qualidade desta matéria prima. Pensando nisso, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em seu documento WHO/Pharm/92.559, aponta um roteiro básico para que se possa analisar a qualidade de plantas medicinais abrangendo tópicos que vão desde a classificação e identificação da espécie botânica, determinação de princípios ativos (quando conhecidos) até as possíveis e prováveis contaminações radioativas provenientes dos processos de esterilização do produto ou de suas contaminações ambientais. Os controles físico-químicos e microbiológicos são apontados no documento da OMS como relevantes e imprescindíveis (GARCIA, 2009).

Ainda pensando no desenvolvimento de um novo fármaco, é imprescindível que estejam associados os estudos químicos com as avaliações de atividade biológica no material em estudo. A seleção de espécies vegetais baseada na alegação tradicional de um efeito terapêutico pode constituir um valioso atalho para a descoberta de novos fármacos, podendo ser encarada como uma pré-triagem quanto à utilidade terapêutica em humanos (ELISABETSKY, 2003). As informações sobre o modo tradicional de preparação, quando analisados sob o ponto de vista químico, podem contribuir fortemente tanto para o estabelecimento de hipóteses a respeito da identidade dos compostos ativos principais como para introduzir correções nas hipóteses iniciais (NUNES, 1996).

Considerando-se as proposições acima citadas, propõe-se como objetivos para o presente trabalho a determinação de um marcador químico e também a metodologia analítica para a sua determinação tanto na matéria prima (folhas), como nos extratos provenientes de *Cordia ecalyculata* Vell., fornecendo assim, ferramentas que sejam confiáveis e que auxiliem no controle de qualidade destes materiais. Com a finalidade de fornecer informações científicas que suportem os relatos etnofarmacológicos já descritos para a planta, busca-se também avaliar algumas atividades biológicas que estejam direta ou indiretamente ligadas aos relatos populares existentes, tais como as atividades cicatrizante, antiinflamatória, antihemorrágica e antioxidante.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo conhecer melhor a espécie *Cordia ecalyculata* Vell., estudando alguns dos seus aspectos químicos e farmacológicos.

Pretende-se oferecer uma contribuição ao controle de qualidade de drogas vegetais e extratos auxiliando na sua identificação e posterior padronização.

Com os estudos farmacológicos realizados, busca-se fornecer informações de caráter científico mais concretas e que venham fortalecer as informações etnofarmacológicas já descritas para a espécie.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Realizar um levantamento bibliográfico a respeito da espécie procurando ressaltar os aspectos botânicos, químicos e farmacológicos.

2) Desenvolver e validar uma metodologia analítica cromatográfica para a quantificação de alantoína no extrato bruto hidroalcoólico e também nas partições de *C. ecalyculata* Vell.

3) Avaliar as atividades antihemorrágica, antifúngica, citotóxica e antioxidante do extrato bruto e das partições de *C. ecalyculata* Vell.

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Aspectos Botânicos de *Cordia ecalyculata* Vell.

A espécie em questão é uma planta de origem sul americana pertencente à família boraginaceae podendo ser encontrada em algumas áreas das florestas tropicais argentina e paraguaia. No Brasil, é muito comum desde o nordeste até o sul do país, principalmente na floresta semidecídua (LORENZI, 2002).

Sua nomenclatura científica apresenta alguns sinônimos como, por exemplo: *Cordia digynia* Vell., *Cordia salicifolia* Cham., *Cordia glaziovii* Taub., *Cordia coffeoides* Warm. Popularmente é conhecida como café-de-bugre, café-do-mato, cafezinho, chá-de-bugre, chá-de-frade, claraíba, louro-mole, louro-salgueiro e porangaba (LORENZI, 2002).



Figure 1. *Cordia ecalyculata* Vell com destaque para as folhas e frutos (LORENZI, 2002).

3.1.1 – Aspectos Macroscópicos

Quando adulta, possui porte arbóreo, podendo atingir até 20 m de altura por até 20 cm de diâmetro na base do tronco (figura 1). Este é aproximadamente reto,

diminuindo o diâmetro, gradativamente, e aparecendo as ramificações nos exemplares mais desenvolvidos à altura de 2,5-3 m do solo (SAITO, 1984).

As folhas são lanceoladas ou ablongo lanceoladas e de ápice acuminado, raras vezes agudo e de base cuneata (figura 2). A margem apresenta-se lisa. As folhas possuem nervação peninérvea sendo a nervura mediana bem evidente, saliente na face dorsal e na face ventral. As nervuras secundárias emergem da nervura principal num ângulo de aproximadamente 60° e são pouco evidentes. O pecíolo mede de 1 a 2cm de comprimento, possui secção plano-convexa ou ligeiramente côncavo-convexa (SAITO, 1984).



Figure 2. Ramos contendo as folhas e flores de *C. ecalyculata* Vell.

3.1.2 – Aspectos Microscópicos

A secção transversal da folha ao nível do terço médio inferior mostra mesófilo do tipo heterogêneo e assimétrico. A epiderme superior é constituída por uma fileira de células de contorno arredondado e um tanto alongado no sentido periclinal recoberta por uma cutícula espessa e a epiderme inferior é representada por células irregulares na forma e no tamanho, recobertas por uma cutícula menos espessa que a superior. O parênquima paliçádico é formado por uma fileira de células cilíndricas dispostas uma ao lado das outras e que ocupam aproximadamente um terço da

espessura do limbo. Intercalados entre as células do parênquima paliádico e relacionados com a epiderme superior pode ser observada a presença de cistólitos (figura 3). O parênquima lacunoso possui de 6 a 8 fileiras de células de contorno arredondado, algumas emitindo braços, incluindo idioblastos com areia cristalina. A epiderme superior visto em secção paradérmica é constituída de células com paredes sinuosas espessadas. Podem ser ainda observados por transparência os pontos de inserção dos cistólitos. A epiderme inferior vista em secção paradérmica, é representada por células de contorno sinuoso e inclui estômatos do tipo anisocítico (figura 4). Os feixes vasculares que são do tipo colateral possuem uma calota fibrosa protegendo o floema. Acham-se dispostos em círculo, delimitando internamente uma região medular (SAITO, 1984).

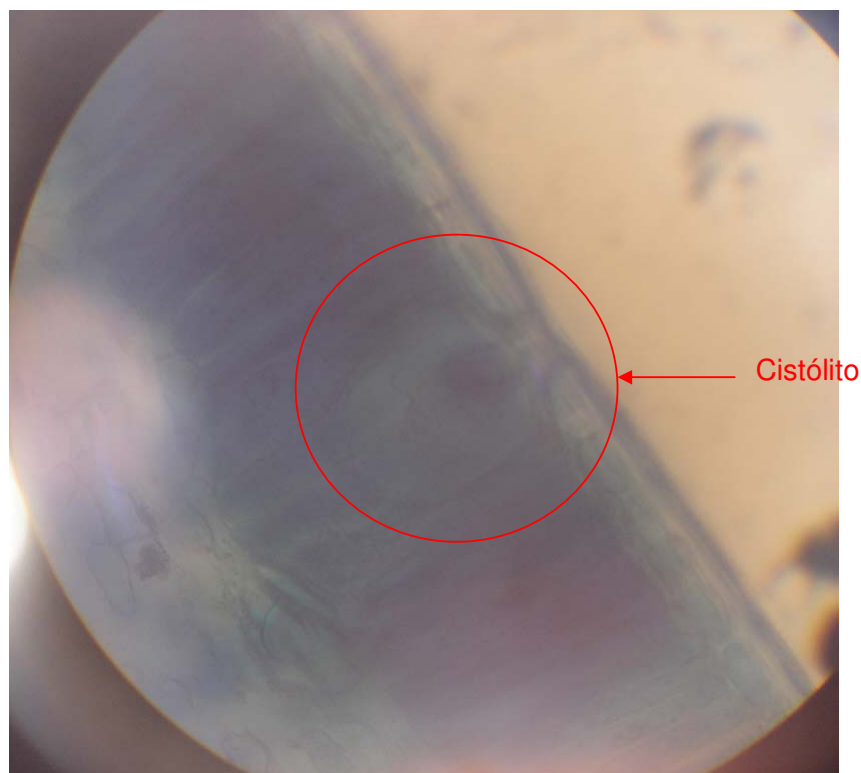


Figure 3. Corte transversal da folha de *Cordia ecalyculata* Vell.

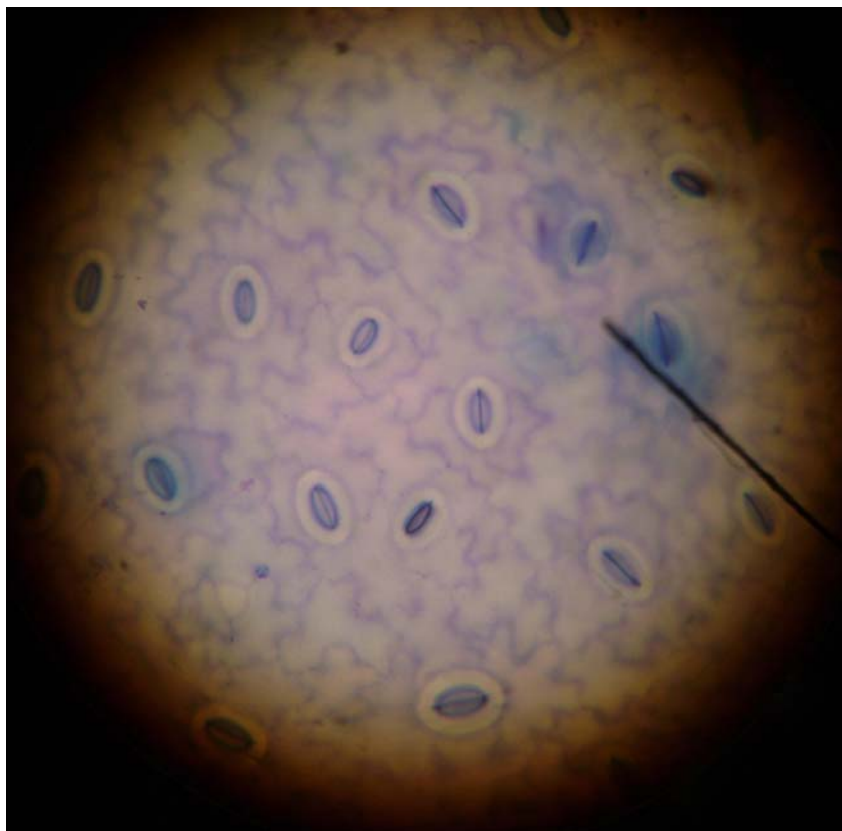


Figure 4. Corte paradérmico abaxial da folha de *C. ecalyculata* Vell.

3.2 – Aspectos Químicos de *Cordia ecalyculata* Vell.

Apesar da popularidade atribuída ao Chá de Bugre na medicina popular brasileira, poucos estudos encontram-se na literatura a respeito da composição química desta planta. De fato, os únicos relatos encontrados são referentes à presença de cafeína, sais de potássio, alantoína, ácido alantóico (que são particularmente abundantes nos frutos), hidróxi-ésteres alifáticos, tritriacontano, além de flavonóides, saponinas, taninos e mucilagens (SAITO, 1986).

O extrato diclorometânico das folhas de *C. salicifolia* foi estudado e, após purificação em colunas de sílica forneceu como constituintes principais o (+)-espatulenol (Figura 5) com teores ao redor de 0,53% e também do β -sitosterol (Figura 5) em concentrações de aproximadamente 0,24% (MENGHINI *et al.*, 2008). A substância (1) já tinha sido previamente descrita como sendo um componente presente no óleo essencial das partes aéreas de outras plantas do gênero *Cordia*, como por exemplo, *Cordia leucomalloides* Taroda, *Cordia curassavica* (Jacq.) Roen.

& Schult (SANTOS, 2006), e *Cordia verbenaceae* D. C. (DE CARVALHO, 2004). Apesar disso, altas concentrações deste componente somente foram observadas em *C. salicifolia* (MENGHINI *et al.*, 2008).

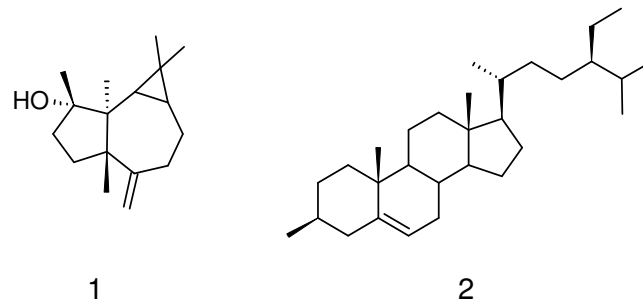


Figure 5. Estruturas químicas das substâncias spatulenol (1) e β -sitosterol (2).

Outros componentes também foram identificados como, por exemplo, hidrocarbonetos de cadeia longa (10 a 30 átomos de carbono), alcoóis alifáticos de cadeia longa (12 a 28 átomos de carbono) e finalmente, ácidos graxos, como por exemplo, ácido palmítico (27,2%), ácido mirístico (8,4%), ácido esteárico (31,2%), ácido oléico (15,7%) e ácido linoléico (17,5%) (MENGHINI *et al.*, 2008).

ARREBOLA *et al.* (2004), avaliaram a composição lipídica das sementes de espécies maduras de *Cordia* encontradas no Brasil. As porcentagens de lipídeos totais, determinadas pelo método gravimétrico, estão apresentadas na tabela 1, e variaram de 2,58% para *Cordia ecalyculata* até 6,28% para *Cordia myxa*.

Tabela 1. Conteúdos de lipídeos totais das amostras analisadas das sementes de algumas espécies de *Cordia* L., obtidos por gravimetria.

Amostras	% de Amostra Úmida
<i>Cordia ecalyculata</i> ^a	4,28
<i>Cordia ecalyculata</i> ^b	2,58
<i>Cordia myxa</i>	6,28
<i>Cordia sellowiana</i>	5,84

^(a) Amostra de Rio Claro; ^(b) Amostra de Guarulhos

Os valores acham-se próximos daqueles relatados por KLEIMAN *et al.* (1964) para as sementes de *Cordia obliqua* Wild. (4,0%) e por MILLER *et al.* (1967) para as sementes de *Cordia verbenacea* DC. (= *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult.)

(2,4%). As sementes da espécie *Cordia ecalyculata* (= *Cordia salicifolia* Cham.), analisadas por MILLER *et al.* (1967) apresentaram o teor médio de lipídeos totais de 6,7% de amostra. Em contrapartida, valores superiores de lipídeos totais foram relatados por outros autores para outras espécies de *Cordia* L. DAULATABAD *et al.* (1992) relataram 18,0% para a espécie *Cordia rothii* Roem.& Schult., enquanto a média de lipídeos relatada por MAYWORM *et al.* (1998) para as sementes de *Cordia glabrata* A. DC., da região semi-árida do nordeste brasileiro, foi de 19,6%.

Algumas plantas da família Boraginaceae são conhecidas pelos altos teores de lipídeos. Merece destaque os valores relatados para as espécies *Myosotis discolor* Pers. (34,1 %) e *Myosotis sylvatico* Hoffm. (31,8 %) (VELASCO; GOFFMAN, 1999). GUIL-GUERRERO *et al.* (2001), analisaram 20 espécies da família Boraginaceae coletadas na Espanha, e relataram teores de lipídeos de 6,63 % (*Echium humile*) a 30,97 % (*Borago officinalis*). Os autores citados acima não analisaram nenhuma espécie do gênero *Cordia*.

Na Tabela 2 estão apresentados os conteúdos das frações de lipídeos neutros (LN), glicolipídeos (GL) e fosfolipídeos (FL) das espécies de sementes do gênero *Cordia*. Os LN são a classe majoritária, contribuindo com 86,41 a 92,91% dos lipídeos totais, seguida dos FL com 6,05 a 8,87% e dos GL com 1,04 a 4,72%. SENANAYAKE e SHAHIDI (2000) encontraram teores médios de 84,1% de LN, 8,6% de FL e 7,3% de GL, após 10 dias da germinação das sementes de borragem (*Borago officinalis* L.), também pertencente à família Boraginaceae. A ocorrência de glicolipídeos não foi registrada por HAMROUNI *et al.* (2002) para esta mesma espécie.

Tabela 2. Conteúdo das frações de lipídeos das amostras analisadas das sementes de algumas espécies de *Cordia*.

Amostras	Conteúdo das frações de lipídeos (%)		
	LN	GL	PL
<i>Cordia ecalyculata</i> ^a	88,64	3,23	8,13
<i>Cordia ecalyculata</i> ^b	92,91	1,04	6,05
<i>Cordia myxa</i>	87,79	4,24	7,97
<i>Cordia sellowiana</i>	86,41	4,72	8,87

^(a) Amostra de Rio Claro; ^(b) Amostra de Guarulhos

3.2.1 – Alantoína

Em 1799, a alantoína (figura 6) foi isolada pela primeira vez a partir do líquido amniótico de ruminantes (BRUNEL, CAPELLE, 1947).

É uma substância que pertence à classe dos ureídios e que comumente é encontrada em boragináceas. Trata-se de um pó branco, cristalino, também chamado de 5-ureidohidantoína, glicoxildiuureído ou cordianina. Possui ponto de fusão em 238°C. Um grama dissolve-se em 190 mL de água e em 500 mL de etanol, sendo mais solúvel nestes solventes à quente. O pH da solução saturada é 5,5 (MOFFAT *et al.*, 1978; BERINGER, 1995; BUDAUARI, 1996).

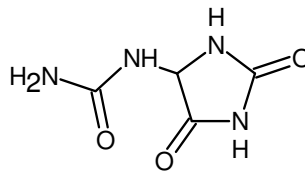


Figure 6. Estrutura química da alantoína

A alantoína é o produto final do metabolismo de purinas em vários animais, como répteis, aves e em alguns mamíferos. O homem, porém, não excreta alantoína, devido à falta da enzima uricase no organismo (CHEN, 1996), muito embora, encontrem-se traços desta substância no sangue humano, devido a oxidação do ácido úrico, já que este é um importante antioxidante e neutralizador de radicais livres para os humanos (MEADOWS, SMITH, 1986).

