

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INGRID ALBRECHT

IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM EXTRATO
AQUOSO DE *Phyllanthus niruri* L.COM AÇÃO NO PROCESSO DE FORMAÇÃO DE
CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO

ARARAQUARA-SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INGRID ALBRECHT

IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM EXTRATO
AQUOSO DE *Phyllanthus niruri* L.COM AÇÃO NO PROCESSO DE FORMAÇÃO DE
CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ARARAQUARA-SP

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

A341i Albrecht, Ingrid
Identificação de metabólitos secundários em extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* L. com
ação no processo de formação de cristais de oxalato de cálcio / Ingrid Albrecht. –
Araraquara, 2014
147 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêutica

Orientador: André Gonzaga dos Santos

1. Fitoterápicos. 2. *Phyllanthus niruri*. 3. Sazonalidade. 4. Urolitíase I. Santos, André
Gonzaga, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus;
A minha família, Arlindo, Edna e Alexandre;
Ao meu namorado, Alexandre.

AGRADECIMENTOS

Nesta página gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realizá-lo.

Em especial a Deus pela força e sabedoria concedida.

Aos meus pais, Arlindo e Edna, pelo amor e pelos esforços em prol da minha formação.

A Alexandre Pagani Aulino da Silva, meu namorado, por me incentivar e apoiar.

A Ricardo Luis Araújo Dias, Diretor Técnico-científico e a Deise Tanaka Bassetto, ex-Supervisora de Pesquisa e Desenvolvimento da Anidro Extrações do Brasil Ltda, Grupo Centroflora – Botucatu/SP, os quais me possibilitaram cursar o Mestrado em Ciências Farmacêuticas realizando o projeto de pesquisa na empresa e me dispensado do horário de trabalho para cursar os créditos.

Ao Departamento de Botânica da Anidro, Centroflora – Botucatu/SP, pelas coletas de amostras e dados experimentais compartilhados.

A Luciana Andreia de Souza Cunha e Erica Keila Bigeschi, minhas colegas de trabalho na empresa Centroflora, por me apoiarem durante o curso.

A Natália Coelho da Silva, Farmacêutica, ex-estagiária de iniciação científica do curso de Farmácia da UNESP–Araraquara, por me ajudar na realização dos experimentos.

A Ayran Medina Yabunaka, aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFGD, aos professores Dr. Márcio Eduardo de Barros (Faculdade de Ciências da Saúde, UFGD-Dourados) e Dra. Mirian Aparecida Boim (Departamento de Medicina, USP–São Paulo) pela realização dos ensaios *in vitro*.

Aos professores Dr. Alberto José Cavalheiro (Instituto de Química, UNESP-Araraquara) e Dra Natália Valadares de Moraes (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Araraquara) pelas importantes considerações realizadas no exame de qualificação. Aos professores Dr. João Carlos Palazzo de Mello (Departamento de Farmácia, UEM-Maringá) e Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Araraquara) pelas considerações realizadas na defesa deste trabalho.

Ao prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, meu orientador, pela paciência e compreensão durante a realização deste.

EPÍGRAFE

“Porque o mundo pertence a quem se atreve.”

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE GRÁFICOS	XV
LISTA DE FLUXOGRAMAS	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XVII
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XX
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 <i>Phyllanthus niruri</i> L.	3
2.1.1 Aspectos Químicos Sobre <i>Phyllanthus niruri</i> L.	4
2.1.2 Aspectos Farmacológicos Sobre <i>Phyllanthus niruri</i> L.	8
2.2 Urolitíase	11
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo Geral	14
3.2 Objetivos Específicos	14
4 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	15
5 MÉTODOS	17
5.1 Droga Vegetal (DV)	17
5.2 Preparação dos Extratos	18
5.2.1 Extrato Bruto Seco (EBS)	18
5.2.2 Extratos Sazonalidade (SA, SE e SHA)	18
5.2.3 Extratos Diferentes Órgãos	19
5.3 Controle de Qualidade da Droga Vegetal e Extrato Bruto Seco	20
5.3.1 Determinação de Granulometria da Droga Vegetal Utilizada na Obtenção do Extrato Bruto Seco	20
5.3.2 Determinação de Água em Drogas Vegetais	20
5.3.3 Determinação da Perda por Dessecação no Extrato Bruto Seco - Método Gravimétrico	20
5.3.4 Determinação do Teor de Taninos Totais na Droga Vegetal e no Extrato Bruto Seco	21
5.4. Fracionamento do Extrato Bruto Seco	22

5.4.1 Partição Líquido-Líquido.....	22
5.4.2 Extração em Fase Sólida	23
5.5. Métodos Cromatográficos	24
5.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para Identificação de Taninos, Flavonoides, Lignanas e Terpenos	24
5.5.1.1 Extratos Sazonalidade.....	24
5.5.1.2 Extratos Diferentes Órgãos	24
5.5.1.3 Sistemas Eluentes e Reveladores Cromatográficos	24
5.5.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (DAD).....	25
5.5.2.1 Transferência do Método Analítico para CLUE-DAD	25
5.5.2.2 Preparo de Soluções Padrão	26
5.5.2.3 Preparo de Soluções Amostra.....	26
5.5.2.4 Desenvolvimento do Preparo de Amostra Droga Vegetal	28
5.6 Determinação de Filantina na Droga Vegetal e Extrato Bruto Seco	28
5.7 Determinação do Teor de Flavonoides Totais no Extrato Bruto Seco e Frações Obtidas por Partição Líquido-Líquido	29
5.8 Avaliação da Ação do Extrato Bruto Seco e das Frações Obtidas por Partição Líquido-Líquido de <i>P. niruri</i> Sobre a Cristalização de Oxalato de Cálcio <i>in vitro</i>	30
5.9 Análise Estatística.....	30
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
6.1. Controle de Qualidade da Droga Vegetal e Extrato Aquoso	32
6.1.1 Determinação de Granulometria da Droga Vegetal Utilizada na Obtenção do Extrato Bruto Seco	32
6.1.2 Determinação de Água em Drogas Vegetais – Método Gravimétrico	33
6.1.3 Determinação da Perda por Dessecação no Extrato Bruto Seco - Método Gravimétrico	34
6.1.4 Determinação do Teor de Taninos Totais na Droga Vegetal e no Extrato Bruto Seco	34
6.2. Desenvolvimento de Método Analítico.....	35
6.2.1 Transferência de Método Analítico de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.....	35

6.2.2 Curvas Analíticas (Padrão Externo) : Ácido Gálico, Corilagina e Ácido Elágico	47
6.3. Determinação de Teor de Ácido Gálico, Corilagina e Ácido Elágico em Droga Vegetal <i>P. niruri</i>.....	49
6.3.1 Desenvolvimento do Preparo de Amostra Droga Vegetal	49
6.4 Extratos e Análises Cromatográficas.....	51
6.4.1 Extrato Bruto Seco	51
6.4.2 Extratos Sazonalidade.....	54
6.4.3 Extratos Diferentes Órgãos	75
6.5 Fracionamentos e Análises Cromatográficas.....	87
6.5.1 Partição Líquido – Líquido.....	87
6.5.2 Extração em Fase Sólida	93
6.6 Determinação de Filantina na Droga Vegetal e Extrato Bruto Seco	98
6.7 Determinação do Teor de Flavonoides Totais no Extrato Bruto Seco e nas Frações Avaliadas <i>in vitro</i>.....	101
6.8 Avaliação da Ação do Extrato Bruto Seco e das Frações de <i>P. niruri</i> Sobre a Cristalização de Oxalato de Cálcio <i>in vitro</i>	103
7 CONCLUSÃO	108
8 REFERÊNCIAS.....	110
9 ANEXO.....	124
9.1 Cromatogramas.....	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química do ácido gálico.	7
Figura 2 Estrutura química do ácido elágico.	7
Figura 3 Estrutura química da corilagina.	7
Figura 4 Software Acquity® UPLC <i>columns calculator</i> - dados de entrada.	36
Figura 5 Software Acquity® UPLC <i>columns calculator</i> - dados de saída.	36
Figura 6 Cromatogramas Corilagina (A) e EBS (B) – condição T11.HSST3.	42
Figura 7 Cromatograma e espectro no UV: corilagina.	44
Figura 8 Cromatograma e espectro no UV: ácido gálico.	45
Figura 9 Cromatograma e espectro no UV: ácido elágico.	45
Figura 10 Cromatograma e espectro no UV: quercetina.	45
Figura 11 Cromatograma e espectro no UV: quercitrina.	46
Figura 12 Cromatograma e espectro no UV: rutina.	46
Figura 13 Cromatograma: extrato bruto seco (EBS).	46
Figura 14 Espectros no UV de picos do cromatograma do extrato bruto seco (EBS); t_R estão indicados na parte superior direita.	47
Figura 15 Curva analítica padrão externo: ácido gálico.	48
Figura 16 Curva analítica padrão externo: corilagina.	48
Figura 17 Curva analítica padrão externo: ácido elágico.	49
Figura 18 Cromatograma: droga vegetal <i>P. niruri</i> (relação droga vegetal/ solvente de 6 mg/mL).	50
Figura 19 Cromatograma extrato bruto seco <i>P. niruri</i>	53
Figura 20 Cromatoplaca referente aos extratos SA, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para direita. Revelador cloreto férrico 3%.	57
Figura 21 Cromatoplaca referente aos extratos SE, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para direita. Revelador cloreto férrico 3%.	57
Figura 22 Cromatoplaca referente aos extratos SHA, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para direita. Revelador cloreto férrico 3%.	58
Figura 23 Cromatoplaca referente aos extratos SA, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, da esquerda para direita. Revelador anisaldeído sulfúrico.	58
Figura 24 Cromatoplaca referente aos extratos SE, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, da esquerda para direita. Revelador anisaldeído sulfúrico.	59

Figura 25 Cromatoplaca referente aos extratos SHA, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, da esquerda para direita. Revelador anisaldeído sulfúrico.	59
Figura 26 Cromatoplaca referente aos extratos SA, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para direita. Fase móvel: acetato de etila: acetona: ácido acético: água 6:2:1:1 v/v. Revelador NP/PEG sob luz UV 365 nm.	60
Figura 27 Cromatoplaca referente aos extratos SE, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para direita. Fase móvel: acetato de etila: acetona: ácido acético: água 6:2:1:1 v/v. Revelador NP/PEG sob luz UV 365 nm.	60
Figura 28 Cromatoplaca referente aos extratos SHA, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para direita. Fase móvel: acetato de etila: acetona: ácido acético: água 6:2:1:1 v/v. Revelador NP/PEG sob luz UV 365 nm.	60
Figura 29 Cromatoplaca referente aos extratos SE, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, da esquerda para direita. Revelador anisaldeído sulfúrico.	61
Figura 30 Cromatoplaca referente aos extratos SHA, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, da esquerda para direita. Revelador anisaldeído sulfúrico.	62
Figura 31 Cromatogramas SA de janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012 sobrepostos, de baixo para cima (t_R ácido gálico = 2,1 min; t_R corilagina = 3,3 min; t_R ácido elágico = 4,7).....	63
Figura 32 Cromatogramas SE de janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, sobrepostos, de baixo para cima (t_R ácido gálico = 2,1 min; t_R corilagina = 3,3 min; t_R ácido elágico = 4,7).....	65
Figura 33 Cromatogramas SHA de janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, sobrepostos, de baixo para cima (t_R ácido gálico = 2,1 min; t_R corilagina = 3,3 min; t_R ácido elágico = 4,7).....	67
Figura 34 Cromatoplaca referente aos extratos diferentes órgãos: 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, ácido gálico, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, da esquerda para direita. Revelação com cloreto férrico 3%.....	79
Figura 35 Cromatoplaca referente aos extratos diferentes órgãos: 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA, da esquerda para direita. Revelação com anisaldeído sulfúrico.	80
Figura 36 Cromatoplaca referente aos extratos de diferentes órgãos: 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, da esquerda para direita. Fase móvel: tolueno: acetato de etila: metanol: ácido acético 5,3: 4,0: 0,5: 0,2 v/v. Revelador NP/PEG sob luz UV 365 nm.	81