Nas plantas, os ureídios (como a alantoína e o ácido alantóico) são produtos de degradação das bases púricas, desempenhando papel importante no armazenamento e transporte do nitrogênio, sendo a alantoína bastante comum no reino vegetal (BRUNEL, CAPELLE, 1947).

Seu uso foi noticiado na época da Primeira Guerra Mundial, quando se notou que as feridas infestadas por larvas pareciam curar-se melhor do que as não infestadas, devido à alantoína produzida por estas larvas (BERINGER, 1995). A partir de então, a alantoína passou a ser largamente empregada pelos cirurgiões para acelerar a proliferação celular em ferimentos com recuperação lenta, especialmente a osteomielite (SAITO, 1984).

Desde a década de 50, a alantoína é reconhecida e aceita pelas áreas médicas e correlatas, por seu efeito anti-irritante, queratolítico e cicatrizante (LUBOWE *et al.*, 1959).

Industrialmente, a alantoína pode ser sintetizada pela oxidação do ácido úrico com permanganato de potássio alcalino (BUDAUARI, 1996) ou pela reação do ácido glioxílico com uréia (LUBOWE *et al.*, 1959).

Três enzimas, a uricase, a alantoinase e a alantoicase são responsáveis pelo metabolismo dos ureídios glioxílicos entre os vegetais. A formação da alantoína foi esquematizada por BRUNEL e CAPELLE, em 1947 (figura 7).

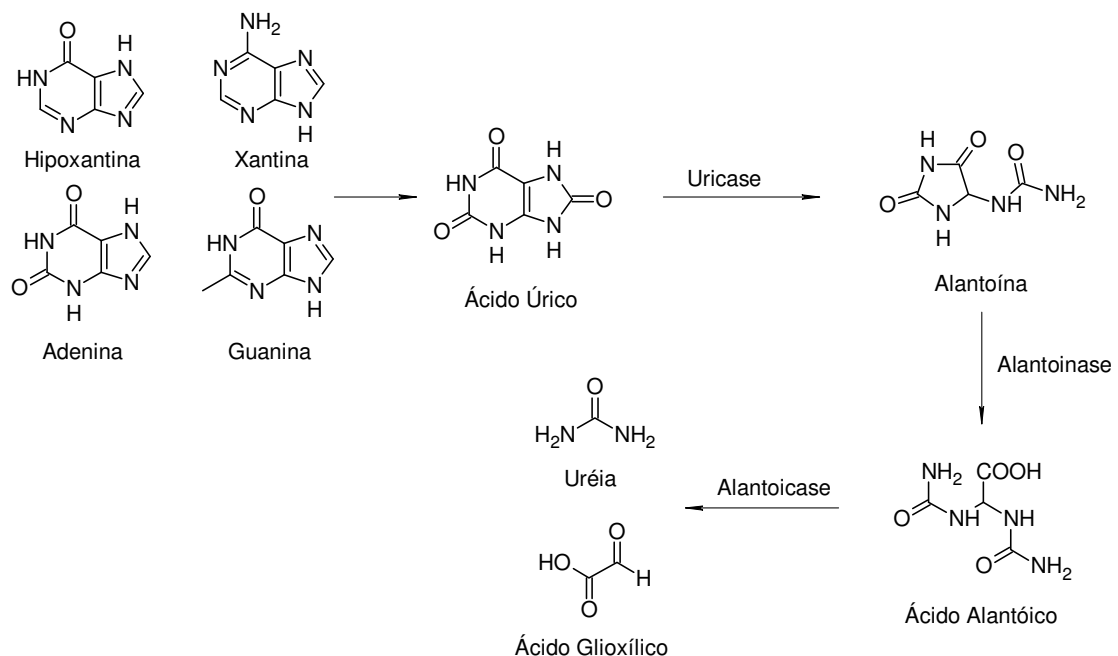


Figure 7. Esquema geral do metabolismo de ureídios glioxílicos em vegetais.

Segundo o mesmo raciocínio, SUZUKI E WALLER (1984), estudando frutos de *Coffea arabica*, propuseram um esquema para a via metabólica da biodegradação da cafeína com formação de teobromina e teofilina e posterior degradação em xantina, seguindo então pela via mostrada na figura 6, até chegar em uréia e ácido glioxílico, passando pela alantoína.

Segundo MECCA (1971), a alantoína e seus derivados possuem efeito suavizante, quando aplicados sobre a pele. Isso se deve ao fato de esta substância ligar-se à matriz da camada córnea da pele, aumentando a capacidade de ligação

da queratina com a água, facilitando a hidratação e amaciamento da pele. Por isso, este composto é útil no tratamento de calos e hiperqueratinização da pele.

A porção uréica da alantoína é a responsável pelo efeito queratolítico e suavizante da pele, enquanto que a parte hidantoína (relacionada ao ácido barbitúrico) é responsável pelo efeito anestésico e anti-irritante. Age também destoxicando e neutralizando os agentes irritantes, além de estimular os processos de cura que envolvem os tecidos feridos (LUBOWE *et al.*, 1959), e estimular o crescimento de tecido saudável auxiliando na retirada dos restos de tecido necrosado (SHEKER *et al.*, 1972).

Devido a todas essas propriedades, a alantoína é empregada no tratamento de inúmeras afecções da pele, como psoríase, dermatites diversas, seborréia, acne, hemorróidas e problemas de hiperqueratinização da pele. Tem sido usada com sucesso em tratamento de osteomielite e em úlceras de diabéticos (LUBOWE *et al.*, 1959; BERINGER, 1995).

A alantoína é usada em combinação com grande número de substâncias como os sais de alumínio, para aplicações em queimaduras (SHEKER *et al.*, 1972), e também faz parte de diversos produtos, tanto farmacêuticos como cosméticos, como por exemplo: loções pós-barba, desodorantes, loções adstringentes ou embelezadoras, loções hidratantes, xampus, laquê para cabelos, dentifrícios, entre outros (MECCA, 1971; BILLABERT *et al.*, 1976; BERINGER, 1995).

SZNITOWSKA e JANICKI (1988) analisaram o efeito do veículo na penetração de alantoína na pele, e concluíram que o melhor resultado obtém-se quando um creme do tipo água em óleo é usado.

O metabolismo da alantoína foi estudado por SCHAFFER e GREENBAUM (1940) em ratos, que constataram que a ingestão de uma grande quantidade da substância (250mg/kg de massa corpórea, diariamente) proporcionou perda de peso nestes animais.

CONSTANTINESCU *et al.* (1967), trabalhando com extratos de *Pulmonaria mollissima* e alantoína, concluíram que esta substância possui propriedades diuréticas, quando da sua administração intraperitonal em ratos, nos quais constatou aumento da diurese.

3.3 – Aspectos Farmacológicos de *Cordia ecalyculata* Vell.

Chá de Bugre é uma erva amplamente utilizada na etnomedicina tradicional brasileira. Seus extratos são comercializados como diurético, supressor de apetite, e também como auxílio em programas para perda de peso (CRUZ, 1995).

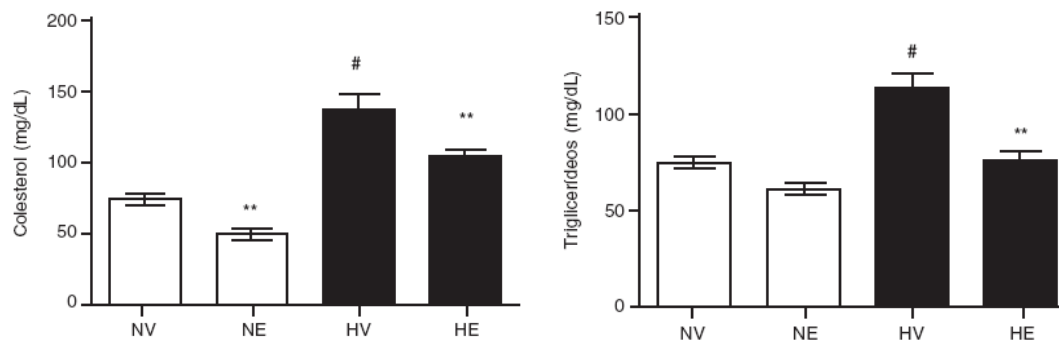
3.3.1 – Atividade Anti *Helicobacter pylori* in vitro

MENGHINI *et al.* (2008), investigaram o efeito do constituinte majoritário do extrato diclorometânico (apolar) das folhas de *C. salicifolia* ((+)-espatulenol) como um inibidor do crescimento de *Helicobacter pylori* *in vitro* através do método da diluição em agar seguindo as orientações fornecidas pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), usando metronidazol, amoxicilina, tetraciclina e claritromicina como drogas de referência e seguindo a metodologia já relatada na literatura (EPIFANO, 2006). Os experimentos indicaram uma CIM de 200µg/mL, indicando que o (+)-espatulenol se portou como sendo um fraco inibidor de crescimento para o *H. pylori*.

3.3.2 – Atividade Hipolipidêmica

CARDOZO *et al.* (2008) avaliaram a ação do extrato etanólico das folhas de *Cordia salicifolia* no perfil lipídico de camundongos após tratamento com uma dieta hiperlipidêmica, que resulta em um aumento significativo nos níveis séricos de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG). Os resultados mostraram que a utilização do extrato em uma dose de 100mg/kg/dia por gavagem 1 vez ao dia durante 15 dias promoveu uma diminuição significativa em ambos, de 24 e 50% respectivamente para CT e TG. Resultados semelhantes foram obtidos por SIQUEIRA *et al.* (2006), onde se observou uma diminuição dos níveis de TG em torno de 20%. Nesse mesmo estudo, entretanto, não foram observadas variações nos níveis de CT. Os resultados observados podem ser explicados em função da menor dosagem utilizada (20mg/kg/dia), bem como da menor duração do tratamento (13 dias) e também pela forma como o material foi processado (folhas pulverizadas diluídas em água), sugerindo que os efeitos benéficos da planta possam ser decorrentes do uso

mais prolongado da infusão, da dose administrada e também da forma em que o extrato foi preparado.



NV grupo que recebeu água com dieta normal (grupo controle normal)

NE grupo que recebeu água com Extrato de *C. salicifolia*

HV grupo que recebeu água com dieta hiperlipidêmica (grupo controle hiperlipidêmico)

HE grupo que recebeu extrato com dieta hiperlipidêmica

Figure 8. Efeito do extrato de *C. salicifolia* nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos.

Dentre os mecanismos de ação propostos para tal atividade destaca-se a inibição das enzimas hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase (limitante da síntese do colesterol) e da acil CoA colesterol-O-aciltransferase (esterifica o colesterol livre utilizando ácidos graxos e sendo então armazenado como gotículas ou exportado para o plasma) (SILVA, *et al.*, 2001; ROSENDO, *et al.*, 2007; BURSILL, C. A.; ABBEY, M.; ROACH, P. D., 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Outros estudos relacionam ainda a atividade hipocolesterolemia de determinadas plantas à atividade antioxidante dos seus constituintes, como flavonóides e cafeína, através da diminuição da lipoperoxidação e aumento da atividade das enzimas antioxidantes (STEIN *et al.*, 2005). Em relação à *Cordia salicifolia*, este estudo demonstrou a presença de alcalóides totais, por exemplo a cafeína, bem como de saponinas, corroborando o estudo desenvolvido por SAITO, 1986.

O efeito anti-obesidade, anorexígeno, diurético e anti-hiperlipêmico de folhas secas pulverizadas de *C. salicifolia* Cham. também foi investigado por SIQUEIRA, *et al.*, 2006. As folhas foram dissolvidas em água e administradas (20 mg/kg/dia) por gavagem durante 13 dias em ratos. Contrariamente ao uso popular, o efeito anti-

obesidade, anorexígeno e diurético não foi observado. Porém, foi observado efeito hipolipidêmico em ratos normais e portadores de diabetes induzidos por aloxana.

3.3.3 – Atividade Antiviral

HAYASHI, *et al.* (1990) estudaram um extrato hidroetanólico (Etanol:Água 7:3) parcialmente purificado das folhas e galhos de *C. salicifolia*, que apresentou um efeito inibitório para o vírus da herpes simplex tipo 1 (HSV-1). O grupo avaliou a atividade do extrato frente às diferentes etapas de replicação do vírus em células HeLa. Sob condições de replicação simples, o extrato exerceu valores de inibição superiores a 99,9% quando adicionado às células até 1h e 30 minutos antes da infecção. Mesmo adicionado 8h após a infecção, o extrato ainda causou uma inibição de 99%. Sendo assim, foi comprovada a atividade viruscida do extrato sendo que as análises dos primeiros eventos seguidos da infecção mostraram que o mesmo afetou a penetração viral nas células HeLa, porém não afetou sua adsorção.

3.3.4 – Avaliação da Toxicidade

DIAS (2004) em sua dissertação de mestrado avaliou a toxicidade aguda do extrato hidroetanólico (Etanol:Água 8:2) das folhas de *C. ecalyculata* segundo metodologia proposta por BRITO (1994) - modificada. A dose administrada nos animais (machos e fêmeas pesando entre 30 e 40g divididos em grupos por sexo) foi de 5000mg/kg de massa corpórea, sendo esta administrada diariamente por 15 dias. No último dia os animais foram necropsiados e eventuais alterações macroscópicas em rins, fígado, coração e pulmões foram avaliadas.

Os resultados indicaram ausência de toxicidade do extrato visto que, além de não apresentar mortes entre os animais, também não mostrou alterações tanto comportamentais como físicas (alterações macroscópicas e peso dos órgãos avaliados).

3.3.5 – Avaliação da Atividade Antiúlcera

DIAS (2004) também avaliou em sua dissertação de mestrado a atividade antiúlcera gástrica para o extrato hidroetanólico (Etanol:Água 8:2) das folhas de *C. ecalyculata* utilizando o modelo de indução aguda por etanol e ácido clorídrico, descrito por GUARALDO *et al.*, 2001.

Os resultados não indicaram significativa atividade para nenhum dos níveis de ulceração testados.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Solventes

Foram utilizados solventes de grau analítico (PA) da marca Synth®;

Água ultra pura (18MΩ) obtida no sistema Elga-Analítica®;

Solventes grau cromatográfico Merck® para análises via CLAE.

4.2 – Cromatografia em Camada Delgada

A avaliação preliminar do extrato bruto e das frações (partições) foi realizada por meio de cromatografia em camada delgada comparativa, tendo Sílica gel 60 F₂₅₄ Merck® como fase estacionária.

4.3 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em escala analítica, foi utilizado um cromatógrafo analítico Waters® com sistema quaternário de bombas modelo 600, detector UV – visível Arranjo de Diodos modelo 996 e injetor manual Rheodyne® modelo 7725i com alça de amostra de 20 µl. Coluna Luna Phenomenex® C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm), sistema de aquisição de dados via computador Pentium IV 3.2GHz utilizando Software Empower Pro Build modelo 1154.

Para o desenvolvimento, validação e análises de Alantoína, foi utilizado padrão de referência Alantoína SIGMA®.

4.4 – Coleta e Identificação do Material Vegetal

Aproximadamente 5 kg do material vegetal (folhas frescas) foram coletados na Estância Demétria em Botucatu/SP no dia 16 de novembro de 2007 por volta das 9 horas da manhã. O local foi devidamente identificado e uma excicata foi preparada, sendo posteriormente enviada ao IBt (Instituto Botânico – SP) para que

fosse comparada e identificada pelo Prof. Dr. Fernando de Oliveira. Após confirmada a espécie, a mesma foi depositada no BOTU Herbário Irina Delanova Gentchúnicov do IBB (Instituto de Biociências de Botucatu) da Universidade Estadual Paulista em Botucatu/SP sob o registro de número 25687.

4.5 – Preparação da Droga Vegetal

As folhas foram desidratadas em estufa a 40 °C durante 48h, pulverizadas em moinho de facas e armazenadas em saco plástico, fornecendo aproximadamente 1,5kg da droga vegetal seca e particulada.

4.6 – Preparação e Análise do Extrato Bruto

Solução hidroetanólica a 80% foi escolhida como líquido extrator. De acordo com DIAS (2004), após avaliação por cromatografia em camada delgada, esta foi a melhor condição observada para a extração de grande parte dos compostos polares presentes no extrato. 50g da droga pulverizada foi extraída por maceração durante 5 dias à temperatura ambiente com 500mL do líquido extrator. O extrato foi filtrado por papel de filtro qualitativo e concentrado em rotaevaporador à temperatura de aproximadamente 60 °C. O resíduo foi transferido para uma cápsula de porcelana e seco à temperatura ambiente em capela com circulação de ar.

O extrato bruto obtido foi analisado por CCD comparativa e também por CLAE (segundo o gradiente descrito na tabela 3) para que fosse verificado o perfil de substâncias presentes. Após análise o mesmo foi submetido à partição com solventes de diferentes polaridades.

As análises do extrato bruto seguiram os seguintes parâmetros:

Análise Cromatográfica em Camada Delgada

- **Fase estacionária:** Sílica Gel 60 F₂₅₄
- **Fase Móvel:** Hexano : Acetato de Etila (4:6)
- **Revelação:** Visualização direta em luz Visível e em UV 254nm.

Análise em CLAE

- **Coluna:** LUNA C18 (250 x 4,6mm x 5 μ m)
- **Fase Móvel:** (A) Água
(B) MeCN
- **Volume de Injeção:** 10 μ L
- **Comprimento de Onda:** 210nm
- **Vazão:** 0,5mL/min
- **Gradiente:**

Tabela 3. Gradiente exploratório para avaliação do Extrato Bruto.

Tempo	%(A)	%(B)
0	100	0
10	100	0
40	0	100
50	0	100
51	100	0
60	100	0

- **Preparação das amostras:** Solubilização em metanol, filtração por membrana 0,45 μ m para um vial de CLAE.

4.7 – Partição com Solventes

Depois de seco, 10g do extrato hidroalcoólico foi ressuspenso em 100 mL de solução de metanol : água (1:9). As partições foram realizadas de acordo com o esquema apresentado na figura 9.

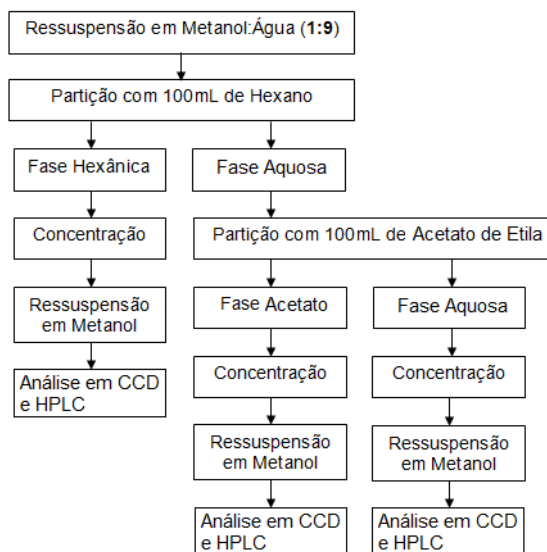


Figure 9. Fluxograma com o procedimento experimental para a partição líquido-líquido do extrato hidrialcoólico.

As análises das partições seguiram os mesmos parâmetros apresentados para o extrato bruto.

4.8 – Determinação da Alantoína

A alantoína pode ser determinada pelo método cromatográfico segundo os parâmetros determinados abaixo:

Coluna: Luna – C18 (Phenomenex) – 250 x 4,6 mm x 5µm

FM (A): Água

Eluição Isocrática: 100% (A)

Volume de injeção: 10µL

Vazão: 0,5mL/min

Detecção: 210nm

Preparo das amostras: Os extratos brutos e partições foram pesadas (50 mg), solubilizadas em metanol e filtradas por membrana 0,45µm para um vial de HPLC.

Preparação do Padrão: O padrão de Alantoína (SIGMA®) foi solubilizado em solução Metanol:Água (1:1) e mantido em banho ultrassônico até completa dissolução.

Para a análise da matéria prima (folhas), foram propostos alguns testes com a finalidade de se otimizar as condições de extração. Os testes foram propostos da seguinte maneira:

Teste 1: Neste teste procurou-se avaliar a influência do modo de extração (ultrassom ou agitação constante), ambos com a proporção de solventes determinada para o extrato bruto (Etanol 80%), à temperatura ambiente (25°C) e por um tempo pré fixado (60 minutos).

Tabela 4. Condições experimentais para o teste 1 na análise de matéria prima.

Etanol 80%, 25°, 60 minutos	
1A) Ultrassom	1B) Agitação

Teste 2: Com base no melhor teste determinado anteriormente, foram propostas as condições indicadas na tabela 5, onde foram variadas as temperaturas e proporções de etanol como solvente extrator.

Tabela 5. Condições experimentais para o teste 2 na análise de matéria prima.

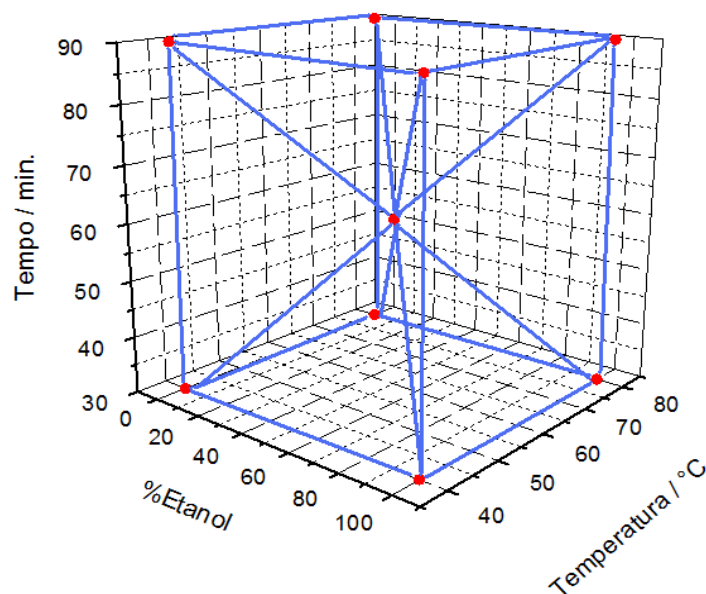
Agitação, 60 minutos								
40°C			60°C			80°C		
2 ^a	2B	2C	2D	2E	2F	2G	2H	2I
Água	Etanol	Etanol	Água	Etanol	Etanol	Água	Etanol	Etanol
	50%	100%		50%	100%		50%	100%

Teste 3: Com base no melhor teste determinado anteriormente, foram propostos os testes indicados na tabela 6, variando-se o tempo de extração.

Tabela 6. Condições experimentais para o teste 3 na análise de matéria prima.

Água, Agitação, 60°C		
3A) 30 minutos	3B) 60 minutos	3C) 90 minutos

Teste 4: Com a finalidade de se avaliar as interações entre as variáveis, propôs-se o seguinte planejamento experimental, combinando-se as variáveis tempo de extração, porcentagem de etanol e temperatura segundo o diagrama apresentado na figura 10.

**Figure 10.** Planejamento experimental referente à extração de alantoína da matéria prima.

Assim que as condições para a análise da matéria prima foram determinadas, procedeu-se à validação do método analítico de acordo com os parâmetros preconizados pela RE899 da Anvisa.

4.9 – Validação da Metodologia Analítica para Determinação da Alantoína

De acordo com a RE899 da Anvisa, os parâmetros a serem determinados para que um método possa ser considerado validado são a seletividade ou especificidade, a linearidade, o limite de detecção, o limite de quantificação, a precisão, a exatidão e a robustez. A seguir são descritos os conceitos e também os

parâmetros relacionados à validação de métodos analíticos, de acordo com as definições descritas na resolução RE899.

Seletividade e Especificidade: O termo especificidade, muitas vezes utilizado como sinônimo de seletividade define a capacidade do método em detectar somente o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Já a seletividade refere-se à capacidade de separação dos componentes de interesse junto a outras substâncias. Para que o teste possa ser realizado, deve-se efetuar a monitoração do grau de pureza do analito por detectores específicos, como por exemplo, o detector ultravioleta com arranjo de diodos ou *diode array* (DAD).

Linearidade e intervalo: A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados na faixa analítica especificada. Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico, que não deve ser estatisticamente diferente de um, observando-se que a inclinação da reta seja diferente de zero. O intervalo do método analítico corresponde à faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método. Convencionou-se primeiro selecionar o intervalo de trabalho (baseado no nível de concentração do analito que se deseja determinar) e depois determina-se a relação sinal versus concentração, avaliando-se sua linearidade. A curva analítica deve ser obtida em cinco níveis de concentração, sendo cada uma delas aplicadas em triplicata. O parâmetro linear (R^2) mínimo aceitável deve ser de 0,99.

Limite de Detecção: É a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção pode ser determinado mediante o sinal/ruído nos processos analíticos que exibem uma linha de base. Calcula-se o triplo da área de um pico cromatográfico considerado como ruído em uma região pré-determinada do cromatograma.

Limite de Quantificação: É definido como sendo a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra com exatidão e precisão aceitáveis sob

as condições experimentais adotadas. O limite de quantificação pode ser determinado mediante o sinal/ruído nos processos analíticos que exibem uma linha de base. É determinada a área de um pico cromatográfico considerado como ruído em uma região pré-determinada do cromatograma e então este valor é multiplicado por dez.

Exatidão: É definida como sendo a concordância entre o valor real de um analito na amostra (obtido pelo método analítico) e aquele estimado/calculado teoricamente.

A exatidão do método pode ser determinada pelo ensaio de recuperação, o qual é considerado o meio mais utilizado para a validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada à exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra (entre outros).

O estudo da recuperação consiste na “fortificação” da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. Calcula-se a quantidade percentual recuperada pelo processo usando a fórmula:

$$\text{Rec\%} = \frac{(\text{Valor obtido} - \text{Valor real})}{\text{Valor real}} \times 100$$

Deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade e intervalo de concentrações do padrão determinado.

São verificadas três concentrações diferentes (alta, média e baixa) em triplicata para cada uma delas. A exatidão é expressa por meio do desvio padrão relativo (DPR) e o seu valor máximo aceitável é de 5%.

Precisão: É definida como sendo o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra. Usualmente é expressa como sendo o desvio padrão, variância ou coeficiente de variação de diversas medidas.

O teste pode ser dividido em três etapas: repetibilidade ou precisão intra-corridas, precisão intermediária ou precisão inter-corridas e reprodutibilidade.

Repetibilidade: A repetibilidade expressa a precisão nas mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes, dia e mesmas condições ambientais) em pequeno espaço de tempo. É verificada com três concentrações diferentes do extrato (baixa, média e alta) sendo cada uma delas aplicada em triplicata. A repetibilidade é expressa como sendo o desvio padrão relativo (DPR), tendo como valor máximo aceitável 5%.

$$\text{DPR} = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Conc. Média Experimental}} \times 100$$

Precisão Intermediária: A precisão intermediária expressa o resultado de uma mesma amostra analisada em dias diferentes com equipamento ou operadores diferentes. A análise foi realizada com a mesma amostra de matéria prima de Chá de Bugre em dois dias e dois analistas diferentes. Os resultados são expressos como sendo o desvio padrão relativo (DPR), sendo seu valor máximo aceitável de 5%.

Reprodutibilidade: A reprodutibilidade expressa a precisão entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, geralmente em estudos colaborativos. A reprodutibilidade é expressa como sendo o desvio padrão relativo entre os resultados e o seu valor máximo aceitável é de 5%.

Robustez: A robustez do método é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado sob pequenas, mas estudadas variações nos parâmetros do método e prover indicação da sua dependência durante o uso normal.

A avaliação da robustez pode ser considerada durante a fase de desenvolvimento e depende do tipo de processo em estudo. Nos testes de robustez

são aplicados experimentos estatísticos que examinam, simultaneamente, os efeitos das alterações em diferentes variáveis do método. No caso de métodos cromatográficos, as variações se referem a diferentes tipos de coluna, temperatura e vazão, entre outras.

Os testes de robustez, em geral, servem para indicar os fatores que podem influenciar, significativamente, a resposta do método estudado. Tal fato fornece a dimensão do problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições ou é transferido, por exemplo, para outro laboratório.

No método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), deve-se avaliar o uso de diferentes lotes ou fabricantes de coluna, o pH da fase móvel e também a sua vazão.

4.10 – Avaliação da Atividade Antihemorrágica contra o veneno de *Bothrops jararaca*

A avaliação deste tipo de atividade consiste no poder de neutralização que algumas substâncias possuem frente à ação de enzimas como a Matriz Metaloproteinases Zn^{2+} dependentes (MMP), presentes no veneno de *Bothrops jararaca*. Estas enzimas são responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular, possuindo um efeito citotóxico em células endoteliais e também atuando em alguns componentes do sistema hemostático. O efeito neutralizador dos extratos basicamente está na modulação das MMPs dependentes dos íons Zn^{2+} , que são quelados pelas substâncias potencialmente ativas (NISHIJIMA *et al.*, 2009).

Para a avaliação desta atividade foram empregados o extrato bruto etanólico e as fases Acetato de Etila e Aquosa, advindos da partição líquido-líquido.

O veneno liofilizado de *B. jararaca* foi obtido do Instituto Butantan, sendo mantido a $-20^{\circ}C$ até a sua utilização. A diluição do veneno foi realizada em tampão fosfato salino (PBS) até a dose hemorrágica mínima, já otimizada por NISHIJIMA *et al.*, 2009.

Camundongos machos da linhagem “Swiss” pesando entre 25 – 30g foram obtidos do biotério central da UNESP-Botucatu (Botucatu, SP, Brasil). Os animais foram alimentados com ração certificada Nuvilab CR-a[®] (Nuvital), com livre acesso à água e mantidos sob condições padronizadas sendo 12h na ausência de luz e 12h na presença de luz à temperatura de $21^{\circ}C \pm 1\%$ (NISHIJIMA *et al.*, 2009).

O protocolo experimental foi submetido e também aprovado pelo comitê de ética da universidade.

A determinação da dose mínima hemorrágica: Os animais foram divididos randomicamente em 6 grupos de 6 a 7 camundongos cada. Estes foram anestesiados com éter e receberam doses crescentes do veneno (mínima de 1,25µg e máxima de 20µg), aplicadas via rota intradérmica dorsal. Duas horas depois, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o diâmetro da área hemorrágica foi medido por um paquímetro digital da marca Mitutoyo® (BRADFORD, 1976). A dose hemorrágica mínima foi determinada como sendo a menor dose de veneno que induziu uma área hemorrágica de 10 mm de diâmetro em 2h. Este método, que relaciona a atividade antihemorrágica com a média das medidas dos diâmetros dos halos hemorrágicos obtidos após injeção intradérmica do veneno é específico, rápido e reprodutível. A quantificação consiste na leitura dos dois maiores diâmetros perpendiculares do halo, utilizando a média para revelar o tamanho do halo hemorrágico (KONDO, *et al.*, 1960).

A neutralização do efeito hemorrágico: Para o estudo da neutralização do veneno de *B. jararaca*, fixou-se a relação veneno : extrato em (1 : 50) (condições experimentais previamente já estabelecidas por NISHIJIMA *et al.*, 2009) afim de que fosse assegurada a interação entre o veneno e as substâncias presentes em pequena quantidade nos extratos. Após realizada a mistura do extrato com o veneno, estes foram incubados à temperatura de 20-23°C por 40 minutos. Em cada experimento os animais foram divididos em grupos que receberam somente o PBS (para assegurar que o veículo é inócuo), veneno sem extrato ou fração (controle positivo), somente extrato ou fração (para assegurar que a planta é inócua) e veneno com extrato ou fração (para avaliar o potencial anti-hemorrágico da planta). Duas horas após a injeção, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical. O potencial de neutralização dos extratos foi avaliado através da medida do diâmetro (mm) capturada pelo paquímetro digital da marca Mitutoyo®, enquanto que a área hemorrágica (mm²) foi obtida pelo programa AvSoft Bioview Spectra®, comparando-se o grupo que recebeu somente o veneno com os animais que receberam a injeção intradérmica da mistura de veneno mais o extrato ou fração (NISHIJIMA *et al.*, 2009).

As análises estatísticas foram baseadas em ANOVA seguido pelo teste de Dunnett's, considerando-se 95% de significância ($p < 0,05$).

4.11 – Avaliação da Atividade Antifúngica

Os ensaios antifúngicos envolvendo o extrato bruto e as partições das folhas de *Cordia ecalyculata* foram desenvolvidos no Laboratório de Micologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, sob a supervisão da Prof^a. Dra. Maria José Mendes Giannini.

Os ensaios antifúngicos foram desenvolvidos de acordo com o método de microdiluição em caldo, segundo no documento M27- A2 do Instituto de Padrões de Laboratórios Clínicos. O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 com L-glutamina, ácido morfolinopropanosulfônico (MPOS), suplementado com 2% de glicose.

As amostras foram dissolvidas em DMSO e logo dissolvidas no meio de cultura RPMI, alcançando uma concentração inicial de 1000 $\mu\text{g/mL}$. A suspensão de células fúngicas foi preparada em salina 0,85% com densidade fúngica equivalente à 1×10^5 unidades formadoras de colônia/mL. Esta suspensão foi inoculada sobre microplacas com as substâncias, sendo este inocuo diluído até a concentração de 0,48 $\mu\text{g/mL}$. As microplacas foram incubadas sob agitação constante a uma temperatura de 37°C, durante 24 horas para *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* e 48 horas para *Cryptococcus neoformans*. O controle positivo empregado nos ensaios de fungitoxicidade foi a anfotericina B. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a concentração capaz de inibir em 100% o crescimento fúngico, sendo este analisado por espectrofotometria.

4.12 – Avaliação da Atividade Antioxidante

O extrato e as frações obtidas foram analisados por CCDC em sistemas de eluentes de diversas polaridades que permitiram a visualização dos constituintes de baixa, média e alta polaridade. A revelação das placas cromatográficas foi feita com solução de β -caroteno, que indica a presença de substâncias antioxidantes e seqüestradoras de radicais livres.

- **Descoramento de β -caroteno:** Após eluição e secagem, as placas cromatográficas foram nebulizadas com solução 0,02% de β -caroteno em MeOH. As placas foram observadas após 4 horas sob luz natural ou após descoramento do

fundo, resultante da oxidação do β -caroteno, evidenciando as substâncias com propriedades antioxidantes em manchas amarelas (PRATT e MILLER *et al.*, 1984).

- **Redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH):** No teste espectrofotométrico uma solução 0,004% de DPPH é misturada com soluções da amostra em diversas concentrações. A mistura é agitada a temperatura ambiente na ausência de luz. Quando o radical DPPH, em presença de um antioxidante doador de hidrogênio, passa a sua forma reduzida DPPH-H, o seu elétron desemparelhado não está mais em conjugação com os grupos arila, e o DPPH-H sofre um decréscimo da absorbância em 517nm. O resultado é observado por uma curva de concentração da amostra antioxidante pela $\% \Delta A$ (CORSINO *et al.*, 2003).

4.13 – Avaliação da Atividade Citotóxica em Células Normais

Foi avaliado o potencial citotóxico do extrato bruto e frações hexânica, acetato de etila e aquosa de *C. ecalyculata* Vell. utilizando uma linhagem de células normais de pele humana transformado pelo SV-40. A linhagem utilizada foi a HaCat (queratinócito normal de pele humana), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. A análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do NCI (EUA), que testa mais de 10000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990) foi descrita primeiramente por MOSMANN (1983) e modificado por ALLEY (1996), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996). As células serão plaqueadas na concentração de 2×10^4 células/100 μ L, para células aderidas. Os diversos compostos serão acrescidos em diferentes concentrações, que variaram entre 3,9 a 125 μ g mL⁻¹ para extratos e frações. As placas são centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, são adicionados 200 μ L da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas, incubadas por 3h. A absorbância é lida após dissolução do precipitado com DMSO em espectrofotômetro de placa a 550nm.

4.14 – Avaliação da Atividade Citotóxica em Células Tumorais

Foi verificada a citotoxicidade *in vitro* do extrato bruto e partições de *C. ecalyculata* em 3 linhagens de células tumorais. Essa análise faz parte de um *screening* inicial para determinação do potencial antitumoral destas amostras.

As linhagens tumorais utilizadas, MDA/MB-435 (melanoma - humano), HCT-8 (cólon - humano) e SF-295 (sistema nervoso - humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril e testadas na concentração de 50µg/mL para o extrato bruto e 25µg/mL para as partições.