Figura 37 Cromatoplaça referente aos extratos diferentes órgãos: 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA, da esquerda para direita. Revelação com anisaldeído sulfúrico.	82
Figura 38 Cromatogramas dos extratos aquosos (Aq) dos diferentes órgãos: 1CAq, 2CAq, 2FFAq, 1FAq, 2FAq e 1RAq sobrepostos, de baixo para cima (t_R ácido gálico= 2,1 min; t_R corilagina = 3,4 min; t_R ácido elágico = 4,7).	83
Figura 39 Cromatogramas dos extratos etanólicos (Et) dos diferentes órgãos: 1CEt, 2CEt, 2FFEt, 1FEt e 2FEt sobrepostos, de baixo para cima (t_R ácido gálico= 2,1 min; t_R corilagina = 3,4 min; t_R ácido elágico = 4,7).	85
Figura 40 Cromatoplaça referente às frações FE, FHAE, FA e FNB da partição líquido-líquido, ácido gálico, quercetina e rutina da esquerda para direita. Revelador cloreto férrico 3%.	89
Figura 41 Cromatoplaça referente às frações FE, FHAE, FA e FNB da partição líquido-líquido. Revelador anisaldeído sulfúrico.	89
Figura 42 Cromatoplaça referente às frações FE, FHAE, FA e FNB da partição líquido-líquido, ácido gálico, quercetina e rutina da esquerda para direita. Fase móvel: acetato de etila: acetona: ácido acético: água 6:2:1:1 v/v. Revelador NP/PEG sob luz UV 365 nm.	90
Figura 43 Cromatoplaça referente às frações FE, FHAE, FA e FNB da partição líquido-líquido. Revelador anisaldeído sulfúrico.	91
Figura 44 Cromatogramas das frações obtidas por partição líquido-líquido FE, FHAE, FA e FNB sobrepostos, de baixo para cima (t_R ácido gálico= 2,0 min; t_R corilagina = 3,3 min; t_R ácido elágico = 4,7).	91
Figura 45 Cromatoplaça referente às frações EFS1 a EFS8, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para direita. Revelador cloreto férrico 3%.	94
Figura 46 Cromatoplaça referente às frações EFS1 a EFS8, da esquerda para direita. Revelador anisaldeído sulfúrico.	95
Figura 47 Cromatoplaça referente às frações EFS1 a EFS8, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para direita. Fase móvel: acetato de etila: acetona: ácido acético: água 6:2:1:1 v/v. Revelador NP/PEG sob luz UV 365 nm.	95
Figura 48 Cromatoplaça referente às frações EFS1 a EFS8, da esquerda para a direita. Revelador anisaldeído sulfúrico.	96
Figura 49 Cromatogramas das frações EFS1 a EFS8, sobrepostos, de baixo para cima (t_R ácido gálico= 2,2 min; t_R corilagina = 3,3 min; t_R ácido elágico = 4,7).	97
Figura 50 Cromatograma e espectro de absorção no UV: filantina a 0,050 mg/L.	99
Figura 51 Curva analítica padrão externo: filantina.	99

Figura 52 Curva analítica de quercetina para determinação do teor de flavonoides totais utilizando o reagente complexante cloreto de alumínio.....	102
Figura 53 Cromatogramas corilagina (A) e EBS (B) dos testes T1 a T6 com coluna Fenil BEH.....	125
Figura 54 Cromatogramas corilagina (A) e EBS (B) dos testes T1 a T10, T12 a T14 com coluna HSS T3.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Metabólitos Secundários de <i>Phyllanthus niruri</i> L.	6
Tabela 2 Determinação de água: perfil sazonal de <i>P. niruri</i>	33
Tabela 3 Determinação de Polifenóis Totais e Taninos Totais em <i>P. niruri</i>	34
Tabela 4 Condições cromatográficas segundo Colombo et al. (2009).	37
Tabela 5 Condições cromatográficas sugeridas pelo software Acquity® UPLC columns calculator desconsiderando o tamanho da partícula.	37
Tabela 6 Condições cromatográficas sugerida pelo software Acquity® UPLC columns calculator considerando o tamanho da partícula.	38
Tabela 7 Coluna BEH - condições cromatográficas testes 1 a 6.....	39
Tabela 8 Coluna BEH - Parâmetros cromatográficos avaliados.....	39
Tabela 9 Coluna HSS T3 - condições cromatográficas testes T1 a T14.....	40
Tabela 10 Coluna HSS T3 - Parâmetros cromatográficos avaliados em relação à corilagina.	41
Tabela 11 Método analítico transferido de CLAE-DAD para CLUE-DAD.	43
Tabela 12 Identificação de metabólitos secundários.....	44
Tabela 13 - Testes extrações droga vegetal.	50
Tabela 14 Estado fenológico versus meses do ano.	71
Tabela 15 Códigos para identificação dos extratos de diferentes órgãos de <i>P. niruri</i>	76
Tabela 16 Rendimento partição líquido-líquido	88
Tabela 17 Teor de ácido gálico, corilagina e ácido elágico e AEGC em amostras de fracionamento por partição líquido - líquido.	92
Tabela 18 Rendimento da extração em fase sólida	93
Tabela 19 Teor de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC em amostras de fracionamento por extração em fase sólida.....	97
Tabela 20 Determinação de Filantina em droga vegetal e extrato bruto seco de <i>P. niruri</i> . .	100
Tabela 21 Dados de absorvância relativos às soluções de quercetina de diferentes concentrações.	101
Tabela 22 Teor de flavonoides totais expressos como quercetina no extrato bruto seco e frações biomonitoradas de <i>P. niruri</i>	102
Tabela 23 Teor de metabólitos secundários versus concentrações do extrato e frações biomonitoradas com ação no processo de formação de cristais de oxalato de cálcio.	106

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Distribuição granulométrica da droga vegetal – partes aéreas de <i>P. niruri</i>	32
Gráfico 2 Rendimento extrações perfil sazonal de <i>P. niruri</i>	55
Gráfico 3 Teor de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC em SA.	64
Gráfico 4 Teor de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC em SE.	66
Gráfico 5 Teor de corilagina, ácido elágico e AEGC em SHA.	67
Gráfico 6 Variação sazonal de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC.....	69
Gráfico 7 Pluviosidade mensal acumulada dos meses de fevereiro/2012 a janeiro/2013.....	71
Gráfico 8 Correlação pluviosidade mensal <i>versus</i> teor de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC.	72
Gráfico 9 Amplitude térmica e temperatura média no dia da coleta de fevereiro/2012 a janeiro/2013.....	73
Gráfico 10 Correlação temperatura média <i>versus</i> teor de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC.	74
Gráfico 11 Rendimento extrações perfil diferentes órgãos de <i>P. niruri</i>	77
Gráfico 12 Teor de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC em Aq diferentes órgãos.	84
Gráfico 13 Teor de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC em Et diferentes órgãos.	85
Gráfico 14 Porcentagem de alteração do número de cristais em relação ao controle.	104
Gráfico 15 Porcentagem de alteração da área dos cristais em relação ao controle.	104

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 Obtenção do extrato bruto seco de <i>P. niruri</i> e análises realizadas.	52
Fluxograma 2 Obtenção dos extratos sazonais e análises realizadas.	55
Fluxograma 3 Obtenção dos extratos de diferentes órgãos e respectivas análises.	76
Fluxograma 4 Fracionamento por partição líquido-líquido.....	87
Fluxograma 5 Fracionamento por extração em fase sólida.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AISI – *American Iron and Steel Institut*

As – Fator de assimetria

BEH – *Ethylene bridged hybrid*

C18 – Octadecilsilano

CaOx – Oxalato de cálcio

CCD – Cromatografia em camada delgada

CLAE–DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos

CLAE–UV – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta

CLUE-DAD – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos

CPQBA - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DMSO – Dimetilsulfóxido

EFS – Extração em fase sólida

F_{254nm} – Fluorescência em 254 nm

FM - Fase móvel

h – Altura

HSS – *High strength silica*

k – Fator de retenção

kD – Quilo daltons

kV – Quilovolts

MDCK – *Madin-Darby canine kidney cells*

N- Número de pratos teóricos

NP – Natural products reagent

Ø – Diâmetro

PEG – Polietilenoglicol

PVDF - Polyvinylidene fluoride

Rs – Resolução

r² – Coeficiente de determinação

r – Coeficiente de correlação linear de Pearson

t_R – Tempo de retenção

UA – Unidade de absorvância

UPLC[®] – *Ultra performance liquid chromatography*

UV-Vis – Ultravioleta-visível

V – Volts

V_0 - Volume morto

α – Seletividade

EBC – Extrato bruto concentrado

EBS – Extrato bruto seco

SA – Extrato seco sazonalidade aquoso

SE – Extrato seco sazonalidade etanólico

SHA – Extrato seco sazonalidade hexano-acetato de etila

FA – Fração aquosa

FE – Fração emulsão

FHAE – Fração hexano-acetato de etila

FNB – Fração n-butanol

Aq – Extrato seco diferentes órgãos aquoso

Et – Extrato seco diferentes órgãos etanólico

HA – Extrato seco diferentes órgãos hexano-acetato de etila

TOF – *Time of flight*

NLPC – nefrolitotripsia percutânea

LEOC – fragmentação por ondas de choque

OPN – Osteopontina

THP – *Tamm-Horsfall Protein*

RESUMO

Phyllanthus niruri Linn. é uma espécie vegetal medicinal pertencente a família Euphorbiaceae, sendo conhecida no Brasil como quebra-pedra. Possui uso tradicional no tratamento de cálculos renais. Neste trabalho foi realizada a avaliação do perfil cromatográfico e a quantificação de metabólitos secundários como ácido gálico, corilagina e ácido elágico por técnicas cromatográficas tais como CCD e CLUE-DAD em extratos aquosos, etanólicos e hexano-acetato de etila de diferentes órgãos (caule, raiz, folhas, flor+frutos) de *P. niruri* e partes aéreas de coletas realizadas em diferentes meses do ano. Também foi obtido um extrato aquoso de *P. niruri* e a partir deste, frações para avaliação por ensaios *in vitro* da ação na formação de cristais de oxalato de cálcio. Como resultados foram encontrados diferenças qualitativas no perfil químico entre partes aéreas e raízes, e ausência de diferenças qualitativas no perfil cromatográfico durante a avaliação sazonal, bem como correlações positivas entre teor de metabólitos secundários e a pluviosidade, representando informações importantes para a cadeia produtiva de extratos vegetais. Além disso, o extrato e as frações avaliadas por ensaios *in vitro* demonstraram ter ação no processo de formação de cristais de oxalato de cálcio, tais como aumento do número de cristais e diminuição na área dos cristais, sendo que a fração n-butanol apresentou-se como a mais ativa. O maior teor de flavonoides na fração n-butanol, assim como a ação apresentada pela quercetina no ensaio *in vitro*, sugerem que os flavonoides podem estar relacionados com a ação sobre os cristais de oxalato de cálcio, bem como outras substâncias fenólicas como a corilagina; o ácido gálico não apresentou esta atividade. Dessa forma o presente trabalho contribuiu para a padronização do extrato de *P. niruri* L, pois definiu que não há variação qualitativa no perfil de metabólitos secundários durante os meses, sendo que coletas realizadas nos meses de novembro a janeiro apresentam maior concentração de ácido gálico, corilagina e ácido elágico. Os dados também apontam para o uso de partes aéreas ou de folhas como droga vegetal, de forma que estas informações são fundamentais para a qualidade do produto fitoterápico. Por fim, o extrato aquoso e frações apresentam ação na formação de cristais de oxalato de cálcio, sendo uma alternativa para a terapia da urolitíase.