O método utilizado foi o MTT, cuja análise permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

As células foram plaqueadas na concentração de 3×10^4 cel/mL para a linhagem MDA/MB-435, na concentração de 1×10^5 cel/mL para SF-295 e 3×10^5 cel/mL para a linhagem HCT-8, após 24 h as amostras foram adicionadas. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 – Análise Cromatográfica do Extrato Bruto e das Partições

Depois de realizada a extração hidroalcoólica, posterior concentração e secagem, obteve-se 15 g do extrato bruto na forma de pasta. Considerando-se que partimos de 50g de folhas, obtemos uma razão entre matéria prima e extrato bruto de aproximadamente 3,3:1, que é uma razão bastante coerente e de possível alcance quando de uma produção em escala piloto ou mesmo industrial (larga escala).

Em seguida, 10 g do extrato bruto foi submetido a partições com solventes orgânicos, fornecendo as massas presentes na tabela 7.

Tabela 7. Massas das frações referentes à partição do extrato hidroalcoólico.

<i>Fração</i>	<i>Massa (g)</i>
Hexânica	2,90
Acetato de Etila	1,23
Aquosa	4,81

Esta distribuição de massas indica que cerca de 32% dos compostos são de baixa polaridade e estão distribuídos na fase hexânica, 13% são de média polaridade e estão presentes na fase acetato de etila e mais de 53% são de alta polaridade e estão presentes na fase aquosa.

As análises cromatográficas em camada delgada apresentadas na figura 11 indicam a efetividade das partições ao separar o extrato bruto em grupos de compostos com diferentes polaridades, vindo a confirmar as informações apresentadas no parágrafo anterior.

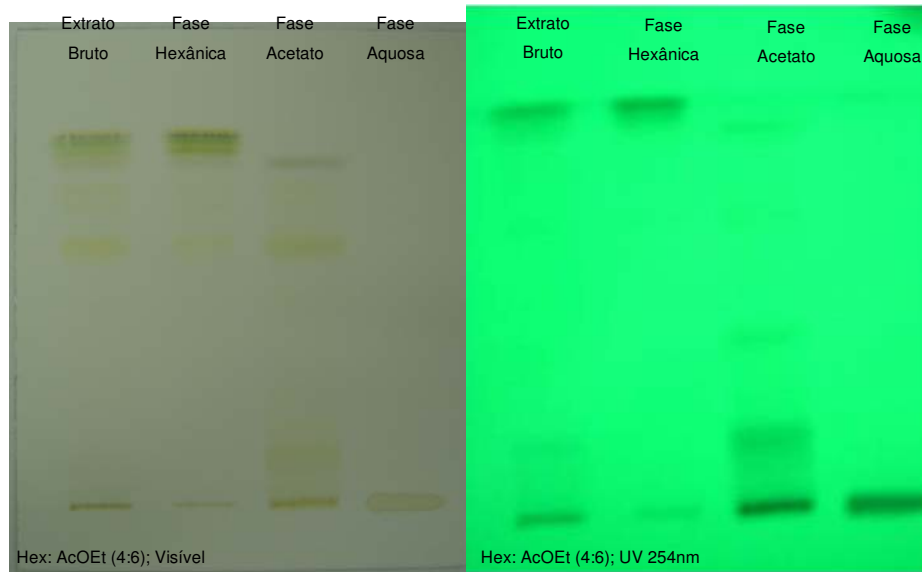
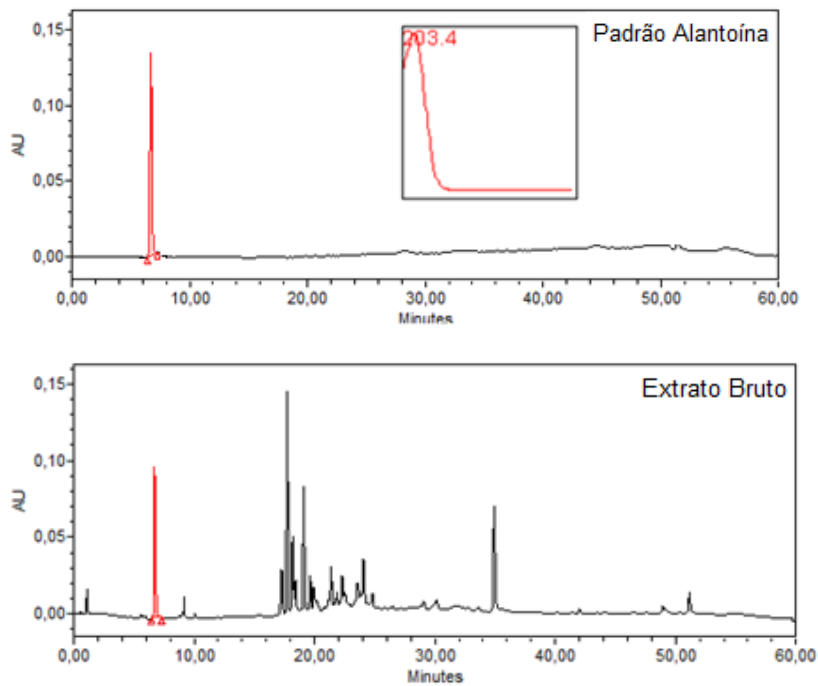


Figure 11. Cromatoplaça em Camada Delgada Comparativa referente ao extrato bruto e as partições.

Além da análise por CCDC, as amostras foram comparadas por CLAE/DAD em gradiente exploratório para que fosse verificado o perfil das substâncias presentes na região do ultravioleta.



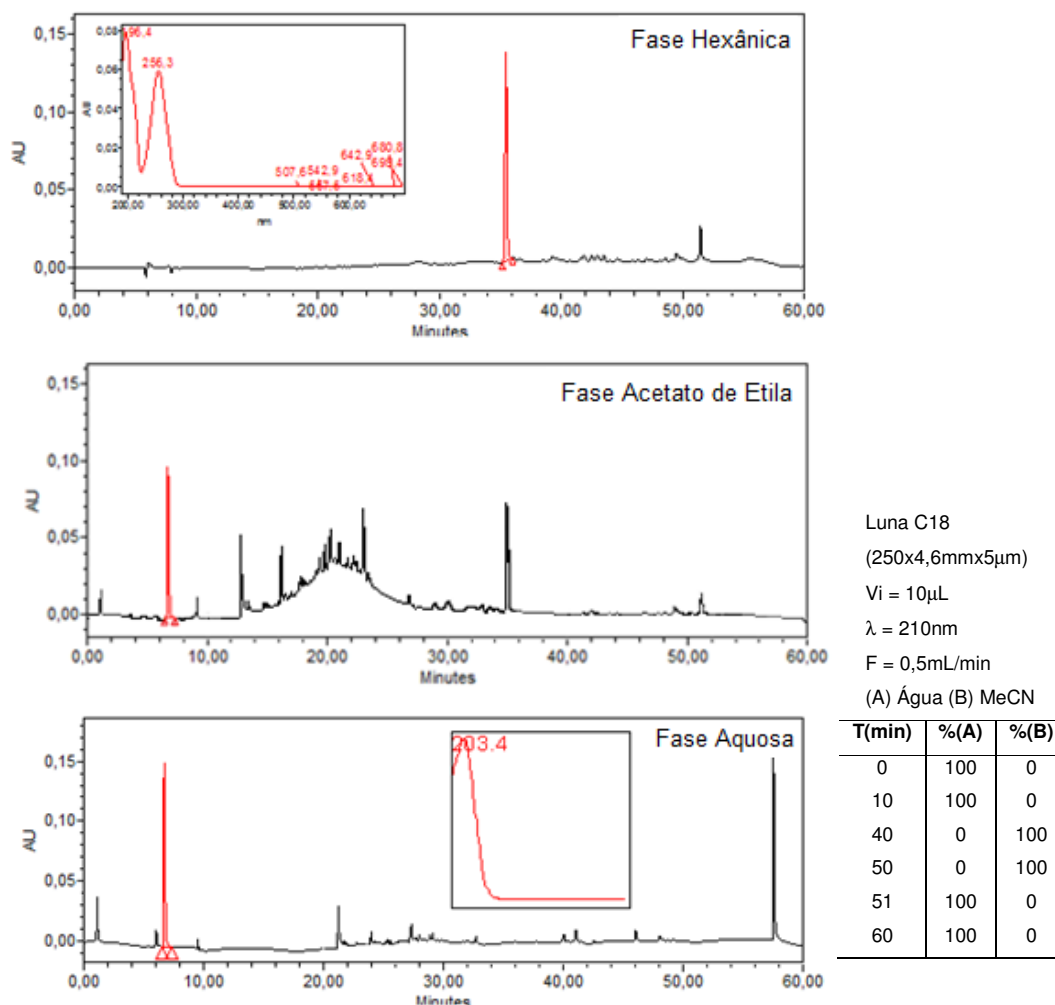


Figure 12. Cromatogramas exploratórios referentes ao extrato bruto e as partições líquido-líquido.

A partir dos cromatogramas apresentados na figura 12, pode-se perceber uma distribuição bastante coerente com os resultados apresentados nas análises por CCDC. Vale ressaltar que a avaliação por CLAE foi conduzida em 210nm afim de que fosse monitorada a substância alantoína, descrita como sendo um dos compostos majoritários nos extratos de *Cordia ecalyculata* por SAITO, 1986. Nota-se que tanto na fração acetato de etila como na aquosa, há uma substância de caráter bastante polar, eluindo entre 6 e 8 minutos e cujo espectro ultravioleta é caracterizado por apresentar absorção em comprimentos de onda próximos a 200nm. Estas características são condizentes com a molécula da alantoína no que diz respeito tanto à sua polaridade como às suas propriedades espectrais.

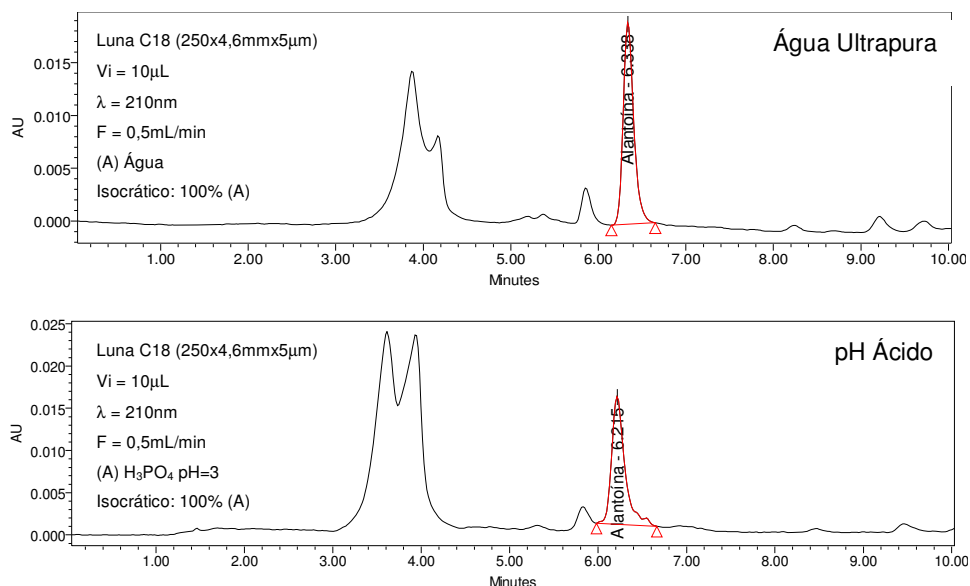
5.2 – Determinação de Alantoína por CLAE

Existem alguns trabalhos já publicados que descrevem a determinação de Alantoína por CLAE utilizando colunas do tipo C18. HAGHI, G. *et al.* (2008) publicaram um método para a determinação cromatográfica quali e quantitativa de alantoína em milho (*Zea mays*) e, baseado neste trabalho foram iniciados os testes para a determinação da mesma substância em *C. ecalyculata*.

Procurando simplificar a análise e também evitar a utilização da solução tampão proposta pelo método original (25mM de KH_2PO_4 pH=3 ajustada com H_3PO_4), realizou-se uma análise comparativa entre água ultrapura, água acidificada a pH=3 com H_3PO_4 e a solução tampão proposta no método original.

A figura 13 mostra que a utilização do tampão não provocou uma mudança significativa tanto na seletividade como na retenção da substância pela coluna, ao passo que, com a utilização da fase acidificada, nota-se um encaudamento na parte frontal do pico cromatográfico.

Com base nas considerações apresentadas acima e também nos resultados observados na figura 13, optou-se por utilizar somente água ultrapura como fase móvel do método.



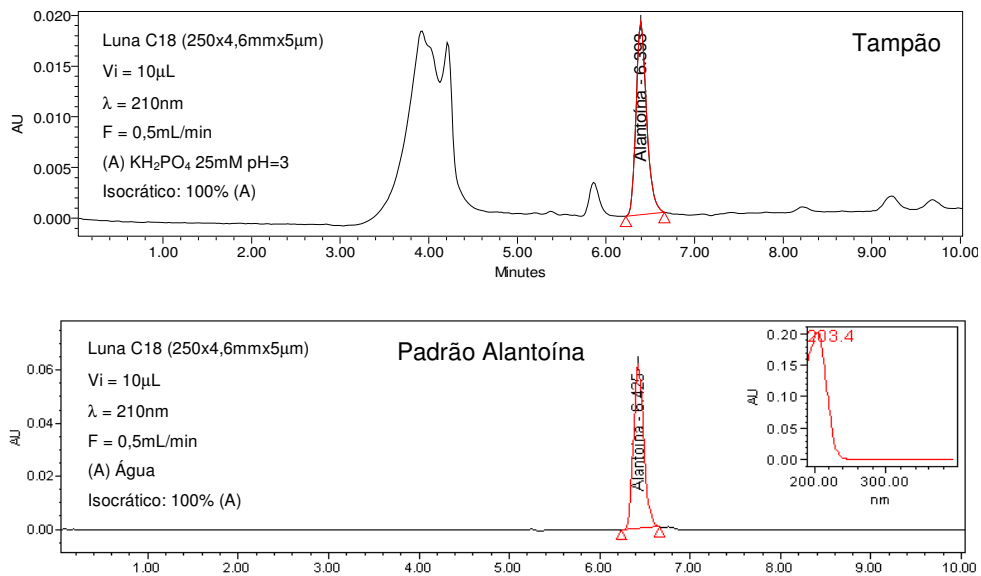


Figure 13. Cromatogramas comparativos referentes à análise de Alantoína utilizando diferentes tipos de fase móvel.

5.3 – Otimização do método para extração de Alantoína na Matéria Prima

O objetivo dos testes realizados foi de avaliar alguns parâmetros que fazem parte do processo extrativo dentro do método de determinação de alantoína em *C. ecalyculata* e, com isso, dizer com mais certeza qual é o teor deste marcador na planta estudada. Inicialmente foram avaliadas algumas variáveis separadamente e, em seguida propôs-se um diagrama com alguns testes que se entrecruzariam para que fossem estudadas as interações entre estas variáveis.

A tabela 8 e a figura 14 abaixo resumem os valores encontrados.

Tabela 8. Resultados experimentais encontrados na otimização da análise de Matéria Prima.

	Teste	Alantoína (%)
1A	EtOH 80%; 25 °C; 60 min.; Ultrassom	0,57
1B	EtOH 80%; 25 °C; 60 min.; Agitação	0,67
2A	H ₂ O; 40 °C; 60 min.; Agitação	0,69
2B	EtOH 50%; 40 °C; 60 min.; Agitação	0,52
2C	EtOH 100%; 40 °C; 60 min.; Agitação	0,20
2D	H₂O; 60 °C; 60 min.; Agitação	0,81
2E	EtOH 50%; 60 °C; 60 min.; Agitação	0,68

2F	EtOH 100%; 60 °C; 60 min.; Agitação	0,24
2G	H ₂ O; 80 °C; 60 min.; Agitação	0,78
2H	EtOH 50%; 80 °C; 60 min.; Agitação	0,78
2I	EtOH 100%; 80 °C; 60 min.; Agitação	0,23
3A	H ₂ O; 60 °C; 30 min.; Agitação	0,54
3B	H₂O; 60 °C; 60 min.; Agitação	0,80
3C	H ₂ O; 60 °C; 90 min.; Agitação	0,77

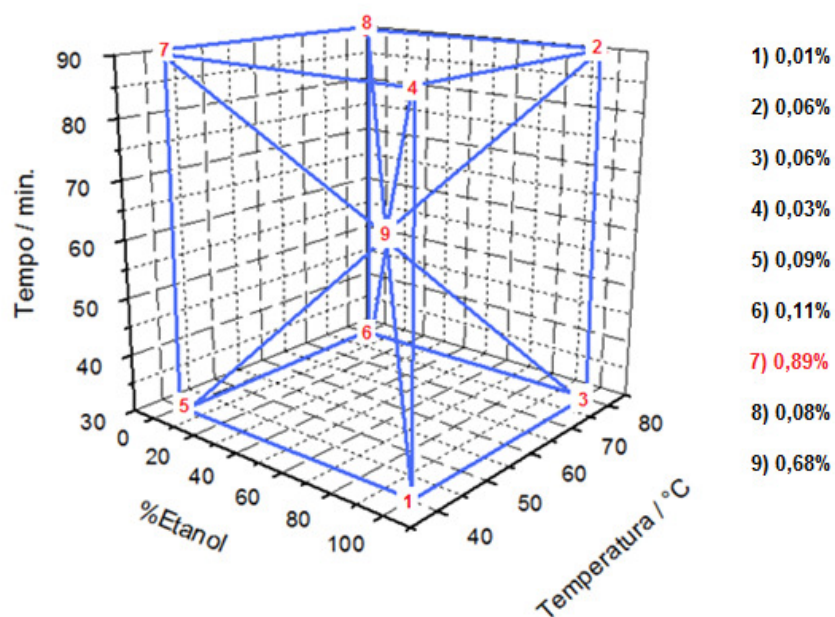


Figure 14. Resultados experimentais referentes ao diagrama com as condições de extração para a alantoína.

A partir dos resultados observados, constata-se que as melhores condições de extração são água a 40 °C sob agitação constante por 90 minutos, obtendo-se um teor de 0,89% de alantoína para as folhas de chá de bugre.

O extrato bruto e também as partições foram analisadas, encontrando-se os seguintes valores:

- Extrato Bruto: 0,75%
- Fase Hexânica: 0%
- Fase Acetato de Etila: 0,15%
- Fase Aquosa: 1,54%

Os teores de alantoína observados nos testes de extração para a matéria prima são condizentes com a característica polar desta substância. Isto também é evidenciado na distribuição de teores encontrados para o extrato bruto e partições.

5.4 – Validação do Método para Determinação de Alantoína por CLAE

Depois de determinadas as melhores condições de extração para a alantoína, procedeu-se à validação do método cromatográfico segundo os parâmetros descritos na RE899 da Anvisa.

A seguir são apresentados os resultados dos testes realizados para a validação do método analítico.

Especificidade e Seletividade

Para que o teste possa ser realizado, deve-se efetuar a monitoração do grau de pureza dos analitos por detectores específicos, como por exemplo, o detector ultravioleta com arranjo de diodos (DAD).

Na matéria prima de Chá de Bugre, o marcador alantoína foi monitorado a partir de um detector DAD, através do qual pode ser confirmado tanto a validade do método analítico como o grau de pureza da substância de interesse.

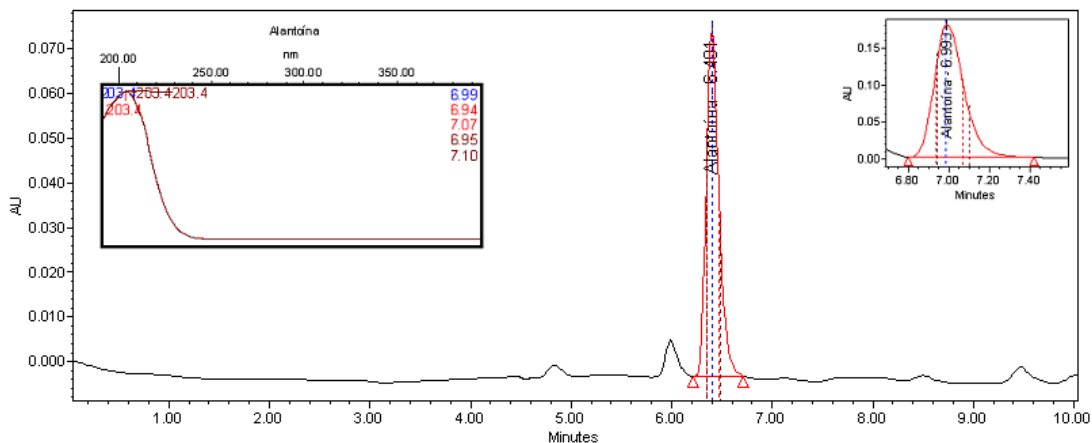


Figure 15. Cromatograma referente ao teste de seletividade na matéria prima de Chá de Bugre.

Com este teste, pode-se perceber que o corte do pico cromatográfico em diferentes regiões apresenta o mesmo espectro de absorção no ultravioleta. Esta

informação pode ser utilizada como um dado indicativo da pureza do pico cromatográfico.

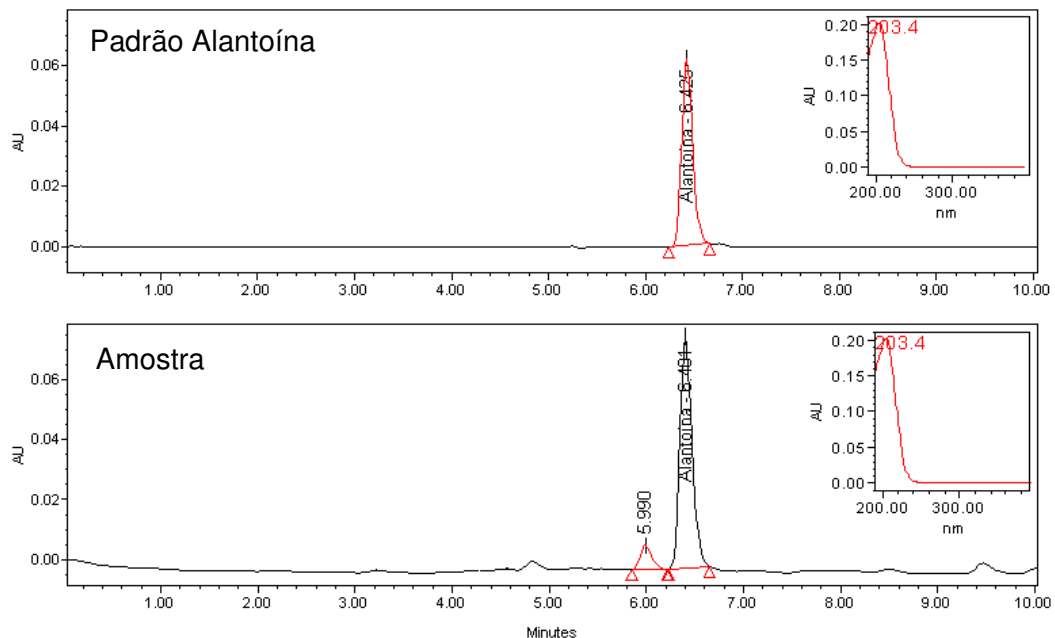


Figure 16. Cromatograma referente ao teste de seletividade na matéria prima de Chá de Bugre. Comparação entre a amostra, padrão alantoína e respectivos espectros UV.

A figura 16 mostra que, ao comparar amostra com o padrão, percebe-se uma grande similaridade tanto em relação ao tempo de retenção do pico da alantoína como no seu respectivo espectro de absorção no ultravioleta. Estes dois testes garantem que o método é seletivo e também específico para a determinação de alantoína nas folhas e extratos de chá de bugre.

Linearidade

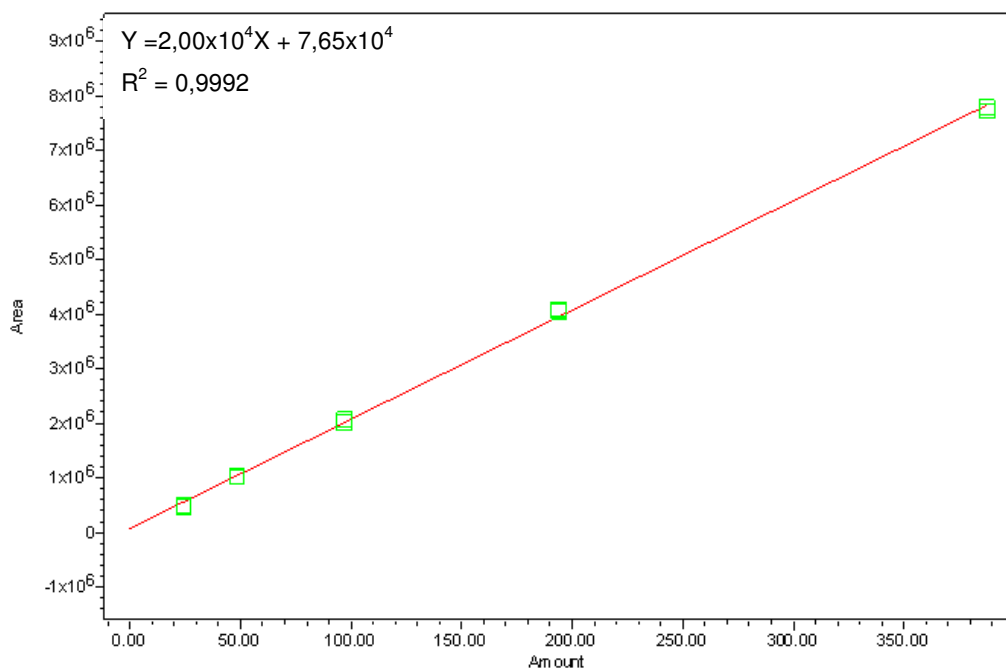
A curva analítica deve ser obtida em cinco níveis de concentração, sendo cada uma delas aplicadas em triplicata. O parâmetro linear (R^2) mínimo aceitável deve ser de 0,99.

A curva analítica da alantoína foi gerada com as concentrações apresentadas na tabela 9, aplicadas em triplicata.

Tabela 9. Valores de concentração do padrão alantoína aplicados.

	1º Nível (mg/L)	2º Nível (mg/L)	3º Nível (mg/L)	4º Nível (mg/L)	5º Nível (mg/L)
Alantoína	387,50	193,80	96,87	48,44	24,22

Na figura 17 a seguir, é apresentada a curva analítica da alantoína, juntamente com o respectivo parâmetro linear e também uma tabela mostrando as respostas de área obtidas nas análises.

**Figure 17.** Curva analítica referente ao padrão alantoína.**Tabela 10.** Respostas de área em função das concentrações de alantoína.

Padrão	Nível	Resposta (área)	Desvio Padrão Relativo (%)
Alantoína	1	7786369	0,52
		7787446	
		7717392	
	2	4080488	0,44
		4086366	
		4052804	
	3	2071570	1,64
		2010376	
		2065155	

4	1037285	0,64
	1025107	
	1027006	
5	477912	1,42
	488575	
	490779	

Na seqüência são apresentados os cromatogramas dos padrões (aplicados em triplicata) referente aos cinco níveis de concentração.

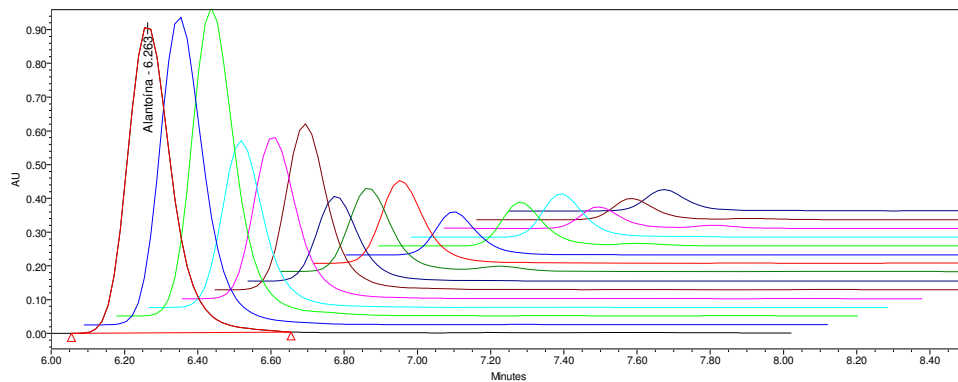


Figure 18. Cromatogramas dos padrões de alantoina nos diferentes níveis de concentração (mg/L).

A partir dos dados apresentados na figura 17, pode-se garantir que o método analítico foi linear entre as concentrações de 387,50mg/L e 24,22mg/L.

Limite de Detecção

O limite de detecção pode ser determinado mediante a razão de sinal/ruído nos processos analíticos que exibem uma linha de base. Calcula-se o triplo da área de um pico cromatográfico considerado como ruído em uma região pré-determinada do cromatograma.

Determinou-se a área do sinal/ruído de dois cromatogramas diferentes, como exemplificado abaixo em um deles. A média das áreas foi multiplicada por três, obtendo-se assim os valores de limite de detecção em termos de área e concentração.

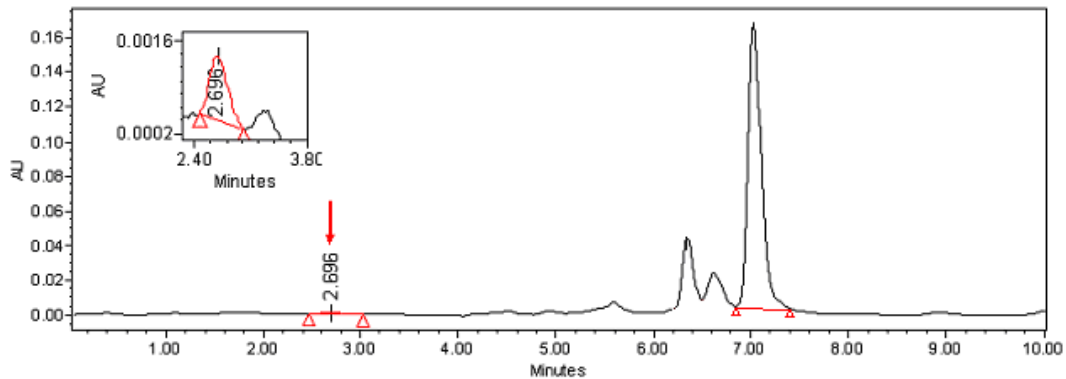


Figure 19. Cromatograma da matéria prima de Chá de Bugre apresentando o sinal/ruído para a determinação do limite de detecção do método.

Tabela 11. Valores de área e concentração do sinal/ruído para a determinação do Limite de Detecção.

Área do Sinal/Ruído	Média das Áreas	Concentração Equivalente do Sinal/Ruído (mg/L)	Média das Concentrações Equivalentes do Sinal/Ruído (mg/L)
15795	15860	0,7875	0,7907
15924		0,7940	

Portanto, temos como resultado:

LIMITE DE DETECÇÃO EM TERMOS DE ÁREA: 47579

LIMITE DE DETECÇÃO EM TERMOS DE CONCENTRAÇÃO: 2,37 mg/L.

Limite de Quantificação

O limite de quantificação pode ser determinado mediante o sinal/ruído nos processos analíticos que exibem uma linha de base. Calcula-se a área de um pico cromatográfico considerado como ruído em uma região pré-determinada do cromatograma e multiplica-se este valor por dez.

Determinou-se a área da razão sinal/ruído de dois cromatogramas diferentes, como exemplificado abaixo em um deles. A média das áreas foi multiplicada por dez, tendo assim os valores de limite de quantificação em termos de área e concentração.

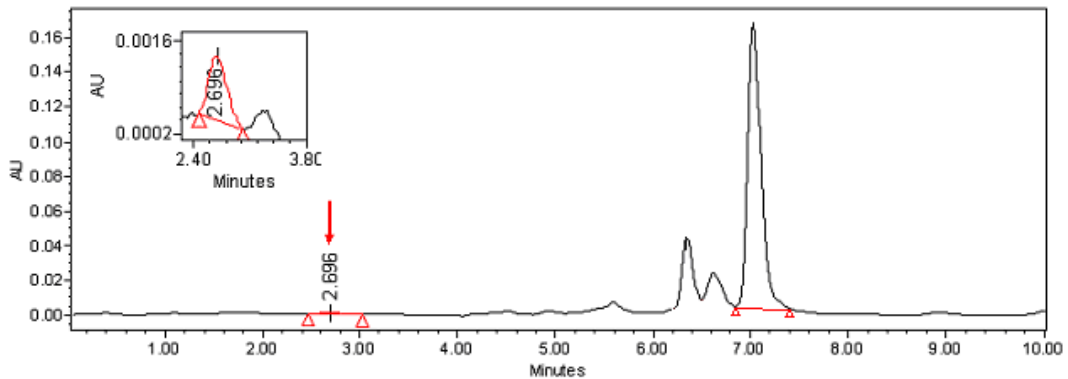


Figure 20. Cromatograma da matéria prima de Chá de Bugre apresentando o sinal/ruído para a determinação do limite de quantificação do método.

Tabela 12. Valores de área e concentração do sinal/ruído para a determinação do Limite de Quantificação.

Área do Sinal/Ruído	Média das Áreas	Concentração Equivalente do Sinal/Ruído (mg/L)	Média das Concentrações Equivalentes do Sinal/Ruído (mg/L)
15795	15860	0,7875	0,7907
15924		0,7940	

Portanto, temos como resultado:

LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO EM TERMOS DE ÁREA: 158600

LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO EM TERMOS DE CONCENTRAÇÃO: 23,7

mg/L

Exatidão

Deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade e intervalo de concentrações do padrão determinado.

São verificadas três concentrações diferentes (alta, média e baixa) em triplicata para cada uma delas. A exatidão é expressa por meio do desvio padrão relativo (DPR) e o seu valor máximo aceitável é de 5%.

O padrão escolhido para o teste foi o Ácido Ascórbico que, ao ser analisado, apresentava resposta semelhante no detector ultravioleta (UV-DAD) e também não coelúia com nenhum dos picos presentes na amostra.

A curva analítica do Ácido Ascórbico (figura 22) foi construída com os cinco níveis de concentração indicados na tabela 13, aplicadas em triplicata.

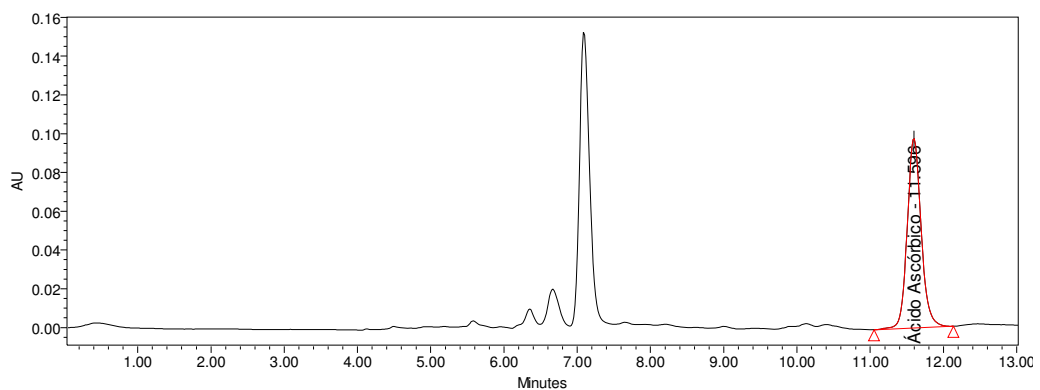
Tabela 13. Valores de concentração do padrão Ácido Ascórbico aplicados.

	1º Nível (mg/L)	2º Nível (mg/L)	3º Nível (mg/L)	4º Nível (mg/L)	5º Nível (mg/L)
Ácido Ascórbico	740,0	370,0	185,0	92,5	46,3

Foram preparadas três soluções da matéria prima de Chá de Bugre e fortificadas com diferentes concentrações de Ácido Ascórbico. As porcentagens de recuperação de cada uma dessas concentrações são apresentadas na tabela 14.