Palavras-chave: Fitoterápico, *Phyllanthus niruri*, sazonalidade, urolitíase

ABSTRACT

Phyllanthus niruri Linn. is a medicinal herb belonging to the family Euphorbiaceae, known in Brazil as quebra-pedra. This plant has been used in traditional to treatment of kidney stones. At this work were evaluated the chromatographic profile and the quantification of secondary metabolites like gallic acid, corilagin and ellagic acid by chromatographic techniques such as TLC and UPLC-DAD in aqueous, ethanolic and hexane-ethyl acetate extracts from different organs (stem, root, leaf, flower+fruit) of *P. niruri* and aerial parts harvested in different months of the year. It was also obtained an aqueous extract of *P. niruri* and its fractions for evaluation by *in vitro* action on formation of calcium oxalate crystals. The results showed qualitative differences in chemical profiles between aerial parts and roots, and absence of qualitative differences in the chromatographic profile during seasonal evaluation, as well as positive correlations between content of secondary metabolites and rainfall, representing important information for the productive chain of medicinal plant extracts. Moreover, the extract and fractions evaluated by *in vitro* assays have been demonstrated activity in the process of calcium oxalate crystals formation, such as increasing the number of crystals and decreasing the crystals area, and the n-butanol fraction appears as the most active. The high amount of flavonoids in the n-butanol fraction, as well as the results obtained for quercetin by *in vitro* assays suggest the flavonoids can be related with the action in the process of crystallization. Thus this work contributes to the standardization of the extract of *P. niruri* with critical information for the quality of the herbal medicine, as well as the aqueous extract and the fractions can be used like an alternative for the therapy of urolithiasis.

Keywords: Herbal medicine, *Phyllanthus niruri*, seasonality, urolithiasis.

1 INTRODUÇÃO

Há muito tempo os produtos naturais são opções para o tratamento de diversas doenças. Grande parte dos medicamentos comercializados atualmente é derivada de vertebrados e invertebrados terrestres, micro-organismos e vegetais, sendo que os metabólitos secundários vegetais apresentam grande diversidade estrutural e são importantes fontes para a busca de substâncias com potencial terapêutico, menor toxicidade e maior eficácia (BRANDÃO et al., 2010; NEWMAN; CRAGG, 2007).

Ampla parte da população que reside nos países em desenvolvimento depende quase inteiramente de produtos vegetais para os cuidados primários de saúde. Apesar das altas cifras obtidas pelo mercado farmacêutico em países desenvolvidos, considerável parcela da população mundial é privada do acesso às novas tecnologias e, como alternativa, faz uso tradicional das plantas. Estes fatos ilustram a necessidade do conhecimento acerca da composição química e atividade biológica das espécies vegetais (CALIXTO, 2000; LIMA et al., 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as plantas medicinais seriam a melhor fonte para obtenção de fármacos. Aproximadamente 80% dos indivíduos de países em desenvolvimento fazem uso de compostos da medicina tradicional, muitos dos quais são derivados de plantas medicinais (CALIXTO, 2000; NJOROGE et al., 2012).

Nas últimas décadas as pesquisas voltadas para o desenvolvimento tecnológico de formas farmacêuticas com matérias-primas obtidas a partir de plantas tem apresentado claro crescimento, sendo que para alcançar as especificações pretendidas para o produto intermediário e para o produto final na produção de medicamentos fitoterápicos a qualidade dessas matérias-primas é fator decisivo. Um passo importante para o estabelecimento de critérios mínimos de aceitação de qualidade é a presença de especificações oficiais farmacêuticas. Assim, a legislação brasileira regula os critérios de qualidade para estes medicamentos (BRASIL, 2010a;

2010b), tal como acontece em muitos países europeus, apoiados pelas normativas da Organização Mundial da Saúde (COUTO et al., 2013b).

Dentre as espécies vegetais medicinais brasileiras, o quebra-pedra destaca-se por sua ampla utilização e ocorrência.

Phyllanthus niruri Linn. é uma espécie vegetal medicinal pertencente a família Euphorbiaceae, sendo conhecida no Brasil como quebra-pedra e em outros países latinos como *chanca piedra*. A infusão de diferentes partes dessa planta e de outras espécies pertencentes ao gênero *Phyllanthus* é frequentemente utilizada para fins terapêuticos, no tratamento de várias doenças em especial distúrbios renais e da bexiga urinária, associados com processos dolorosos (MOREIRA et al., 2013).

O uso tradicional de *P. niruri* no tratamento de cálculos renais aliado aos resultados dos ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos realizados com seu extrato aquoso (ou infusão) confirmaram sua ação na prevenção da formação de cálculos renais, antiespasmódica e anti-hiperalgésica. Estes dados sugerem seu uso terapêutico na forma de infuso (fitoterápico) ou de um medicamento fitoterápico contendo o extrato aquoso da planta (CALIXTO et al., 1998; BAGALKOTKAR et al., 2006; BARROS et al., 2006; MOREIRA et al., 2013).

Apesar de progressos substanciais na fisiopatologia e tratamento da urolitíase, não há nenhum medicamento adequado para uso na terapia clínica. Assim, um medicamento para a prevenção desta doença ou sua recorrência seria de grande interesse (BARROS et al., 2003; PETROIANU et al., 2001).

No presente trabalho são apresentados resultados relevantes para a padronização de um extrato de partes aéreas de *P. niruri* com aplicação na prevenção da urolitíase. Para a identificação de substância ativas ou possíveis marcadores no extrato aquoso foi adotada a estratégia de Fracionamento Biomonitorado. Ensaio *in vitro* foram utilizados na avaliação da atividade das frações na formação de cristais de oxalato de cálcio. A avaliação da variabilidade química compreendeu a comparação do perfil de metabólitos secundários de extratos de diferentes meses do ano e de diferentes órgãos (caules, flores+frutos, folhas e raízes). Métodos cromatográficos e espectrofotométricos foram empregados na análise de extratos e frações para caracterização do perfil químico, identificação e quantificação de metabólitos secundários.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Phyllanthus niruri* L.

Phyllanthus é um grande gênero pertencente à família Euphorbiaceae, compreendendo mais de 600 espécies, muitas das quais crescem no Brasil. Os exemplares que compõem o gênero apresentam-se sob a forma de arbustos, árvores e ervas. Espécies como *P. accuminatus*, *P. amarus*, *P. pulcher*, *P. niruroides*, *P. anisobus*, *P. orbiculatus*, *P. emblica*, *P. oxyphyllus*, *P. flexuosus*, *P. raticulatus*, *P. fraternes*, *P. simplex*, *P. mullernus*, *P. urinaria*, *P. myrifolis*, *P. virgatus*, *P. niruri* e *P. watsonii* foram investigadas em estudos fitoquímicos e farmacológicos (BAGALKOTKAR et al., 2006; EMBRAPA, 2006).

No Brasil, espécies do gênero *Phyllanthus* ocorrem em quase todo território e são conhecidas popularmente como quebra-pedra, erva-pombinha, arrebeta-pedra, dentre outros nomes (CALIXTO et al., 1998; UNANDER et al., 1990). A semelhança existente entre *P. niruri* e *P. tenellus* Roxb dificulta a distinção das espécies, podendo explicar em parte o uso de ambas na medicina popular para os mesmos fins. Estas são as duas únicas espécies de *Phyllanthus* reconhecidas pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010c; UNANDER et al., 1990).

Dentre as espécies de *Phyllanthus*, *P. niruri* é nativa da Floresta Amazônica e outras áreas tropicais em todo o mundo, incluindo Bahamas, sul da Índia, China, Gana, Nigéria, entre outros (SAMALI et al., 2012; BAGALKOTKAR et al., 2006). *P. niruri* é uma espécie herbácea, atingindo 10 a 50 cm de altura (EMBRAPA, 2006). Apresenta caule ereto, fino e ramoso; suas folhas são pequenas e ovais e quando observadas em conjunto tem o aspecto de folhas compostas de pequenas leguminosas com lâminas de 0,5-1,4 cm de comprimento e 0,3-0,6 cm de largura (BRASIL, 2010d).

Na medicina tradicional e popular brasileira, o quebra-pedra é utilizada principalmente no tratamento de hepatite e diabetes, em infecções urinárias e da bexiga e para tratar distúrbios renais, especialmente para eliminação de pedras nos

rins (SANTOS et al., 1995; WANG et al., 1995). É também utilizada na Espanha (*chanca piedra*) e em sistemas de medicina tradicionais, como o *Ayurveda* da Índia, o *Jamu* da Indonésia e a própria *Medicina Tradicional da China* (BAGALKOTKAR et al., 2006; CAMPOS; SCHOR, 1999).

Phyllanthus niruri L. é considerada uma planta medicinal promissora para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico, considerando-se as evidências farmacológicas relacionadas ao seu uso popular, além de dados fornecidos por estudos fitoquímicos, botânicos e agrônômicos (CALIXTO et al., 1998; COUTO et al., 2013b; BAGALKOTKAR et al., 2006; BARROS et al., 2006; MOREIRA et al., 2013).

2.1.1 Aspectos Químicos Sobre *Phyllanthus niruri* L.

Metabólitos secundários isolados de *P. niruri* incluem compostos fenólicos como lignanas, taninos hidrolisáveis, cumarinas e flavonoides (diversas classes), terpenos (monoterpenos e triterpenos) e alcaloides do tipo da securinina, que foram encontrados nas folhas, caule e raízes desta planta (BAGALKOTKAR et al., 2006; CALIXTO et al., 1998; HASSARAJANI; MULCHANDANI, 1990; ZHOU et al., 2012).

Tanto no emprego na medicina popular quando em estudos acerca de suas propriedades farmacológicas, *P. niruri* é frequentemente usada na forma de planta inteira, porém, na Farmacopeia Brasileira 5ª edição sua monografia descreve as partes aéreas como a droga oficial e o ácido gálico como um de seus marcadores químicos (BRASIL, 2010d).

Com base nisso, Couto et al. (2013a) procuraram avaliar as atividades anti-inflamatória e antialodínica, bem como a composição química dos extratos aquosos das diferentes partes de *P. niruri*: folhas, caules, raízes, folhas+caules e a planta toda. Os autores obtiveram perfis cromatográficos de todos os extratos e quantificaram ácido gálico por CLAE-UV. Os resultados do trabalho mostraram que folhas e caules, bem como a mistura deles, apresentam perfis cromatográficos muito similares, porém, quando as folhas foram analisadas separadamente dos caules, foi expresso um rendimento mais elevado de ácido gálico e outras substâncias principais. Significativas diferenças quantitativas e qualitativas foram observadas especialmente em relação ao perfil cromatográfico de raízes. Outro dado importante fornecido por esse estudo é a observação de que a diferença na composição química dos extratos das diferentes partes da planta refletiu-se na ação farmacológica *in vivo*, mais significativa também para os extratos de folhas e/ou

caules (COUTO et al., 2013a). Estes dados estão de acordo com o que foi realizado no presente trabalho. No entanto, apesar do menor conteúdo de ácido gálico nos extratos aquosos de folhas+caules, quando comparado com os extratos aquosos de folhas, aquele demonstrou um prolongamento da ação antialodínica, sendo assim mais efetivo que o próprio extrato aquoso de folhas, sugerindo-se a ocorrência de sinergismo, o que reafirma o uso de partes aéreas como material de partida para fitoterápicos para fins analgésicos.