Tabela 14. Resultados obtidos no ensaio de exatidão.

	Concentração Baixa (15mg/L)	Concentração Média (35mg/L)	Concentração Alta (110mg/L)
Concentração recuperada (mg/L)	15,22	34,06	106,2
	14,52	36,29	114,8
	14,84	35,75	109,1
Média conc.	14,86	35,37	110,0
Porcentagem de recuperação	1,47	2,69	3,45
	3,20	3,69	4,36
	1,07	2,14	0,82
Média (%)	0,93	1,05	2,88

**Figure 21.** Cromatograma referente à análise de Exatidão do método para a análise de *C. ecalyculata*.

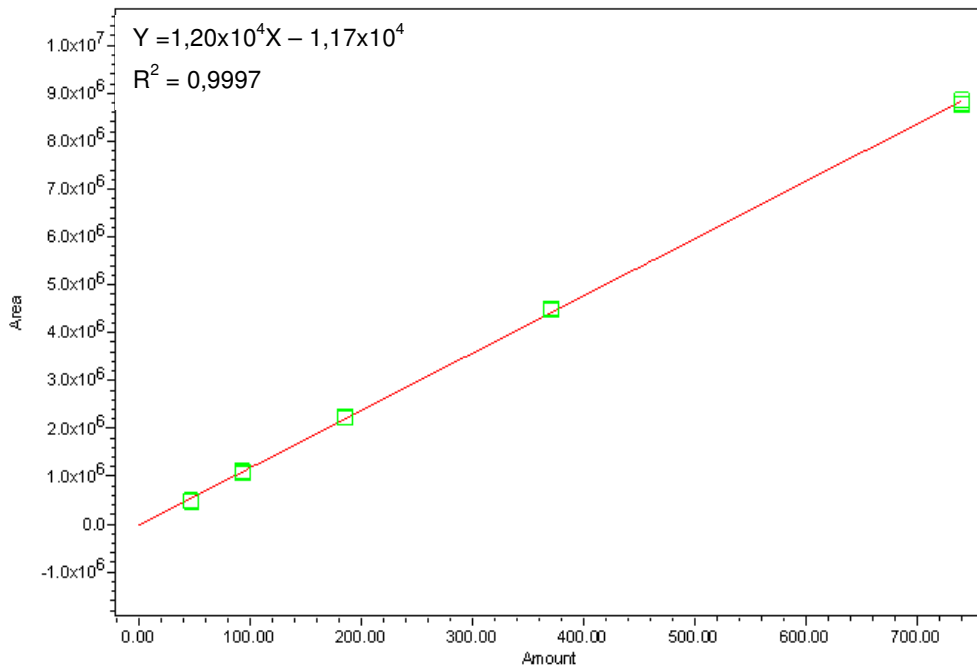


Figure 22. Curva analítica referente ao padrão Ácido Ascórbico.

Tabela 15. Respostas de área em função da concentração referentes à curva analítica de quantificação do Ácido Ascórbico.

<i>Padrão</i>	<i>Nível</i>	<i>Resposta (área)</i>	<i>Desvio Padrão Relativo (%)</i>
Ácido Ascórbico	1	8785300	0,58
		8757320	
		8856185	
	2	4503060	0,34
		4486999	
		4472376	
	3	2247419	0,46
		2241259	
		2227358	
	4	1106975	2,22
		1083903	
		1058805	
	5	492861	2,01
		484948	
		472717	

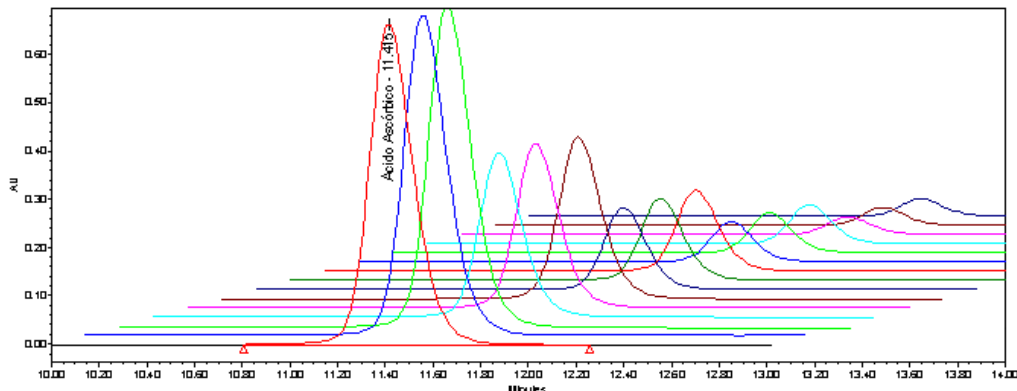


Figure 23. Cromatogramas referentes ao padrão Ácido Ascórbico nos diferentes níveis de concentração.

A partir dos dados referentes à porcentagem de recuperação do Ácido Ascórbico nas amostras, apresentados na tabela 14, pode-se comprovar a exatidão do método analítico.

Precisão

Para o estudo da precisão, foram avaliados 3 testes: a repetibilidade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade.

a) Repetibilidade

A repetibilidade foi verificada em três concentrações diferentes do extrato (de acordo com a RE899, concentração baixa, que equivale a 80% da concentração teórica do teste; concentração média, que equivale à concentração teórica do teste; e concentração alta, que equivale à 120% da concentração teórica do teste) sendo cada uma delas aplicada em triplicata. A repetibilidade é expressa como sendo o desvio padrão relativo (DPR) entre as análises e tem como valor máximo aceitável 5%.

$$\text{DPR} = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Conc. Média Experimental}} \times 100$$

Tabela 16. Resumo dos resultados obtidos no teste de repetibilidade.

	Concentração Alta (mg/L)	Concentração Média (mg/L)	Concentração Baixa (mg/L)
Concentração (mg/L)	6013,32	5986,64	5817,28
	5814,15	5867,19	5731,82
	5849,79	5758,55	5752,35
Média conc.	5892,42	5870,79	5767,15
DP	106,21	114,09	44,61
DPR (%)	1,80	1,94	0,77

b) Precisão Intermediária

As análises para verificação da precisão intermediária foram realizadas com a mesma amostra de matéria prima de Chá de Bugre em dois dias e dois analistas diferentes. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR), sendo seu valor máximo aceitável de 5%.

As análises foram realizadas com a concentração média (tomada de ensaio proposta no método analítico) das amostras, aplicadas em triplicata. A primeira análise foi realizada no dia 16/06/09 pelo operador Murilo Massao Assonuma (OP1) e a segunda análise foi realizada pela operadora Fernanda Martinelli (OP2) no dia 17/06/08. Os resultados são resumidos na tabela 17.

Tabela 17. Resumo dos resultados obtidos no teste de precisão intermediária.

	OP1	OP2	DPR(%)
Concentração (mg/L)	6013,32	5895,92	1,39
	5814,15	5920,25	1,28
	5849,79	5747,52	1,25
Média conc.	5892,42	5854,56	0,46
DP	106,21	93,50	N. A.*
DPR (%)	1,80	1,60	N. A.*

*N. A. = Não Aplicável

c) Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é expressa como sendo o desvio padrão relativo entre os resultados obtidos em estudos colaborativos entre laboratórios e o seu valor máximo aceitável é de 5%.

As análises foram realizadas com as concentrações alta, média e baixa, aplicadas em triplicata tanto no laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento como no laboratório de Controle de Qualidade da empresa Anidro do Brasil Extrações Ltda. As análises foram realizadas no dia 16/06/09 pelo operador Murilo Massao Assonuma. Os resultados são resumidos na tabela 18, 19 e 20.

Tabela 18. Resumo dos resultados obtidos no teste de Reprodutibilidade (Lab. Pesquisa e Desenvolvimento).

	Concentração Alta (mg/L)	Concentração Média (mg/L)	Concentração Baixa (mg/L)
Concentração (mg/L)	6013,32	5986,64	5817,28
	5814,15	5867,19	5731,82
	5849,79	5758,55	5752,35
Média conc.	5892,42	5870,79	5767,15
DP	106,21	114,09	44,61
DPR (%)	1,80	1,94	0,77

Tabela 19. Resumo dos resultados obtidos no teste de Reprodutibilidade (Lab. Controle de Qualidade).

	Concentração Alta (mg/L)	Concentração Média (mg/L)	Concentração Baixa (mg/L)
Concentração (mg/L)	5785,12	5966,14	5824,50
	5880,20	5714,87	5722,52
	5874,33	5842,28	5922,80
Média conc.	5846,55	5841,10	5823,27
DP	53,28	125,64	100,15
DPR (%)	0,91	2,15	1,72

Tabela 20. Resumo dos resultados obtidos no teste de Reprodutibilidade entre laboratórios.

	Lab. 1	Lab. 2	Média	DP	DPR(%)
Concentração Alta (mg/L)	6013,32	5785,12	5899,22	161,36	2,74
	5814,15	5880,20	5847,18	46,70	0,80
	5849,79	5874,33	5862,06	17,35	0,30
Concentração Média (mg/L)	5986,64	5966,14	5976,39	14,50	0,24
	5867,19	5714,87	5791,03	107,71	1,86
	5758,55	5842,28	5800,42	59,21	1,02

	5817,28	5824,50	5820,89	5,11	0,09
Concentração Baixa (mg/L)	5731,82	5722,52	5727,17	6,58	0,11
	5752,35	5922,80	5837,58	120,53	2,06
Média conc.	5843,45	5836,97	5840,21	N. A.*	N. A.*
DP	99,67	85,29	70,46	N. A.*	N. A.*
DPR (%)	1,71	1,46	1,21	N. A.*	N. A.*

*N. A. = Não Aplicável

A partir dos testes realizados, pode-se perceber que todos os valores para a reprodutibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade encontram-se dentro dos valores determinados pela RE899 e, portanto, pode-se comprovar a precisão do método analítico.

Robustez

No método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), pode-se avaliar, para o estudo de robustez, o uso de diferentes lotes ou fabricantes de coluna, o pH, e também a vazão da fase móvel utilizada no método.

São descritos abaixo cada uma das alterações realizadas e também a discussão dos resultados observados.

a) Coluna

Foram feitas análises com a coluna Luna C18 5 μ m (Phenomenex[®]) dimensão (250 x 4,6mm) avaliando-se diferentes lotes. Os resultados quali e quantitativos encontrados para cada uma dessas análises é apresentado na tabela 21.

Tabela 21. Resultados experimentais quali e quantitativos da análise de robustez em diferentes tipos de coluna.

Coluna	Tempo de Retenção da Alantoína (min)	Teor de Alantoína (mg/L)
Lote: 454958-03	6,251	0,62
Lote: 428320-20	6,215	0,59
Lote: 461969-16	6,367	0,61
DPR (%)	1,27	2,52

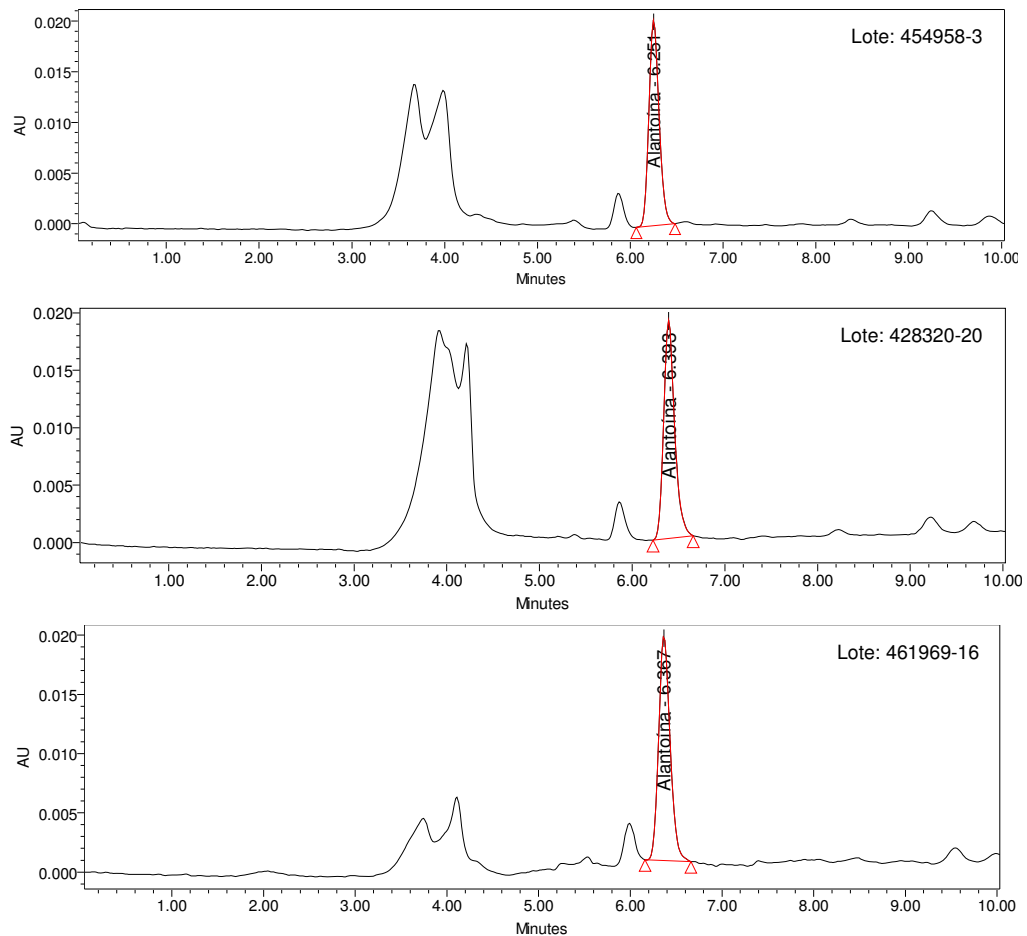


Figure 24. Cromatogramas referentes às análises de robustez utilizando-se diferentes lotes de coluna.

A partir desta análise, pode-se perceber que a determinação do marcador alantoina não variou de maneira significativa tanto quali (1,27% para o tempo de retenção) como quantitativamente (2,52% para o teor), levando-se em consideração valores máximos aceitáveis de 5% de variação para ambos os parâmetros.

b) pH da Fase Móvel

Foram feitas duas alterações no pH da fase móvel. A primeira linha da tabela 22 indica um pH abaixo do valor observado para a fase (A) = água, a segunda linha refere-se exatamente ao pH da fase (A) = água e a terceira linha refere-se a um pH acima do valor observado para a fase móvel (A) = água.

Tabela 22. Resultados experimentais quali e quantitativos da análise de robustez em diferentes pHs da Fase Móvel (A).

<i>pH da FM (A)</i>	<i>Tempo de Retenção</i>	<i>Teor de Alantoína (mg/L)</i>
5,20	6,338	0,64
5,83	6,215	0,59
6,20	6,393	0,61
DPR (%)	1,44	4,10

A partir dos testes de robustez com a variação do pH da fase móvel, pode-se perceber que não há diferenças tanto quali como quantitativas significativas relativas ao tempo de retenção e teor do padrão de Alantoína.

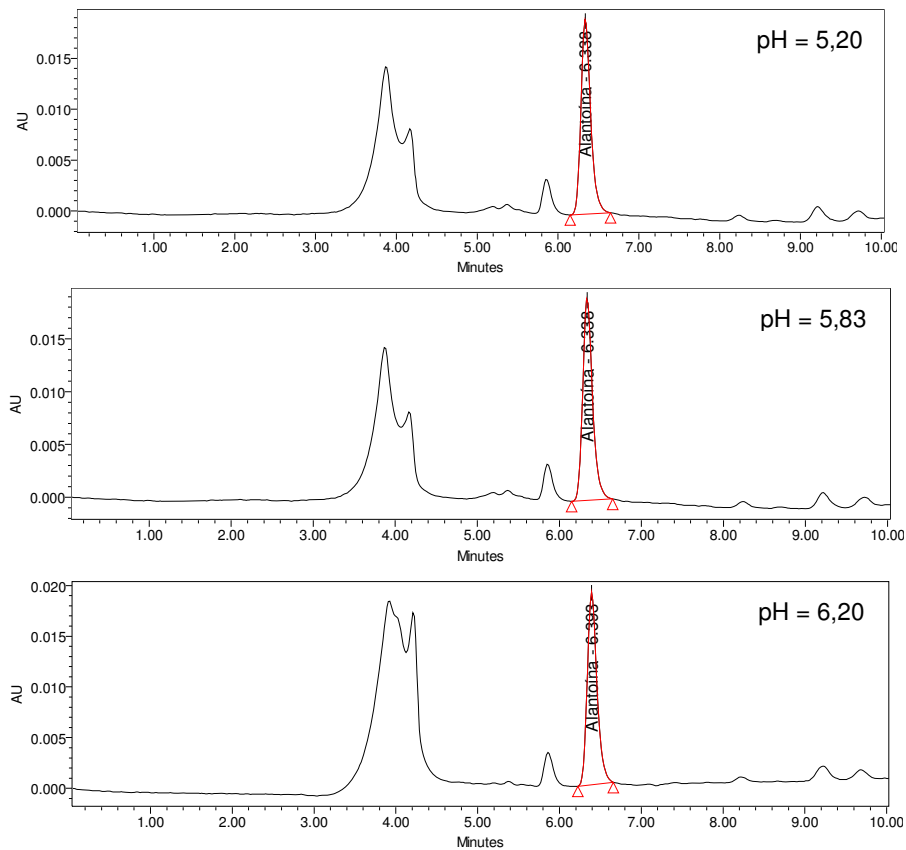


Figure 25. Cromatogramas referentes às análises de robustez utilizando-se diferentes valores de pH para a Fase Móvel.