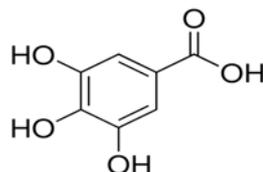
Martins et al. (2011) avaliou o perfil cromatográfico de extratos aquosos de quatro espécies de *Phyllanthus*, entre elas *P. niruri*, de coletas realizadas em diferentes locais e em três diferentes meses do ano, bem como de amostras comerciais adquiridas em mercados locais em diversas cidades do Brasil. Os dados obtidos foram classificados por modelagem quimiométrica com o propósito de identificação das espécies e a autenticação das amostras comerciais. Os resultados demonstraram que a cultura afeta o perfil cromatográfico das espécies de *Phyllanthus* examinadas. As amostras comerciais classificadas por modelos quimiométricos revelaram que as duas espécies oficiais de *Phyllanthus* segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (*P. niruri* e *P. tenellus*) são atualmente confundidas, na medida em que os produtos à base de plantas são vendidos como *P. niruri*, enquanto que a maioria das amostras testadas foi identificada como *P. tenellus* (BRASIL, 2010d).

A tabela 1 relaciona os metabólitos secundários presentes em *P. niruri*.

Tabela 1 Metabólitos Secundários de *Phyllanthus niruri* L.

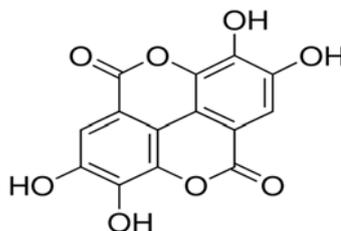
CLASSE	METABÓLITO SECUNDÁRIO	REFERÊNCIA
ALCALOIDES	4-hidroxisecurinina	GUPTA e AHAMED, 1984; BAGALKOTKAR et al, 2006; MARQUES, 2010. HASSARAJANI e MULCHANDANI, 1990; MULCHANDANI e HASSARAJANI, 1984.
	4-metoxidiidronorsecurinina	
	4-metoxitetraidrosecurinina	
	alosecurinina	
	diidrosecurinina	
	epibubbialina	
	filocrisina	
	nirurina	
	norsecurinina	
	securinina	
	securinol A, securinol B tetraidrosecurinina	
MONOTERPENOS	<i>p</i> -cimeno, limoneno	BAGALKOTKAR et al, 2006.
TRITERPENOS	3,7,11,15,19,23-hexametil- 2Z,6Z,10Z,14E,18E,22E-tetracosenen-1-ol acetato de lupeol	BIRKAM et al., 1989; BAGALKOTKAR et al, 2006; MARQUES, 2010; CALIXTO et al, 1998.
	lupeol	
	filanteol	
	filantenol filantenona	
SAPONINAS (genina)	diosgenina	BAGALKOTKAR et al, 2006
FLAVONOIDES	astragalina	ISHIMARU et al., 1992; BAGALKOTKAR et al, 2006; MARQUES, 2010.
	canferol-4'-ramnopiranosídeo	
	eriodictiol-7-ramnopiranosídeo	
	fisetina-4-O-glicosídeo	
	flavanona-5-O-rutinosídeo	
	galocatequina	
	epicatequina	
	catequina	
	epigalocatequina	
	epigalocatequina-3-O-galato	
	epicatequina-3-O-galato	
	isoquercitrina	
	niruriflavona	
	nirurina	
quercetina quercetol quercitrina rutina		
LIGNANAS	cubedina dimetil éter	HOUSSAIN et al, 1995; SATYANARAYANA et al., 1988; HUANG et al., 1992; PANCHAGNULA e SOMEPALLI, 1991; SHANKIL et al., 2008; BAGALKOTKAR et al, 2006; SINGH et al., 1989; ANJANEYULU et al., 1973.
	2,3-demetoxisecoisolintetralina	
	3,4-dimetilenodioxibenzil-3',4'- dimetoxibezilbutirolactona	
	8-(3-metilbuten-2-il)-2-fenil-croma-4-ona	
	2-(4-hidroxifenil)-8-(3-metilbuten-2-il)-croma-4- ona	
	5-demetoxinirantina	
	diacetato de 2,3-demetoxisecoisolintetralina	
	filantina	
	filnirurina	
	filtetralina	
	hidroxinirantina	
	hinoquinona	
	hipofilantina	
	isolintetralina	
	nirantina	
	nirfilina	
	nirtetralina	
seco-4-hidroxilintetralina		
trimetil éter de secoisolariciresinol urinartetralina		
TANINOS	1-O-galoil-6-O-luteoil- α -D-glicose	ISHIMARU et al., 1992;

HIDROLISÁVEIS (e substâncias relacionadas)	ácido gálico ácido repandusínico corilagina geraniina nirurisideo β -glicogalina	SUBEKI et al., 2005; UENO et al., 1988; BAGALKOTKAR et al., 2006; QIAN-CUTRONE et al., 1996.
CUMARINAS	ácido elágico metilbrevifolinicarboxilato	IZUKA et al., 2007, BAGALKOTKAR et al., 2006 SHIMIZU et al., 1989;
POLISSACARÍDEOS	xilana heteroxilana	MELLINGER et al., 2005



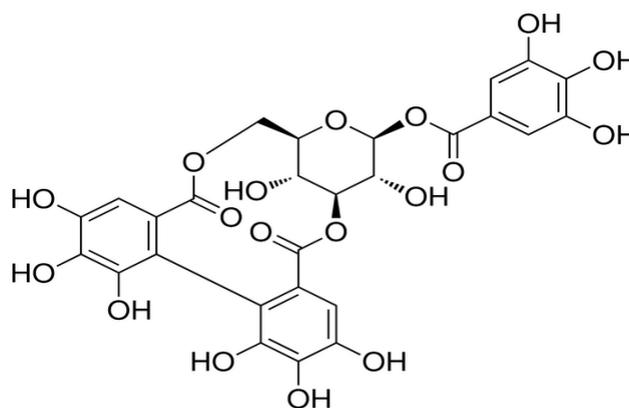
Fonte: Sigma Aldrich

Figura 1 Estrutura química do ácido gálico.



Fonte: Sigma Aldrich

Figura 2 Estrutura química do ácido elágico.



Fonte: Sigma Aldrich

Figura 3 Estrutura química da corilagina.

De Souza et al. (2002), validaram um método cromatográfico para analisar os compostos fenólicos (incluindo o ácido gálico) do extrato aquoso das partes aéreas de *P. niruri*. Já Markom et al. (2007) utilizando cromatografia líquida, quantificaram ácido gálico (Figura 1), ácido elágico (Figura 2) e corilagina (Figura 3) em diversos extratos de *P. niruri*. Posteriormente, com o mesmo método analítico foi realizada a

quantificação de elagitaninos em extratos e *P. niruri* produzidos por extração por fluido supercrítico (MARKOM et al., 2011). Finalmente, Colombo et al. (2009) publicaram um método para a determinação de corilagina nos extratos hidroalcoólicos de *P. niruri*. Este foi um trabalho realizado em parceria com o Grupo Centroflora, para a identificação, isolamento e validação de métodos cromatográficos para o controle de qualidade de extratos produzidos a partir de espécies brasileiras, entre elas *P. niruri* e *P. corcovadensis*.

AMIN e colaboradores (2013), utilizaram cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) acoplada a espectrômetro de massas com analisador por tempo de voo (TOF) para a identificação de ácido 4-*O*-cafeoilquínico e quercetina 3-*O*-ramnosídeo presentes em frações obtidas de extrato etanólico de *P. niruri*

Markom et al. (2006, 2007) realizaram a quantificação de ácido gálico, corilagina e ácido elágico, em cápsulas de HEPAR-P[®], produto contendo extrato padronizado de *P. niruri*, produzido a partir de extração por solvente seguido por uma série de etapas de purificação cromatográfica industrial.

Algumas patentes apresentam métodos de produção de extratos de *P. niruri*, dentre elas, uma descreve um extrato hidroalcoólico que foi fracionado por cromatografia de permeação em gel com resina polimérica não-iônica de 100 kD, originando um extrato contendo a fração de baixo peso molecular, isto é, contendo moléculas menores que 100 mil Daltons, sem especificar quais moléculas seriam estas, e formulação tópica com indicação de uso para tratamento antienvhecimento da pele, para redução de inflamação ou para clareamento da pele (MICHELE et al., 2011; SIMARNA et al., 2011).

O Fox Chase Cancer Center (1987) possui patente sobre preparação farmacêutica a partir da fração metanólica obtida por partição líquido-líquido do extrato hexânico de *P. niruri*, e administração a pacientes que possuem o vírus da Hepatite B. Michael e Michael (2004) obtiveram patente de uso de substâncias ou mistura de substâncias – alcaloides, taninos, lignanas, sesquiterpenos, triperpenos e glicosídeos cianogênicos - de espécies de *Phyllanthus* para tratamento ou prevenção de infecções causadas por Hepatite.

2.1.2 Aspectos Farmacológicos Sobre *Phyllanthus niruri* L.

Phyllanthus niruri L. contém lignanas, alcaloides, terpenos e taninos, que se destacam por terem os seguintes efeitos: hepatoproteção, ação anti-inflamatória,

antagonismo da endotelina-1, inibição da transcriptase reversa e replicação do HIV, ação anti-hepatite e aumento da citotoxicidade da vimblastina contra células cancerosas multirresistentes (MURUGAIYAH; CHAN, 2007; COUTO et al., 2013, PORTO et al., 2013).

Chauham et al. (1976) em estudos com *Crataeva nurvala* Buch Ham, isolaram o lupeol e demonstraram sua ação anti-urolitíase. Este triterpeno pode estar relacionado à atividade na prevenção de urolitíase observada em estudos com *P. niruri*, uma vez que também está presente nas raízes desta planta.

Estudos conduzidos por Campos e Schor (1999) demonstraram que o extrato aquoso de *P. niruri* produziu a inibição da internalização de cristais de oxalato de cálcio (CaOx) pelas células renais caninas (MDCK), sem evidência de citotoxicidade, além de ter sido constatado por Freitas et al. (2002) o impedimento do crescimento de cálculos em um modelo de urolitíase induzida por CaOx em ratos. Barros et al. (2003) demonstraram que o extrato aquoso de *P. niruri* interferiu com o processo de cristalização do CaOx *in vitro* através da redução do crescimento e da agregação de cristais e favoreceu a formação de uma estrutura cristalina dihidratada de CaOx, menos aderente.

Estudos farmacológicos em ratos *Wistar* utilizando extrato aquoso *P. niruri* a 3% p/v e extrato etanólico 50% comprovaram sua ação calurética dissociada da diurese e da natriurese desta espécie (CASTRO-CHAVES et al., 2002).

Em estudo clínico, o chá de *P. niruri* não produziu efeitos adversos ou tóxicos nos pacientes e os dados sobre eficácia sugerem efeitos que promovem a eliminação de cálculos renais nos pacientes, bem como a normalização dos níveis de cálcio em pacientes hipercalcêmicos (NISHIURA et al., 2004). Portanto, esses efeitos estão relacionados com o potencial preventivo da formação de cálculos renais de *P. niruri* (BARROS et al., 2006).

Micali et al. (2006) descreve o estudo clínico realizado com 150 pacientes para a avaliação da eficiência do uso crônico de Uriston[®] após litotripsia extra-corpórea por ondas de choque, técnica realizada para eliminação de cálculos renais. O produto Uriston[®] é produzido pela empresa italiana NaturalBradel, contendo extrato de *P. niruri* padronizado a 15% de taninos, sendo comercializado na forma de sachês (NATURALBRADEL, 2013). Os resultados demonstram que a administração regular de *P. niruri* após litotripsia extra-corpórea por ondas de

choque resulta em aumento da taxa de cálculos livres, prevenindo a recristalização dos fragmentos e aumentando a eliminação dos mesmos (MICALI et al., 2006).

Dados sobre a aplicação de *P. niruri* em estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos para o tratamento da nefrolitíase foram sumarizados por Boim e colaboradores (2010). Segundo os autores, os resultados indicam que *P. niruri* interfere com importantes etapas da formação do cálculo renal, incluindo a agregação do cristal, a internalização pelas células tubulares, além da composição e estrutura do cristal. Já os estudos clínicos evidenciam os efeitos benéficos na indução do relaxamento uretral, interferência na excreção de cálcio ou ajuda na eliminação de fragmentos de cálculos após litotripsia (BOIM et al., 2010).

Murugaiyah e Chan (2006) investigaram os potenciais efeitos antihiperuricêmicos de *P. niruri* verificando que o extrato metanólico das partes aéreas diminuiu os níveis de ácido úrico no plasma de ratos hiperuricêmicos, porém não atuou em ratos normais. Os resultados indicaram que o extrato metanólico provavelmente possui efeito uricosúrico através da inibição da enzima xantina-oxidase. As lignanas isoladas do extrato, filantina e hipofilantina, também apresentaram o efeito anti-hiperuricêmico no plasma.

O alcaloide norsecurinina apresentou atividade antiespasmódica inibindo a contração da musculatura lisa do ureter, propiciando a facilitação da eliminação de cálculos renais (MARQUES, 2010).

Cápsulas de HEPAR-P[®] produzidos pela Nova Laboratories Sdn. Bhd (Malásia) contendo 250 mg de extrato de *P. niruri* padronizado (EPN 797) em 10 mg (4%) de corilagina e 45 mg (18%) de flavonoides totais, dentre eles a rutina, possui patentes na Malásia (MY-128938-A e MY-140399-A) com ação comprovada pela tradicionalidade de uso de *Phyllanthus* para tratamento de doenças do fígado (NOVA LABORATORIES SDN. BHD, 2013).

Outras atividades apresentadas por *P. niruri* ou por substâncias isoladas da mesma incluem: ação antinociceptiva (CALIXTO et al., 1998), antiviral, antiplasmódica (TONA et al., 2001, 2004; WEI et al., 2012, IFEOMA et al. 2013), antibacteriana (AMIN et al, 2012), antimicrobiana (RAJESHWAR, et al., 2008; SHARMA, SINGH, 2013), antidiabética (OKOLI et al., 2011), ação nefroprotetora (KANCHANA, PARAMESWARI, 2013), antigenotoxicidade (DE QUEIROZ et al., 2013), antihiperalgésica (MOREIRA et al, 2013).

2.2 Urolitíase

A litíase urinária ou urolitíase é uma patologia que atinge o homem desde a antiguidade. É uma patologia bastante comum, apresentando alta taxa de recorrência. Entre 120 e 140 por 1 milhão irão desenvolver pedras urinárias por ano em uma relação de 3:1 homem/mulher. Podendo-se afirmar que, aos 70 anos de idade, 12% das pessoas apresentarão pelo menos um episódio de litíase. Considerando que 30% desses pacientes são hospitalizados e submetidos a alguma intervenção (extração cirúrgica, fragmentação), pode-se avaliar o grande impacto social e econômico dessa doença (BARROS et al., 2003; PETROIANU et al., 2001; TURK et al., 2013).

A partir de meados da década de 1980, o advento dos procedimentos de litotripsia extracorpórea e endoscopia urológica, tornaram a abordagem terapêutica - que antes era apenas cirúrgica - menos agressiva e com morbidade e mortalidade menores (GOMES et al., 2005).

O desenvolvimento da litíase é um processo complexo e multifatorial, sendo influenciado pela hereditariedade, nutrição, idade e etnia; além da presença de alterações do aparelho urinário, como malformações e distúrbios metabólicos. A associação da litíase urinária com *Diabetes mellitus*, síndrome metabólica e obesidade já estão bem estabelecidas. Entre as teorias propostas sobre o desenvolvimento dos cálculos renais, é ponto comum entre elas a ocorrência de aumento da excreção urinária dos elementos constituintes dos cálculos e/ou diminuição da excreção dos inibidores da cristalização, resultando em uma cristalúria anormal (GOMES et al., 2005; MAZZUCCHI, SROUGI, 2009).

A formação de pedras nos rins é iniciada pela supersaturação urinária de sais e retenção de cristais no trato urinário. Pedra nos rins é uma desordem crônica em humanos sendo que, os tipos mais comuns de pedras renais são as de oxalato de cálcio (CaOx). Cálculos de oxalato de cálcio são formados por cristais de CaOx monohidratado e de CaOx dihidratado, sendo que os CaOx monohidratados são mais estáveis termodinamicamente e mais frequentes clinicamente. Como consequência da conservação da água no organismo, a urina normal é supersaturada com componentes cristalinos, e vários inibidores de macromoléculas, como por exemplo, a proteína Tamm-Horsfall (THP) e osteopontina *P. niruri* (OPN),

tem sido isolados e identificados na urina normal e em cálculos renais (BASAVARAJ et al., 2007).

A fisiopatologia da formação de pedras de cálcio envolve diferentes fases, dentre elas: acumulação de CaOx e fosfato de cálcio, nucleação, crescimento do cristal, agregação do cristal e retenção do cristal (BASAVARAJ et al., 2007).

São fatores promotores da formação de cálculos renais: cálcio, sódio, oxalato, urato, cistina, baixo pH da urina, proteína Tamm-Horsfall e baixo fluxo da urina. Já os fatores de inibição da formação de cálculos renais atuam prevenindo o crescimento e agregação do cristal pelo recobrimento da superfície do cristal de cálcio ou pela complexação com cálcio e oxalato. Dentre eles estão: citrato, magnésio, pirofosfato, proteína Tamm-Horsfall, glicosaminas, protrombina urinária fragmento 1, entre outros (BASAVARAJ et al., 2007).

Muitas controvérsias existem sobre a ação da proteína Tamm-Horsfall inibir ou promover a agregação do cristal. Segundo Basavaraj e colaboradores (2007), muitos autores acreditam que esta proteína é um inibidor efetivo da agregação de cristais de oxalato de cálcio monohidratado em soluções com pH alto, baixa força iônica e baixa concentração de íons divalentes. Em situação contrária, de baixo pH, altas concentrações de cálcio, sódio e íons hidrogênio, a atividade inibitória é perdida e a proteína pode transformar-se em um promotor de agregação.

Mazzucchi e Srougi (2009) descrevem os principais meios de diagnóstico e tratamento para a litíase urinária, utilizados entre os anos de 1979 e 2009. O diagnóstico por imagens dos cálculos do trato urinário baseia-se em: raio-X simples do abdome, ultrassonografia e urografia excretora, sendo que esta última utiliza contraste iodado, o qual produz reações alérgicas. Também é utilizada atualmente a tomografia computadorizada helicoidal, apresentando alta sensibilidade e especificidade, porém é de alto custo. A tomografia computadorizada helicoidal tem sido considerada a técnica mais precisa no diagnóstico por imagem de cálculos do trato urinário (DE FREITAS et al., 2004).

Dentre os tratamentos para a cólica ureteral estão: analgésicos de ação periférica e antiespasmódicos associados ou não aos anti-inflamatórios não estereoidais (indometacina, ibuprofeno). Os analgésicos de ação no sistema nervoso central (tramadol e hidromorfina) são utilizados em casos em que o controle da dor é mais difícil (MAZZUCCHI, SROUGI, 2009; TURK et al., 2013).

A terapia expulsiva consiste na administração de relaxantes da musculatura ureteral, como por exemplo, nifedipina, doxazosina, tamsulosina, associados ou não a corticoides, com o intuito de facilitar a eliminação dos cálculos (MAZZUCCHI, SROUGI, 2009; TURK et al., 2013).

Dentre os tratamentos intervencionistas mais utilizados estão: a litotripsia extracorpórea, que consiste na fragmentação do cálculo por ondas de choque (LEOC) aplicadas externamente ao paciente; a nefrolitotripsia percutânea (NLPC), consiste na remoção do cálculo inteiro ou fragmentado utilizando um nefroscópio introduzido na via excretora; e a ureterolitotripsia endoscópica, que consiste na remoção de cálculos do trato urinário por meio de um ureteroscópio introduzido na uretra. A escolha de um tratamento ou outro depende de uma série de condições do paciente, das características morfológicas e da localização do cálculo renal. (MAZZUCCHI, SROUGI, 2009).

Segundo Turk et al (2013), a cirurgia aberta e a laparoscopia devem ser consideradas apenas em casos em que as técnicas de litotripsia e os procedimentos endourológicos falharem, anormalidades anatômicas e obesidade mórbida.

Atualmente os protocolos de tratamento farmacológico para pedras de oxalato de cálcio baseiam-se na redução da hipercalcúria utilizando tiazida e citrato de potássio; redução da hiperossalúria com a restrição de oxalato; combate a hipocitratúria e redução da acidose tubular renal distal com o uso de citrato de potássio; e aumento do volume de urina (TURK et al., 2013).

Apesar de progressos substanciais na fisiopatologia e tratamento da doença, não há nenhum medicamento adequado para uso na terapia clínica. Assim, um medicamento para a prevenção desta doença ou sua recorrência seria de grande interesse. Nos últimos anos, muita ênfase tem sido dada em explorar algumas substâncias naturais que podem atuar como promissores candidatos na prevenção e tratamento da urolitíase (BARROS et al., 2003; PETROIANU et al., 2001; YASIR, WAQAR, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo contribuir para a padronização do extrato de *Phyllanthus niruri* L. identificando marcadores com possível aplicação no tratamento da urolitíase, comparando o perfil de metabólitos secundários de diferentes extratos, avaliando as diferenças sazonais e entre os órgãos da espécie.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o perfil químico de folhas, flores+frutos, caules e raízes de *P. niruri* por meio de técnicas cromatográficas com ênfase nos seguintes metabólitos secundários: flavonoides, taninos, terpenos e lignanas;
- b) Avaliar o perfil químico de *P. niruri* de coletas realizadas em diferentes meses do ano por meio de técnicas cromatográficas com ênfase nos seguintes metabólitos secundários: flavonoides, taninos, terpenos e lignanas;
- c) Obter frações do extrato aquoso para avaliação por ensaios *in vitro* da ação na formação de cristais de oxalato de cálcio;
- d) Identificar e quantificar os metabólitos secundários na droga vegetal, extrato aquoso e nas frações obtidas.