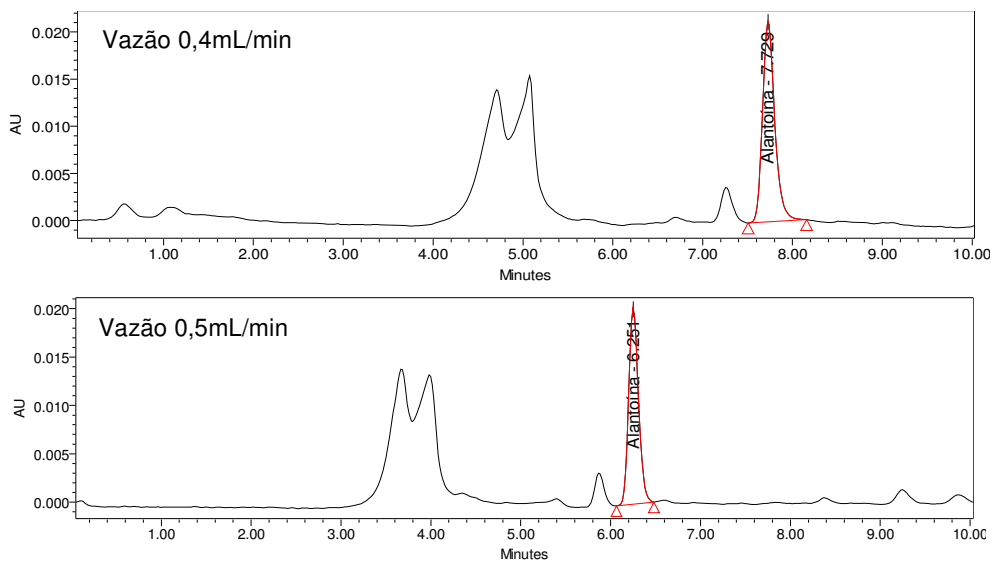
c) Vazão da Fase Móvel

Foram testadas três vazões diferentes na análise de robustez do método, sendo uma delas a vazão utilizada na metodologia em estudo. Os resultados quanti e qualitativos referentes a este teste são apresentados na tabela 23.

Tabela 23. Resultados de concentração em função da vazão no teste de robustez.

<i>Vazão da FM (mL/min)</i>	<i>Tempo de Retenção</i>	<i>Teor de Alantoína (mg/L)</i>
0,4	7,729	0,94
0,5	6,215	0,59
0,6	5,210	0,44
DPR (%)	19,86	39,07

A partir dos testes de robustez com variação na vazão da fase móvel pode-se perceber a partir dos valores de Desvio Padrão Relativo (DPR) que há diferenças tanto quali como quantitativas significativas. As diferenças quali e quantitativas verificadas condizem com o esperado, uma vez que a variação da vazão do método altera diretamente os tempos de retenção e, além disso, produz diferenças quanto ao alargamento das bandas cromatográficas, ocasionando, portanto mudança nos valores de área calculados.



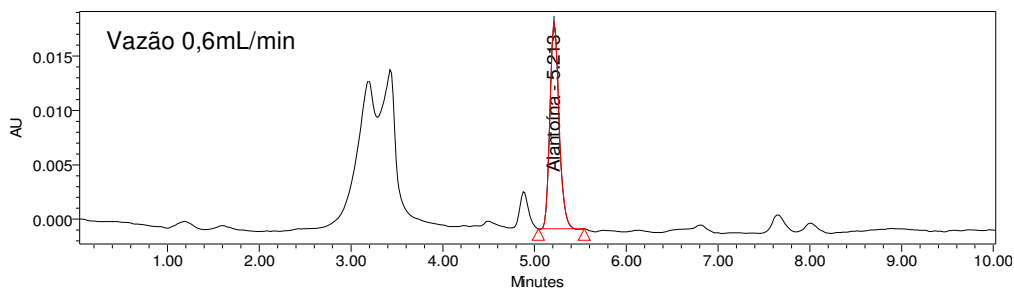


Figure 26. Cromatogramas referentes às análises de robustez modificando-se a vazão da Fase Móvel.

A partir de todos os ensaios de validação realizados, pode-se garantir que o método analítico para a determinação de alantoína tanto nos extratos como na matéria prima de Chá de Bugre encontra-se validado e, portanto, pode ser seguramente aplicado em laboratórios de controle.

5.5 – Avaliação da Atividade Antihemorrágica

Além da parte química, objetivou-se avaliar algumas atividades biológicas relacionadas aos extratos e partições obtidas com as folhas de *C. ecalyculata*.

Inicialmente foi avaliada a atividade antihemorrágica frente à ação do veneno de *B. jararaca*, que apresenta em sua composição enzimas do tipo matriz metaloproteinases Zn^{2+} dependentes, responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular, possuindo um efeito citotóxico em células endoteliais e também atuando em alguns componentes do sistema hemostático.

A tabela 24 resume os resultados experimentais obtidos com a leitura de área hemorrágica e porcentagem de inibição para todos os grupos testados.

A figura 27 representa graficamente os resultados observados na tabela 24 e a figura 28 mostra a parte interna dos cortes na região dorsal dos animais, utilizados para a obtenção dos resultados de área hemorrágica.

Tabela 24. Efeito antihemorrágico do extrato bruto e frações de *Cordia ecalyculata*.

Grupo	Número de Animais	Área Hemorrágica (mm ²)	% Inibição
Veneno	6	96,70 ± 8,20	-
Veneno + Extrato Bruto	6	90,87 ± 14,22	5,92
Veneno + Fração Aquosa	5	100,77 ± 12,77	0
Veneno + Fração Acetato	5	24,32 ± 0,89*	74,83

ANOVA $F_{(3,18)} = 10,73$ para Área Hemorrágica. Teste de Dunnet * $p < 0,01$

Neutralização do Efeito Hemorrágico de *B. jararaca*

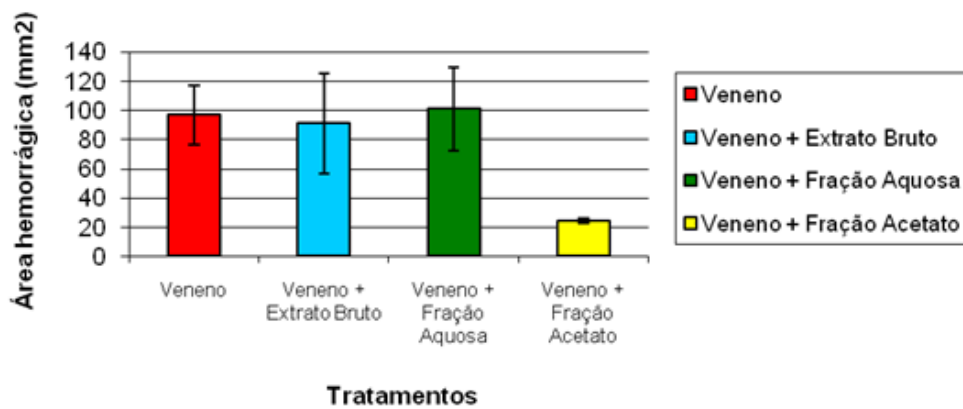


Figure 27. Representação gráfica dos resultados observados para a atividade antihemorrágica no extrato bruto e frações de *C. ecalyculata*.

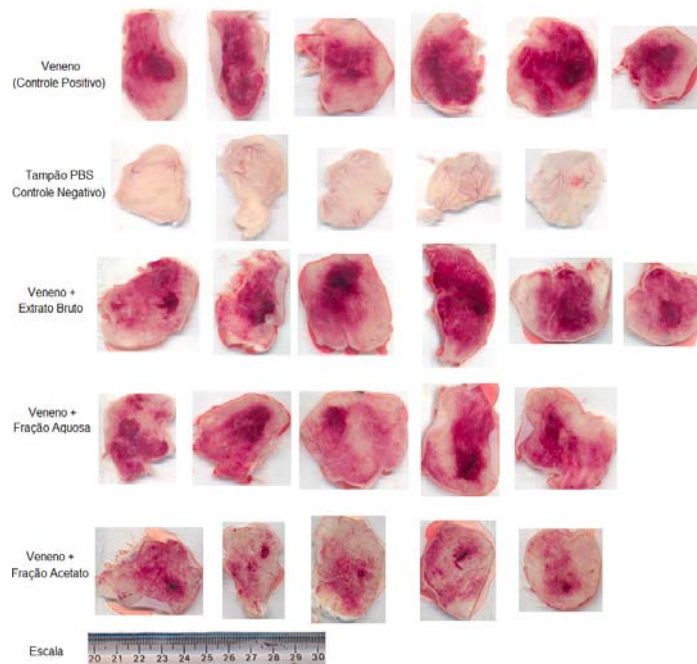


Figure 28. Cortes na região dorsal dos animais utilizados na avaliação da atividade antihemorrágica.

Os resultados experimentais indicam que o extrato bruto apresentou uma pequena porcentagem de inibição hemorrágica, em torno de 6%. Porém, ao separarmos as substâncias presentes no extrato bruto por graus de polaridade, percebemos que esta atividade se concentra na fração acetato de etila (74,8% de inibição), cujo perfil cromatográfico apresentado, apresenta substâncias de média polaridade com espectros de absorção característicos para substâncias fenólicas (com absorção na região de 254nm), como pode ser observado na figura 29.

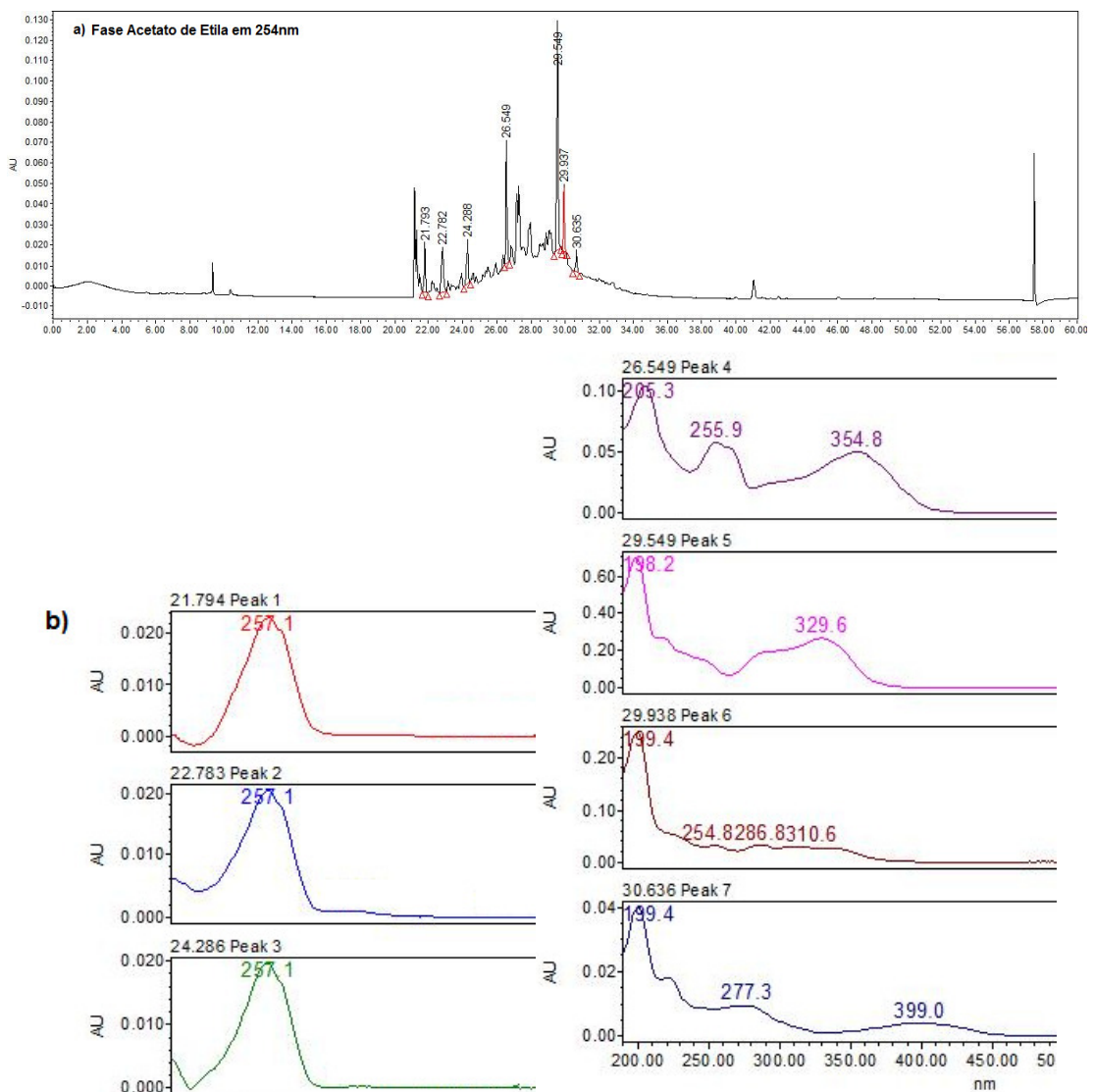


Figure 29. Cromatograma referente à fase acetato de etila em 254nm destacando o espectro ultravioleta de algumas substâncias.

A partir da figura 29, pode-se ter uma idéia do perfil de substâncias presentes nesta fase. Foram selecionados alguns picos cromatográficos cujos espectros de absorção são apresentados em (b) e onde podem ser observadas bandas espectrais em torno de 254nm. Em (c1) e (c2) pode-se ter uma idéia da distribuição de comprimentos de onda de absorção para todos os picos cromatográficos presentes na análise.

CASTRO *et al.* (1999) sugerem que extratos ricos em flavonóides podem apresentar atividade antihemorrágica interessante atuando sobre a enzima matriz metaloproteinases Zn^{2+} dependentes. Este fato pode estar relacionado à propriedade quelante dos compostos polifenólicos com os íons Zn^{2+} , agindo de forma competitiva com essas enzimas e assim diminuindo ou até mesmo inibindo a sua ação.

5.6 – Avaliação da Atividade Antifúngica

Foram realizados testes em quatro microorganismos patógenos humanos: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*. Para a avaliação da atividade antifúngica foram testados o extrato bruto, a fração hexânica, fração acetato de etila e fração aquosa. Os resultados expressos em termos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) são apresentados na tabela 25.

Tabela 25. Resultados experimentais referentes à avaliação da atividade antifúngica.

Amostra	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato Bruto	250	250	250	250
Fração Hexânica	250	250	250	125
Fração Ac. de Etila	250	250	250	125
Fração Aquosa	250	250	250	250
Anfotericina B	16	16	16	16

De acordo com os resultados apresentados, pode-se perceber que os valores de concentração inibitória mínima das amostras testadas são bastante altos, quando comparados ao padrão Anfotericina B, que foi de $16\mu\text{g/mL}$ para todos os microorganismos. Sendo assim, considera-se que tanto o extrato bruto como as frações testadas de *Cordia ecalyculata* não apresentam promissora atividade antifúngica.

5.7 – Avaliação da Atividade Antioxidante

Os resultados decorrentes da avaliação da atividade antioxidante são resumidos na tabela 26 a seguir.

Tabela 26. Atividade antioxidante de extrato e frações de partição de *Cordia ecalyculata*.

AMOSTRAS	DPPH		β-CAROTENO	
	IC ₅₀ (µg/mL)	Seqüestro a 10ppm	AcOEt : MeOH 6:4	
			Int.	Rf
Fração Hexânica	0,042	13,0%	no	-
Fração Acetato de Etila	0,016	26,7%	f	0,3-0,5
Fração Aquosa	0,019	19,7%	f	0,3-0,5
Extrato Bruto	> 0,070	nd	no	-
Rutina	0,0090	63,0%	-	0,2

nd = não determinado; no = não observado; f= fraco

De acordo com os resultados apresentados, pode-se perceber que a atividade antioxidante foi pouco expressiva tanto para o ensaio com DPPH como para o descoramento na presença de β-Caroteno. Percebe-se que há uma correlação entre os ensaios para a fase Acetato de Etila e Fase Aquosa, as quais apresentaram os melhores resultados para o ensaio. Pode-se ressaltar também que para a fase acetato de etila, que apresentou o melhor resultado, foram verificadas diversas substâncias com espectro ultravioleta na região de 254nm, que pode ser correlacionado com substâncias fenólicas e, assim, justificando a melhor atividade antioxidante observada, quando comparada às demais frações testadas.

5.8 – Avaliação da Atividade Citotóxica em Células Normais

A colaboração com o Laboratório de Citologia e Biologia Celular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, visou contribuir para os resultados de citotoxicidade (MTT) em queratinócito normal de pele humana (HaCaT), uma vez que uma das atividades biológicas descritas para o Chá de Bugre é a atividade cicatrizante.

No presente estudo, foi avaliada a atividade citotóxica do Extrato Bruto, Fase Hexânica, Fase Acetato de Etila e Fase Aquosa obtidas de *Cordia ecalyculata* Vell. em queratinócito normal de pele humana transformado pelo SV-40 (HaCaT), como pode ser observado na figura 30.

Foi possível perceber que os extratos apresentaram efeito dose-resposta em célula normal de epitélio humano imortalizada. Aparentemente, a melhor resposta citotóxica foi observada no tratamento com a Fase Hexânica, porém não houve grande diferença entre os outros extratos testados.