4 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Aagitador de tubos Phoenix[®] Modelo AP56

Aagitador mecânico Produtest[®]

Balança analítica Gehaka[®] Modelo BG400

Balança analítica Marte[®] modelo AY220

Balança analítica Mettler[®] Modelo AE200

Balança analítica Mettler[®] Toledo Modelo XP26

Bomba à vácuo Tecnal[®] Modelo TE-0581

Cartucho Phenomenex[®] modelo Strata[®] C18-E 15 x 10 mm; 55 µm

Coluna cromatográfica Hypersil ODS-2 150 x 4,6 mm x 5 µm

Coluna cromatográfica Waters[®] Acquity BEH Fenil 100 x 2,1 mm; 1,7 µm

Coluna cromatográfica Waters[®] Acquity HSS T3 C18 100 x 2,1 mm; 1,8 µm;

Cromatoplaça de alumínio sílica gel 60 F_{254nm} Merck[®] 20 x 20 cm

Cromatoplaça de alumínio sílica gel 60 F_{254nm} Sigma-Aldrich[®] 20 x 20 cm

Cuba cromatográfica de vidro 21 x 21 x 9 cm

Elemento filtrante Nylon[®] G30

Espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu[®] UV-1800

Estufa de secagem e esterilização Fanem[®] 320 SE

Estufa de secagem Quimis[®] 0317H-52

Evaporador rotativo Tecnal[®] TE-211

Evaporador Tipo Boule Bernauer[®]

Filtro Rotativo Cipinox[®]

Liofilizador MicroModulyo[®], acoplado a bomba de vácuo Edwards[®]

Membrana para filtração Merck Millipore[®] GV Durapore[®] PVDF 47 mm, 0,22 µm

Moinho de Facas Tipo Willye Tecnal[®] TE-650

Moinho de Martelos Tigre[®]

Padrões analíticos (pureza): ácido gálico Chromadex[®] (96%), ácido elágico Sigma Aldrich[®] (96%), corilagina Chromadex[®] (87,1%), filantina Chromadex[®] (99,7%),

pirogalol Chromadex[®] (99%), quercetina USP (99,5%), quercitrina Sigma Aldrich[®] (88,6%), rutina USP (100%)

Papel filtrante 125 mm 80 gr

Pipetador Eletrônico *HandyStep* Eletronic Brand[®]

Pó de pele Sigma Aldrich[®]

Ponteiras para *HandyStep* Plastibrand[®] PD-Tips de 10 mL, 5 mL, 2,5 mL, 1,25 mL e 500 µL

Reagentes grau PA: acetato de sódio trihidratado Synth[®], ácido fosfomolibdico hidratado Neon[®], anisaldeído Vetec[®], carbonato de sódio anidro Synth[®], cloreto de alumínio Synth[®], cloreto férrico hexahidratado Synth[®], 2-aminoetil difenilboridrato Aldrich[®], polietilenoglicol 4000 Synth[®], tungstato de sódio dihidratado Merck[®]

Seringa estéril sem agulha BD Luer-Lok Tip Plastipak[®] 3 mL

Sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência Waters[®] Modelo Acquity H-Class equipado com bomba quaternária (*Quaternary Solvent Manager*) Modelo QSM, amostrador automático (*Sample Manager*) Modelo FTN, forno para coluna cromatográfica, detector de arranjo de diodos Modelo UPL, *software* do controle e aquisição de dados Empower 3 e *software* de transferência de método analítico Acquity UPLC *Columns Calculator*

Software GraphPad InStat 3[®]

Software GraphPad Prism 3[®]

Software Microsoft Excel[®] 2010

Solventes grau cromatográfico (Merck[®]): acetonitrila, ácido acético glacial, dimetilsulfóxido, metanol

Solventes grau PA (Synth[®]): acetato de etila, acetona, ácido acético glacial, ácido fórmico, ácido orto-fosfórico, ácido sulfúrico, álcool etílico, hexano, n-butanol, tolueno Tacho com aquecimento e agitação Cipinox[®]

Tamises 20 mesh, 50 mesh, 70 mesh e 80 mesh

Ultrapurificador de água Maxima Elga[®] Modelo USF

Ultrassom Unique[®] modelo Ultra Cleaner 1400

Ultrassom: Unique[®] modelo USC 2800

Unidade filtrante de seringa Merck Millipore[®] GV Millex PVDF 33 mm, 0,22 µm

Vial de vidro âmbar Flow Supply[®] 9 mm, 12 x 32 mm, 2 mL

5 MÉTODOS

5.1 Droga Vegetal (DV)

O material vegetal para a obtenção e fracionamento do extrato aquoso foi coletado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade de Campinas – UNICAMP (Paulínia-SP) em 28/02/2012, no estado fenológico de florescimento e frutificação. A secagem do material vegetal foi realizada à 40 °C em estufa com circulação de ar por 7 dias. O material vegetal seco, correspondente ao caule, flor+fruto e folha, foi moído em moinho de martelos.

Para a avaliação do perfil sazonal, seis indivíduos de *P. niruri* foram coletados no dia 28 de cada mês durante um ano, com início em fevereiro de 2012 e término em janeiro de 2013, no Campo Experimental Agrônomo da Anidro Extrações do Brasil Ltda, Grupo Centroflora, empresa do ramo farmoquímico, localizada em Botucatu-SP. As mudas cultivadas na empresa Anidro foram obtidas do CPQBA-UNICAMP e plantadas no dia 15/12/2011. As amostras foram secas em estufa com circulação de ar à 40 °C. O período de secagem foi de 24 h. Os materiais vegetais secos, correspondente ao caule, flor+fruto e folha, foram então moídos separadamente em moinho de facas.

Para a avaliação do perfil químico de diferentes órgãos da planta, seis indivíduos de *P. niruri* L foram coletados em 28/02/2012, no CPQBA-UNICAMP e em 20/08/2012 no Campo Experimental Agrônomo da Anidro, Botucatu-SP. Todas as amostras foram secas em estufa com circulação de ar à 40 °C. O período de secagem foi de 3 dias para o material vegetal coletado em fevereiro e 5 dias para o coletado em agosto. O material coletado em fevereiro foi separado em caule, flor+fruto e folha, enquanto que o coletado em agosto foi separado em caule, folha e raiz. O material de cada parte foi fragmentado em liquidificador, até a obtenção de 5,0 g.

5.2 Preparação dos Extratos

5.2.1 Extrato Bruto Seco (EBS)

A extração da droga vegetal (3,0 kg) foi realizada em escala piloto sob aquecimento e agitação em tacho de aço inox AISI 304 na empresa Centroflora, com água potável a 70 °C por 1 h, utilizando uma relação droga vegetal/ solvente de 1:20 (p/v). Após, a solução extrativa obtida foi filtrada por malha de Nylon de 30 µm em filtro rotativo. O filtro rotativo é utilizado para filtração contínua, sendo um tambor cilíndrico horizontal que gira a baixa velocidade parcialmente submerso na solução a filtrar, cuja superfície externa do tambor é feita de metal perfurado sobre a qual é fixada a malha filtrante (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2014). O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador tipo Boule - evaporador descontínuo equipado com placas de troca de calor que atuam em contato direto com o produto e agitador de lâminas horizontais que produzem uma agitação contínua turbulência do produto (KLAUS, 2014) - a 70 °C e pressão a - 0,6 bar, sendo chamado de extrato bruto concentrado (EBC), o qual foi em seguida, congelado a - 80 °C e liofilizado, obtendo-se o extrato bruto seco bruto (EBS).

O extrato bruto seco (EBS) foi destinado à posterior fracionamento.

5.2.2 Extratos Sazonalidade (SA, SE e SHA)

Para a avaliação do perfil sazonal, o material vegetal foi extraído com água, etanol e hexano: acetato de etila 1:1 (v/v), sequencialmente. O preparo dos extratos aquosos foi realizado em banho-maria a 65 °C durante 1 h, com agitação a cada 10 min. A massa de droga vegetal utilizada foi 10,0 g e o volume de água foi de 100 mL. Após o tempo de extração, as soluções extrativas sobrenadantes foram separadas dos materiais vegetais por filtração simples (papel de filtro) e secas em estufa de secagem a 60 °C por 5 dias, obtendo-se os extratos secos sazonais aquosos (SA). Cada material vegetal residual foi seco em estufa de secagem a 40 °C por 24 h e então extraído com 150,0 mL (divididos igualmente em 3 etapas de extração) de etanol. As extrações foram realizadas em ultrassom à temperatura ambiente em 3 etapas de 20 min cada. Após cada etapa, as soluções extrativas sobrenadantes foram separadas dos materiais vegetais residuais por filtração simples (papel de filtro). Os filtrados de cada uma das 3 etapas de extração foram agrupados em erlenmeyers, concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida

(- 600 mmHg) a 60 °C até resíduo. O resíduo foi solubilizado com 20 mL de etanol, sendo transferido para frasco de vidro, e secos sob fluxo de ar em capela e, finalmente, em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida, obtendo-se assim os extratos secos sazonais etanólicos (SE). Os materiais vegetais residuais dessa etapa foram secos em estufa de secagem a 40 °C por 24 h e então extraídos com 150,0 mL (3 etapas) de acetato de etila:hexano 1:1 (v/v) utilizando o mesmo método descrito para a produção dos extratos etanólicos. Os extratos acetato de etila:hexano 1:1 foram denominados extratos secos sazonais hexano-acetato (SHA).

5.2.3 Extratos Diferentes Órgãos

Para a avaliação do perfil dos diferentes órgãos da planta, o material vegetal foi extraído com água, etanol e hexano: acetato de etila 1:1 (v/v), sequencialmente. O preparo dos extratos aquosos foi realizado em banho-maria a 65 °C durante 1 h, com agitação a cada 10 min. A massa de droga vegetal utilizada foi 5,0 g e o volume de água foi de 50 mL. Após o tempo de extração, as soluções extrativas sobrenadantes foram separadas dos materiais vegetais por filtração simples (papel de filtro), congeladas à - 80 °C e liofilizadas, obtendo-se os extratos aquosos secos. Cada material vegetal residual foi seco em capela sob fluxo de ar e então extraído com 75,0 mL (divididos igualmente em 3 etapas de extração) de etanol. As extrações foram realizadas em ultrassom à temperatura ambiente em 3 etapas de 20 min cada. Após cada etapa, as soluções extrativas sobrenadantes foram separadas dos materiais vegetais por filtração simples (papel de filtro). Os filtrados das 3 etapas de extração referentes a mesma parte da planta e solvente foram agrupados em béqueres, secos sob fluxo de ar em capela e, finalmente, em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida, obtendo-se assim os extratos etanólicos secos. Os materiais vegetais residuais dessa etapa foram secos em capela sob fluxo de ar e então extraídos com 75,0 mL (3 etapas) de acetato de etila:hexano 1:1 (v/v) utilizando o mesmo método descrito para a produção dos extratos etanólicos. Os extratos acetato de etila:hexano (1:1) foram denominados extrato secos hexano-acetato. Estas amostras foram preparadas pela aluna de iniciação científica do Laboratório de Farmacognosia Natália Coelho da Silva sob a orientação do prof. Dr. André Gonzaga dos Santos.

5.3 Controle de Qualidade da Droga Vegetal e Extrato Bruto Seco

As técnicas utilizadas para a avaliação da qualidade da droga vegetal e do extrato bruto obtido foram realizadas segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª edição, sendo que as adaptações realizadas estão descritas abaixo (2010c; 2010d).

5.3.1 Determinação de Granulometria da Droga Vegetal Utilizada na Obtenção do Extrato Bruto Seco

Foram separados quatro tamises dentre os que estão descritos no método 5.2.11 da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010c). Montou - se o conjunto com os tamises de maior abertura sobre os de abertura menor, sendo este conjunto colocado sobre o coletor. Pesou-se 25,0 g da amostra que foram transferidos para o tamis superior, distribuindo-se uniformemente o pó. Tampou-se o conjunto. O aparelho foi acionado, por 15 min, com vibração adequada em agitador mecânico. Após o término do tempo de vibração foram obtidas as massas do pó retido em cada tamis e no coletor.