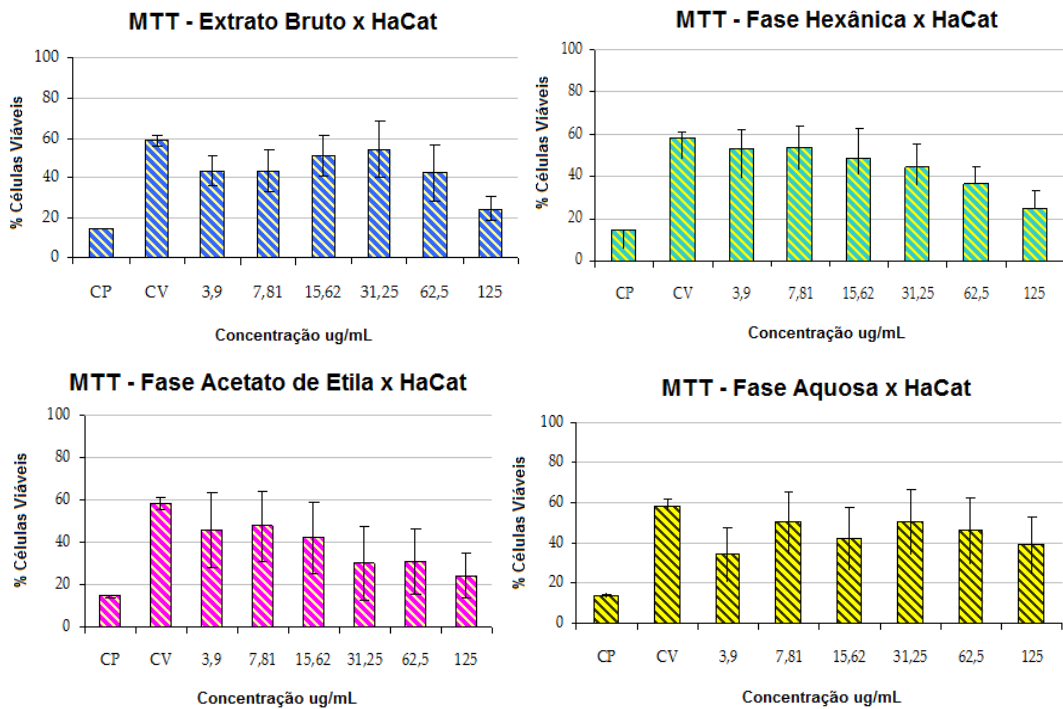


Figure 30. Ensaio de citotoxicidade (MTT). Porcentagem de células viáveis em queratinócitos normal de pele humana HaCaT, tratadas com Extrato Bruto, Fase Hexânica, Fase Acetato de Etila e Fase Aquosa nas concentrações de 3.9 a 125µg/mL por 24 horas. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão ($M \pm EP$). CP (controle positivo). CV (controle de veículo).

A verificação de que tanto o extrato bruto como as frações testadas não apresentaram citotoxicidade é um fato bastante importante, principalmente porque foram testadas células relacionadas ao processo de cicatrização (queratinócitos normais de pele humana). Uma vez que são descritas atividades cicatrizantes para a Alantoína, estes estudos são fundamentais para que sejam utilizados como base em futuras avaliações para atividade cicatrizante.

5.8 – Avaliação da Atividade Citotóxica em Células Tumorais

A atividade citotóxica de todas as amostras está apresentada na Tabela 27, com seus respectivos percentuais de inibição.

Tabela 27. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50µg/mL para extrato bruto e 25µg/mL para partições. Valores são médias ± DPM.

AMOSTRAS	MDA/MB-435		SF-295		HCT-8	
	Média	DPM	Média	DPM	Média	DPM
Fração Hexânica	19,2	1,4	17,9	2,2	37,9	3,4
Fração Ac. de Etila	29,3	1,1	8,6	1,3	48,9	1,9
Fração Aquosa	26,0	1,3	33,1	2,2	56,4	1,1
Extrato Bruto	29,3	4,3	21,4	1,3	52,7	2,6
Doxorrubicina	92,3	2,3	93,3	1,8	97,0	1,1

A partir dos resultados, pode-se perceber que as porcentagens de inibição para a linhagem HCT-8 (Cólón humano) foram as mais expressivas, chegando a valores de aproximadamente 56% de inibição para a fase aquosa. Apesar disso, pode-se dizer que o extrato e também as frações de *C. ecalyculata* não apresentaram resultados significativos para o ensaio de citotoxicidade em células tumorais.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que os objetivos propostos foram atingidos. Foi realizada uma extensa revisão bibliográfica focada nos aspectos botânicos, químicos e farmacológicos da espécie em questão. Com isso, buscou-se além de um conhecimento mais aprofundado da espécie, avaliar todos os estudos científicos já descritos e publicados para tal.

Neste estudo também foi desenvolvido um método cromatográfico via CLAE para a determinação quali e quantitativa do marcador químico Alantoína. Os valores obtidos para a matéria prima foram de 0,32% na média, 0,75% para o extrato bruto, 0% para a fase hexânica, 0,15% para a fase acetato de etila e 1,54% para a fase aquosa.

O método analítico para a determinação de alantoína também foi validado segundo os parâmetros preconizados pela RE899 da Anvisa, tendo seus resultados condizentes com as especificações e, por isso, pode ser seguramente aplicado nos laboratórios de controle de qualidade em suas análises químicas. Além de seguro, o método também é bastante simples, rápido e facilmente aplicável em um laboratório que demanda diversas análises durante um mesmo dia.

Em relação aos estudos farmacológicos, foram avaliadas as atividades antihemorrágica, antifúngica, antioxidante e citotóxica para células normais e tumorais.

A atividade antihemorrágica frente ao veneno de *B. jararaca*, apresentou um valor de 74,83% de inibição hemorrágica para a fase acetato de etila. Esta atividade está relacionada à presença de compostos com características fenólicas, já que estes são capazes de atuar competitivamente às metaloproteinases, que necessitam de metais (no caso Zn^{2+}) para que possam exibir suas funções. Além disso, os compostos fenólicos puderam ser evidenciados na fase acetato de etila através de seus espectros de absorção na região do ultravioleta, apresentando bandas na região de 254nm.

A atividade antifúngica frente aos microorganismos patogênicos humanos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* também foi

avaliada, porém os resultados de CIM para as amostras foram bastante altos frente ao padrão Anfotericina B utilizado, o que indica uma atividade antifúngica muito pouco pronunciada.

A atividade antioxidante não apresentou resultados significativos tanto para o ensaio com o DPPH como para o descoramento com β -Caroteno em todas as amostras testadas. Apesar disso, pode-se verificar que, entre as frações, a fase acetato de etila foi aquela que apresentou melhores resultados, os quais, mais uma vez, podem estar relacionados aos compostos fenólicos evidenciados nesta fração.

Foi avaliada também a atividade citotóxica em queratinócitos normais de pele humana. Os resultados indicaram que mesmo em concentrações da ordem de 3,9 μ g/mL há em média 40 – 50% de viabilidade celular. Aparentemente, a maior resposta citotóxica foi observada no tratamento com a Fase Hexânica, porém não houve diferença significativa entre os outros extratos testados. A não observação de citotoxicidade neste tipo de células é um resultado importante para que estudos futuros relacionados à atividade cicatrizante sejam realizados. Várias referências citam esta atividade para a alantoína, porém, são muito poucos os estudos que relatam as concentrações iniciais a serem utilizadas para sua avaliação, sem causar toxicidade às células.

Em relação à citotoxicidade para células tumorais, a Fase Aquosa apresentou os melhores resultados, com uma % de inibição de aproximadamente 56%. Apesar disso, os resultados não conferem atividade citotóxica significativa tanto para o extrato como para as frações avaliadas de *C. ecalyculata*.

Outra informação importante, que pode servir de base para estudos farmacológicos futuros com a espécie, é o fato de não ser observada atividade antiúlcera, como descrito na revisão bibliográfica realizada. A não observação deste tipo de atividade pode ser utilizada como indicativo para a observação de atividade antiinflamatória para a espécie.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE, n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOT, B.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, W.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, v. 48, p. 589-601, 1988.

ARREBOLA, M. R. B.; PETERLIN, M. F.; BASTOS, D. H. M.; RODRIGUES, R. F. de O.; CARVALHO, P. de O. Estudo dos componentes lipídicos das sementes de três espécies do gênero *Cordia L.* (Boraginaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 14, n. 1, p. 57-65, 2004.

BERINGER, P. (Ed.) *Remington: the science and practice of pharmacy*. 19th ed. Easton: Mack, 1995. p. 880.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, n. 4, p. 14-19, 1996.

BILLABERT, A.; WILLEMOT, J.; PARRY, G. Dosage de l'allantoïne dans des produits pharmaceutiques. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, v. 34, n. 1, p. 65-66, 1976.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, A. S. *Manual de ensaios toxicológicos in vivo*. Campinas: Ed. UNICAMP, 1994. p. 15-22.

BRUNEL, A.; CAPELLE, G. Sur l'importance biologique des uréides glyoxyliques chez les êtres vivants. I. L'allantoïne et l'acide allantoïque chez les végétaux. *Bulletin Société Chimique et Biologie*, v. 29, p. 427-444, 1947.

BURSILL, C. A.; ABBEY, M.; ROACH, P. D. A green tea extract lowers plasma cholesterol by inhibiting cholesterol synthesis and upregulating the LDL receptor in the cholesterol- fed rabbit. *Atherosclerosis*, v. 193, n. 1, p. 86-93, 2007.

BUDAVARI, S. (Ed.) *The Merck index: an encyclopedia of chemical, drugs and biological*. 12th ed. Whitehouse Station: Merck, 1996.

CARDOZO, S.; DE BONA, L. R.; BARBIZA, L. T.; ANDREOLLA, H. F.; BOECK, R.; VIEIRA, V.; FRANTZ, M. A.; MORISSO, F. D. P.; COITINHO, A. S.; TAVARES, R. G. Atividade hipolipidêmica do extrato de *Cordia salicifolia* em camundongos submetidos a dieta hiperlipidêmica. *Revista da AMRIGS*, v. 52, n. 3, p. 182-186, 2008.

CASTRO, O.; GUTIÉRREZ, J. M.; BARRIOS, M.; CASTRO, I.; ROMERO, M.; UMANA, E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: *Viperidae*) por extractos de plantas tropicales. *Revista de Biología Tropical*, v. 47, p. 605-616, 1999.

CARVALHO, P. M. de; RODRIGUES, R. F. O.; SAWAYA, A. C. H. F.; MARQUES, M. O. M.; SHIMIZU, M. T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 95, p. 297-301, 2004.

CHEN, X. B. Determination of allantoin in biological, cosmetic and pharmaceutical samples. *Journal of AOAC International*, v. 79, n. 3, p. 625-635, 1996.

CONSTANTINESCU, E.; CRISTEA, E.; ALBULESCU, D.; TODOR, D. Allantoin, ein pflanzeninhaltsstoff MIT diurestischer wirkung. *Pharmazie*, v. 22, n. 10, p. 601-602, 1967.

CORSINO, J.; SILVA, D. H. S.; ZANONI, M. V. B.; BOLZANI, V. D. S.; FRANCA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 913-916, 2003.

CRUZ, G. L. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. 5. ed. Rio de Janeiro: Bertrand, 1995. p. 599.

DAULATABAD, C. M. J. D.; DESAI, V. A.; HOSAMANI, K. M. Unusual fatty acids of *Cordia rothii* seed oil. *Journal of Science Food Agriculture*, v. 58, p. 285-286, 1992.

DIAS, T. G. *Estudo farmacognóstico de porangaba (Cordia ecalyculata Vell. Boraginaceae) e identificação de adulterações*. 2004. 147 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. rev. e atual. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2003. Cap. 6, p.87-99.

EPIFANO, F.; MENGHINI, L.; PAGIOTTI, R.; ANGELINI, P.; GENOVESE, S.; CURINI, M. *In vitro* inhibitory activity of boropinic acid against *Helicobacter pylori*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, p. 5523-5525, 2006.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2001. p. 199-222.

GARCIA, E. S. *Bases de dados tropical: biodiversidade, perspectivas e oportunidades tecnológicas – fitoterápicos*. Disponível em: <www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10/eloi.html>. Acesso em: 14 jun. 2009.

GUIL-GUERRERO, J. L.; MAROTO, F. F. G.; GIMÉNEZ, A. G. Fatty acids profiles from forty-nine plant species that are potential new sources of gamma-linolenic acid. *The Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 78, n. 7, p. 677-684, 2001.

HAGHI, G.; ARSHI, R.; SAFAEI, A. Improved high-performance liquid chromatography (HPLC) method for qualitative and quantitative analysis of Allantoin in *Zea mays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 1205-1209, 2008.

HAMROUNI, I.; TOUATI, S.; MARZOUK, B. Evolution des lipides au cours de la formation et de la maturation de la graine de bourrache (*Borago officinalis*). *La Rivista Italiana delle Sostanze Grass*, v. 79, p. 113-118, 2002.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; MORITA, N.; NIWAYAMA, S. Antiviral activity of an extract of *Cordia salicifolia* on herpes simplex virus type 1. *Planta Medica*, v. 56, p. 439-443, 1990.

KLEIMAN, R.; EARLE, F. R.; WOLFF, I. A. Search for new industrial oils. XI. oils of *Boraginaceae*. *The Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 41, p. 459-460, 1964.

KONDO, H.; KONDO, S.; IKESAWA, H.; MURATA, R. Studies on the quantitative method for determination of haemorrhagic activity of *Habu* snake venom. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*, v. 13, p. 43-51, 1960.

LORENZI, H. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. p. 98.

MAYWORM, M. A. S.; NASCIMENTO, A. S.; SALATINO, A. Seeds of species from the "caatinga": proteins, oils and fatty acid contents. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 21, n. 3, p. 299-303, 1998.

MEADOWS, J.; SMITH, R. C. Uric acid protection of nucleobases from ozone-induced degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 246, n. 2, p. 838-845, 1986.

MECCA, S. B. New allantoin derivatives for cosmetic and dermatological application. *American Perfumer & Cosmetics*, v. 86, n. 5, p. 39-42, 1971.

MENGHINI, L.; EPIFANO, F.; LEPORINI, L.; PAGIOTTI, R.; TIRILLINI, B. Phytochemical investigation on leaf extract of *Cordia salicifolia* Cham. *Journal of Medicinal Food*, v. 11, n. 1, p. 193-194, 2008.

MILLER, R. W.; EARLE, F. R.; WOLFF, I. A. Search for new Industrial oils. XV. oils of *Boraginaceae*. *Lipids*, v. 3, n. 1, p. 43-45, 1967.

MOFFAT, A. C.; JACKSON, J. V.; MOSS, M. S.; WIDDOP, B.; GREENFIELD, E. S.; CLARKE, E. G. S. (Ed.) *Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post mortem materials*. 2nd ed. London: Pharmaceutical Press, 1978. p. 1223.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.
Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters: approved guideline. Approved guideline M23-A. Villanova, 1994.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast.* Approved standard M27. Villanova, 1997.
- NISHIJIMA, C. M.; RODRIGUES, C. M.; SILVA, M. A.; LOPES-FERREIRA, M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Anti-hemorrhagic activity of four brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. *Molecules*, v. 14, n. 3. p. 1072-1080, 2009.
- NUNES, D. S. Chemical approaches to the study of ethnomedicines. In: BALICK, M. J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S. A. *Medicinal resources of the tropical forest: biodiversity and its importance to human health.* Hardcover: Columbia University Press, 1996. Cap. 4, p. 41-47.
- OLIVEIRA, T. T.; GOMES, S. M.; NAGEM, T. J.; COSTA, N. M. B.; SECOM, P. R. Efeito de diferentes doses de flavonóides em ratos hiperlipidêmicos. *Revista de Nutrição de Campinas*, v. 15, n. 1, p. 45-51, 2002.
- PRATT, D. E.; MILLER, E. E. A Flavonoid antioxidant in *Spanish peanuts* (*Arachia-Hipogoea*). *Journal of American Oil Chemistry Society*, v. 61, n. 6, p. 1064-1067, 1984.
- RAMSEWAK, R. S.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M.; DEWITT, D. L.; NITISS, J. L. Biologically active carbazole alkaloids from *Murraya koenigii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 444-447, 1999.
- ROSENDO, A. B.; DAL-PIZZOL, F.; FIEGENBAUM, M.; ALMEIDA, S. Farmacogenética e efeito antiinflamatório dos inibidores da HMG-CoA redutase. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 51, n. 4, p. 520-525, 2007.
- SAITO, M. L. Farmacognosia de *Cordia ecalyculata* Vell. (Boraginaceae). 1984. 154 f. Dissertação (Mestrato em Controle de Medicamentos e Matérias Primas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984.

SAITO, M. L. Morfodiagnose e identificação cromatográfica em camada delgada de chá de bugre – *Cordia ecalyculata* Vell. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 67, p. 1-16, 1986.

SANTOS, R. P.; NUNES, E. P.; NASCIMENTO, R. F.; SANTIAGO, G. M. P.; MENEZES, G. H. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O.; DEUSDENIA, L. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the ortheast of Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, p. 1027-1030, 2006.

SCHAFFER, C. F.; GREENBAUM, F. R. Metabolism of allantoin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicin*, v. 25, p. 1206-1215, 1940.

SENANAYAKE, N. S. P. J.; SHAHIDI, F. Lipid components of borage (*Borago officinalis* L.) seeds and their changes during germination. *The Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 77, n. 1, p. 55-61, 2000.

SHEKER, K. M.; BLACK, H. J.; LACH, J. L. Silver allantoinate for the topical treatment of burns. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v. 29, n. 10, p. 852-855, 1972.

SILVA, R. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; ALBINO, L. F. T.; ALMEIDA, M. R.; MORAES, G. H. K.; PINTO, J. G. Efeito hipolipidêmico dos flavonóides naringina e rutina. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 51, n. 3, p. 258-264, 2001.

SILVA, A. G. Plantas na terapêutica moderna: tendências, riscos e estratégias de conservação. *Natureza on Line*, v. 2, n. 2, p. 34-36, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2001. p. 199-222.

SIQUEIRA, V. L. D.; CORTEZ, D. A. G.; OLIVEIRA, C. E.; NAKAMURA, C. V.; BAZOTTE, R. B. Pharmacological studies of *Cordia salicifolia* Cham in normal and diabetic rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, n. 2, p. 215-218, 2006.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric

cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *Journal of Natural Cancer Institute*, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

STEIN, F. L. P.; SCHMIDT, B.; FURLONG, E. B.; SOUZA-SOARES, L. A.; SOARES, M. C.; VAZ, M. R.; MUCCILLO BAISCH, A. L. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biological Research For Nursing*, v. 7, n. 2, p. 146-56, 2005.

SUZUKI, T.; WALER, G. R. Biodegradation of caffeine: formation of Theophylline and Theobromine from Caffeine in mature *Coffea arabica* fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 35, p. 66-70, 1984.

SZNITOWSKA, M.; JANICKI, S. The effect of vehicle on allantoin penetration into human skin from an ointment for improving scar elasticity. *Pharmazie*, v. 43, n. 3, p. 218, 1988.

VELASCO, L.; GOFFMAN, F. D. Chemotaxonomic significance of fatty acids and tocopherols in Boraginaceae. *Phytochemistry*, v. 52, p. 423-426, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Quality control methods for medicinal plant materials*. WHO/PHARM/92559. Disponível em:
<http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS05_131Rev1_QCMethods_Med_PlantMaterialsUpdateSept05.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2009.