O percentual retido foi calculado em cada tamis, através da média de três determinações.

5.3.2 Determinação de Água em Drogas Vegetais

Amostras de 2 g da droga vegetal cominuída foram exatamente pesadas em pesa-filtros previamente dessecados a 105 °C por 30 min, e tarados. Foram colocados em estufa por 5 h, à temperatura de 105 °C, até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de água em relação à droga seca ao ar, conforme descrito no método 5.4.2.3 da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010c), através da média de três determinações.

5.3.3 Determinação da Perda por Dessecação no Extrato Bruto Seco - Método Gravimétrico

Amostras de 1 a 2 g do extrato bruto seco (EBS) foram exatamente pesadas em pesa-filtros previamente dessecados durante 30 min a 105 °C, e tarados. Os pesa-filtros foram colocados em estufa por 2 h, à temperatura de 105 °C, até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de perda por dessecação, através da média de três determinações (BRASIL, 2010c).

5.3.4 Determinação do Teor de Taninos Totais na Droga Vegetal e no Extrato Bruto Seco

O método de doseamento de taninos totais, contido na monografia de *P. niruri* (BRASIL, 2010d) foi adaptado segundo o que se segue.

Amostras em triplicata de 1,25 g da droga vegetal (DV) moída foram pesadas e transferidas para erlenmeyer de 250 mL. Foram adicionados 150 mL de água purificada e extraídas em banho-maria, sob refluxo, durante 30 min, em temperatura entre 80 e 90 °C. Após o tempo determinado, resfriou-se a mistura em água corrente que foi transferida para balão volumétrico de 250 mL. O volume foi completado com água purificada. Foi deixado decantar o sedimento e filtrou-se por papel de filtro, desprezando os 50 mL iniciais do filtrado. Esta solução foi chamada de solução estoque DV.

Para a amostra do extrato bruto seco (EBS), 0,5 g foi pesado e transferido para balão volumétrico de 250 mL. Foram adicionados 150 mL de água purificada e solubilizou-se em ultrassom durante 30 min, em temperatura entre 25 e 30° C. Após o tempo determinado, o volume foi completado com água purificada. Esta solução foi chamada de solução estoque EBS.

Solução amostra para determinação de polifenóis totais (A1): foram transferidos 5,0 mL da Solução estoque para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com água. Foram transferidos 5,0 mL desta solução para balão volumétrico de 50 mL, adicionaram-se 2,0 mL de reagente de Folin-Denis, completando-se o volume com solução aquosa de carbonato de sódio 10,6%. A absorvância da solução (A1) foi medida em 715 nm em espectrofômetro UV-Vis, exatamente 3 min após a adição do último reagente, utilizando água purificada como branco.

Solução amostra para determinação de polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele (A2): foram adicionados 0,15 g de pó de pele SQR a 15,0 mL da Solução estoque para erlenmeyer de 50 mL. Agitou-se a solução com barra magnética em agitador magnético, durante 60 min. A solução foi filtrada por algodão, sendo que o algodão não foi lavado. Foram diluídos 5,0 mL desta solução para balão volumétrico de 25 mL com água purificada. Foram transferidos 5,0 mL desta solução para balão volumétrico de 50 mL, adicionaram-se 2,0 mL de reagente de Folin-Denis, completando-se o volume com solução aquosa de carbonato de sódio 10,6%. A

absorvância da solução (A2) foi medida em 715 nm em espectrofômetro UV-Vis, exatamente 3 min após a adição do último reagente, utilizando água purificada como branco.

Solução padrão: foram dissolvidos exatamente 5,0 mg de pirogalol em água e diluiu-se para balão volumétrico de 10 mL com o mesmo solvente. Foram transferidos 5,0 mL desta solução para balão volumétrico de 100 mL com água purificada. Transferiu-se 5,0 mL desta solução para balão volumétrico de 50 mL, adicionaram-se 2,0 mL de reagente de Folin-Denis, completando-se o volume com solução aquosa de carbonato de sódio 10,6%. A absorvância da solução (A3) foi medida em 715 nm em espectrofômetro UV-Vis, exatamente 3 min após a adição do último reagente e dentro de 15 min contados da dissolução do pirogalol, utilizando água purificada como branco.

Os resultados foram expressos em teor de taninos totais e de fenólicos totais quantificados como pirogalol, por meio de três determinações, segundo as equações:

$$\text{Taninos Totais (\%)} = \frac{13,12 \times (A1 - A2)}{A3 \times m}$$

$$\text{Fenólicos Totais (\%)} = \frac{13,12 \times A1}{A3 \times m}$$

Onde:

A1 = absorvância medida da Solução amostra para polifenóis totais;

A2 = absorvância medida da Solução amostra para polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele;

A3 = absorvância medida da Solução padrão;

m = massa da amostra considerando-se a determinação de água.

5.4. Fracionamento do Extrato Bruto Seco

5.4.1 Partição Líquido-Líquido

As condições de separação foram realizadas em pequena escala. O extrato seco foi fracionado primeiro em 3 frações por partição líquido-líquido utilizando hexano: acetato de etila 8:2 (v/v), n-butanol e água.

Foram solubilizados 5,0 g do extrato seco bruto (ESB) em 100 mL de água destilada, e foi submetido à partição inicialmente com hexano: acetato de etila 8:2 (75 mL, 3 vezes). As fases hexano-acetato de etila foram reunidas, concentradas para eliminação total do solvente orgânico e deixadas em capela para secagem, obtendo-se a fração hexano-acetato de etila (FHAE). A fase aquosa restante foi submetida à partição com n-butanol (75 mL, 3 vezes). As fases n-butanol foram reunidas, concentradas para eliminação total do solvente orgânico e deixadas em capela para secagem, obtendo-se a fração n-butanol (FNB). A fase aquosa restante foi também concentrada e deixada em estufa de secagem a 60 °C, obtendo-se a fração aquosa (FA). Houve a formação de uma fase intermediária, sendo esta separada das demais, concentrada e deixada em estufa de secagem a 60 °C, obtendo-se a fração emulsão (FE).

Os perfis químicos das frações foram obtidos por CCD (Item 5.5.1) e CLUE (Item 5.5.2) e a determinação do teor de ácido gálico, corilagina e ácido elágico foram realizados por CLUE. Também foi realizada a determinação de flavonoides totais (Item 5.7).

5.4.2 Extração em Fase Sólida

A extração em fase sólida (EFS) com EBS foi realizada como uma alternativa ao fracionamento por partição líquido-líquido, com o objetivo de otimizar condições de fracionamento para obter frações de composição química distinta para os ensaios de formação de cristais de oxalato de cálcio.

Prosseguiu-se o fracionamento de EBS utilizando-se EFS, sendo empregada uma coluna de vidro (h: 100 mm; Ø: 45 mm) contendo aproximadamente 80 g de sílica gel (63 - 200 µm) como fase estacionária. Após empacotamento, a coluna foi condicionada com 200 mL de acetato de etila. Foram aplicados aproximadamente 4,0 g de EBS previamente solubilizados em 10 mL de metanol: água (8:2 v/v) e homogeneizado com 5 g de fase estacionária, sendo esta mistura seca em estufa a 40° C previamente a aplicação. O EBS foi fracionado com 250 mL (2,5 vezes o V_0 da coluna) de cada um dos eluentes abaixo, em proporção volumétrica:

1. acetato de etila
2. acetato de etila: metanol 90:10
3. acetato de etila: metanol 80:20
4. acetato de etila: metanol 60:40

5. acetato de etila: metanol 40:60
6. acetato de etila: metanol 20:80
7. metanol
8. água

Recolheram-se 250 mL de cada fração em erlenmeyer, sendo que estas foram concentradas em evaporador rotatório a 60 °C sob pressão reduzida, até eliminação total do solvente orgânico e deixadas em capela de fluxo de ar para secagem.

Os perfis químicos das frações foram obtidos por CCD (Item 5.5.1) e CLUE (Item 5.5.2) e a determinação do teor de ácido gálico, corilagina e ácido elágico foram realizados por CLUE.

5.5. Métodos Cromatográficos

5.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para Identificação de Taninos, Flavonoides, Lignanas e Terpenos

5.5.1.1 Extratos Sazonalidade

Os extratos aquosos, etanólicos e acetato de etila: hexano 1:1 (v/v) foram solubilizados, respectivamente, em água: metanol 60: 40 v/v (8,0 mg/mL), etanol (30 mg/mL) e DMSO (10,0 mg/mL) por 30 min em banho de ultrassom, sendo submetidos à análise por CCD utilizando uma série de eluentes e reveladores seletivos para classes de metabólitos secundários.

5.5.1.2 Extratos Diferentes Órgãos

Os extratos aquosos, etanólicos e acetato de etila: hexano 1:1 v/v foram solubilizados, respectivamente, em água: metanol 6:4 v/v (10,0 mg/mL), etanol (10,0 mg/mL) e acetato de etila: hexano 1:1 v/v (5,0 mg/mL), sendo submetidos à análise por CCD.

5.5.1.3 Sistemas Eluentes e Reveladores Cromatográficos

Foram utilizadas cromatoplasacas de alumínio (20 x 20 cm x 0,25 mm ou 10 x 10 cm x 0,25 mm) recobertas por sílica gel 60 F_{254nm}. Os eluentes selecionados foram os que proporcionaram melhor seletividade nas separações cromatográficas,

dentre as diversas condições avaliadas para cada classe de metabólitos secundários; inicialmente, foram escolhidas fases móveis para sílica gel a partir de dados da literatura para as classes de metabólitos, condições estas que na maioria dos casos foram otimizadas para obter-se a seletividade adequada na separação cromatográfica. As amostras foram aplicadas na placa com auxílio de um capilar marcado, visando ser aplicado o mesmo volume das amostras.

Foram utilizados os seguintes sistemas eluentes:

- Flavonoides: acetato de etila: acetona: ácido acético: água 6:2:1:1 v/v (LIONÇO et al., 2001), tolueno: acetato de etila: metanol: ácido acético 5,3: 4,0: 0,5: 0,2 v/v (ANDERSEN, MARKHAM, 2006);
- Lignanas: tolueno: acetona 50:1v/v (ELFAHMI, 2005);
- Taninos: tolueno: acetato de etila: ácido fórmico 2,4:5,6:2,0 v/v (FALKENBERG et al., 2004);
- Terpenos: tolueno: acetato de etila: ácido acético 9,3:0,5:0,2 v/v (KHATOON et al., 2006).

Como reveladores cromatográficos foram usados:

- Anisaldeído sulfúrico: 0,5 mL de anisaldeído foi misturado com 10,0 mL de ácido acético glacial, seguido de 85,0 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem. Após borrifar manteve - se a cromatoplaca 5-10 min em estufa a 110 °C;
- *Natural Products Reagent*/polietilenoglicol (NP/PEG): solução A - solução metanólica a 1% do éster do ácido β-etilamino difenilbórico. Solução B - solução etanólica a 5% de polietilenoglicol 4000. As soluções A e B foram misturadas na proporção 1:1 (v/v).
- Cloreto férrico 3%: 3,0 g de cloreto férrico foram dissolvidos em 100 mL de metanol.

5.5.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (DAD)

5.5.2.1 Transferência do Método Analítico para CLUE-DAD

Baseado em Colombo et al. (2009) e com o auxílio da ferramenta Acquity® UPLC *Columns Calculator, software* de transferência de métodos analíticos, foi realizada a transferência de um método cromatográfico por cromatografia líquida de

alta eficiência (CLAE) para um método por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE).

As condições sugeridas pelo *software* foram testadas com diferentes tipos de colunas cromatográficas e otimizadas com a coluna que apresentou melhor desempenho na separação dos analitos. Encontrada a melhor condição cromatográfica, foram então obtidas curvas analíticas com padrões analíticos de substâncias já descritas na espécie *P. niruri*, sendo eles ácido gálico, ácido elágico (UENO et al., 1988) e corilagina (COLOMBO et al., 2009).

Todas as amostras foram analisadas por CLUE-DAD, sendo que as quantificações foram realizadas pelo software Empower® 3 com base na extrapolação dos valores das áreas dos picos e respectivas concentrações dos analitos na curva analítica (equação da reta) com padrão externo.

5.5.2.2 Preparo de Soluções Padrão

Os padrões analíticos corilagina, ácido gálico foram solubilizados com metanol: água purificada 40:60 v/v; quercetina, rutina e quercitrina foram solubilizados com metanol e ácido elágico foi solubilizado com solução de NaOH 0,1 M. Aproximadamente 3 mL de cada solução foram filtrados por unidade filtrante de PVDF 0,22 µm para *vial*, descartando-se os 2 mL iniciais. As concentrações de cada padrão serão apresentadas no item Resultados e Discussão (6.2).

5.5.2.3 Preparo de Soluções Amostra

Aproximadamente 0,25 g do extrato bruto seco (EBS) foi pesado para balão volumétrico de 100 mL sendo adicionados 60 mL de água purificada e deixado em banho de ultrassom por 30 min. Após este tempo completou-se o volume com metanol. Aproximadamente 3 mL de cada solução foram filtrados por unidade filtrante de PVDF 0,22 µm para *vial*, descartando-se os 2 mL iniciais.

Os extratos sazonais aquosos, etanólicos e acetato de etila: hexano 1:1 (v/v) foram solubilizados, respectivamente, em água: metanol 60:40 v/v (10,0 mg/mL), etanol: água 60:40 v/v (50 mg/mL) e DMSO (8,0 mg/mL) por 30 min em banho de ultrassom. Após este tempo foram diluídos 1,0 mL, 0,10 mL e 1,0 mL, respectivamente, em água: metanol 60:40 v/v (2,0 mg/mL), etanol:água 60:40 v/v (1,0 mg/mL), em água: metanol 60:40 v/v (2,0 mg/mL) para balão de 5 mL.

Aproximadamente 3 mL da solução foram filtrados por unidade filtrante de PVDF 0,22 µm para *vial*, descartando-se os 2 mL iniciais.

Os extratos de diferentes órgãos (aquosos e etanólicos) foram submetidos à pré-tratamento por EFS. Foi utilizado cartucho C18 (500 mg; 6,0 mL; Perkin Elmer[®]) previamente ativado com 8,0 mL de metanol e condicionado com 8,0 mL do eluente 1.

A EFS com os extratos aquosos foi desenvolvida como segue:

1º Ativação da fase estacionária: 8,0 mL de metanol;

2º Condicionamento da fase estacionária: 8,0 mL do eluente 1 (metanol: água 1:1, v/v);

3º Aplicação da amostra: 1,0 mL da amostra em solução (10 mg/mL; metanol: água 1:1, v/v); eluição recolhendo em frasco tarado (frasco 1).

4º Eluição com eluente 1 (metanol: água 1:1, v/v): 4,0 mL, recolhendo no frasco 1.

5º Eluição com eluente 2 (metanol: água 95:05, v/v.): 5,0 mL, recolhendo no frasco 1.

A EFS com os extratos etanólicos foi desenvolvida como segue:

1º Ativação da fase estacionária: 8,0 mL de metanol.

2º Condicionamento da fase estacionária: 8,0 mL do eluente (metanol: água 95:05, v/v).

3º Aplicação da amostra: 1,0 mL da amostra em solução (5 mg/mL; metanol: água 95:05, v/v), eluição recolhendo em frasco tarado.

4º Eluição: 4,0 mL do eluente, recolhendo no mesmo frasco do item anterior.

Após a extração em fase sólida as amostras foram secas em capela sob fluxo de ar e, em seguida, em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida até massa constante. Os extratos aquosos e etanólicos de diferentes órgãos após o *clean up* e posterior secagem em estufa foram solubilizados com 5,0 mL e 4,0 mL de metanol: água (60:40) respectivamente, e deixados em banho de ultrassom por 30 min. Aproximadamente 3 mL da solução foram filtrados por unidade filtrante de PVDF 0,22 µm para *vial*, descartando-se os 2 mL iniciais.

Todas as amostras foram injetadas em CLUE e os resultados foram expressos em teor (% m/m) de ácido gálico, corilagina e ácido elágico, por meio da média de três determinações.

5.5.2.4 Desenvolvimento do Preparo de Amostra Droga Vegetal

O preparo da amostra droga vegetal precisou ser desenvolvido para garantir a melhor condição de extração dos marcadores padronizados no método transferido.

Aproximadamente 0,5 g da droga vegetal moída foi pesada e transferida para erlenmeyer de 125 mL sendo adicionados 50 mL do solvente de extração. A amostra foi extraída em banho-maria a 60 °C sob refluxo por 30 min. Após o tempo de extração e ao atingir a temperatura ambiente a amostra foi filtrada por papel de filtro para balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com a solução extratora. Aproximadamente 3 mL da solução foi filtrada por unidade filtrante de 0,22 µm para *vial*, descartando-se os 2 mL iniciais.

Como solução extratora foram testadas várias proporções da combinação dos solventes água purificada e metanol, as quais serão apresentadas no item Resultados e Discussão (6.3).

5.6 Determinação de Filantina na Droga Vegetal e Extrato Bruto Seco

A determinação de filantina na droga vegetal (DV) e no extrato bruto seco (EBS) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) foi realizada segundo método adaptado de Murugaiyah e Chan (2006; 2007). No método original a coluna cromatográfica utilizada é a Inertsil ODS-3 250 x 4,6 mm x 5 µm e foi substituída pela Hypersil ODS-2 150 x 4,6 mm x 5 µm. Outra alteração realizada foi a mudança da temperatura da coluna de 25 °C para 30°C. As demais condições cromatográficas foram: fase móvel acetonitrila: água purificada (55:45 v/v), eluição isocrática, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 230 nm.

A quantificação foi realizada utilizando-se filantina como padrão externo. A filantina foi solubilizada em metanol e diluída para as concentrações da curva analítica, as quais são apresentadas na discussão dos resultados (6.6). Aproximadamente 3 mL de cada solução foi filtrada por unidade filtrante de PVDF 0,22 µm para *vial*, descartando-se os 2 mL iniciais.

Aproximadamente 1,25 g da droga vegetal (DV) foi pesada em erlenmeyer de 125 mL e extraída com 100,0 mL (divididos igualmente em 4 etapas de extração) de metanol em banho de ultrassom à temperatura ambiente em 4 etapas de 20 min cada. Após cada etapa, as soluções extrativas foram separadas do material vegetal

por filtração em algodão e reunidas em balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com metanol. Aproximadamente 3 mL da solução foram filtrados por unidade filtrante de PVDF 0,22 μm para *vial*, descartando-se os 2 mL iniciais.

Aproximadamente 1,0 g do extrato bruto seco (EBS) foi pesado em erlenmeyer de 125 mL sendo adicionados 10 mL de água purificada e deixado em banho de ultrassom por 15 min para solubilização. Após este tempo foram adicionados 30 mL de metanol e deixou-se em banho-maria a 60 °C sob refluxo por 30 min. Após, resfriou-se até temperatura ambiente transferindo essa solução para balão volumétrico de 50 mL. Completou-se o volume com metanol. Aproximadamente 3 mL da solução foram filtrados por unidade filtrante de PVDF 0,22 μm para *vial*, descartando-se os 2 mL iniciais.

5.7 Determinação do Teor de Flavonoides Totais no Extrato Bruto Seco e Frações Obtidas por Partição Líquido-Líquido

A determinação do teor de flavonoides totais no extrato bruto seco (EBS) e nas frações aquosa (FA), emulsão (FE) e n-butanol (FNB) – obtidas por partição líquido-líquido - por meio de espectrofotometria no visível, foi realizada utilizando uma adaptação do procedimento A apresentado por Yu et al. (2012), este que por sua vez é uma adaptação de Woisky e Salatino (1998) e Chang et al. (2002). No procedimento apresentado por Yu et al. (2012), um dos reagentes utilizados é o acetato de potássio, que aqui, foi substituído pelo acetato de sódio, tendo sido feito os cálculos para manter constante o número de moles de acetato no experimento. A outra diferença foi ter completado o volume para 5,0 mL com etanol 95%, ao invés de água deionizada, como cita o artigo. As leituras foram realizadas em triplicata. Foram pesados 25,0 mg de cada extrato e diluídos em 5,0 mL de etanol 95%. Deste volume foi tomado 0,125 mL e homogeneizado com 3,0 mL de etanol 95%. Posteriormente, foram adicionados 0,2 mL de cloreto de alumínio (AlCl_3) 10% em água e 0,2 mL de solução aquosa de acetato de sódio 1 M. O volume foi completado com etanol 95% para 10,0 mL. As soluções resultantes foram agitadas e mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após 30 min foram realizadas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro em 415 nm, utilizando cubeta de quartzo de 1 cm. A concentração final de cada extrato foi de 62,5 mg/L. O branco foi preparado seguindo o mesmo procedimento usado para as amostras, porém, ao invés de adicionar inicialmente 0,125 mL de amostra, foi adicionado 0,125 mL de etanol 95%.

A curva analítica foi obtida a partir das leituras de absorvância de soluções de quercetina (etanol 95%) com concentrações finais de 0,3125, 0,625, 1,25, 2,50 e 5,00 mg/L, preparadas segundo o procedimento descrito para os extratos, ou seja, adicionando-se 0,125 mL de soluções de quercetina com concentrações adequadas para obter-se as concentrações finais citadas.

5.8 Avaliação da Ação do Extrato Bruto Seco e das Frações Obtidas por Partição Líquido-Líquido de *P. niruri* Sobre a Cristalização de Oxalato de Cálcio *in vitro*

O extrato bruto seco (EBS) e as frações aquosa (FA), emulsão (FE) e n-butano (FNB) obtidas por partição líquido-líquido foram enviadas para o Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para serem testados segundo modelo *in vitro* de indução da cristalização de oxalato de cálcio (CaOx), segundo Barros et al. (2003), pela a aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFGD, Letícia Ayran Medina Yabunaka, sob orientação do professor Dr. Márcio Eduardo de Barros e co-orientação da professora Dra. Mirian Aparecida Boim. Também foram avaliados no ensaio o ácido gálico e a quercetina. A fração hexano-acetato de etila (FHAE) não pode ser testada devido a pequena quantidade obtida.

O método (Barros et al., 2003) consiste em induzir a precipitação de oxalato de sódio por meio da adição de 40 µL da solução de oxalato de sódio 0,1 M para cada mL de urina de humanos normais, a cada 30 min durante 2 h, sob agitação constante a temperatura de 37 °C. Cada amostra de urina é então dividida em duas alíquotas, sendo que uma alíquota é usada como controle (cristalização sem adição de extrato ou frações de *P. niruri*) e na outra, amostra teste, foram adicionadas diferentes concentrações (0,05, 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0 mg/mL) do extrato ou das frações de *P. niruri*, e dos padrões quercetina e ácido gálico, respectivamente, previamente filtradas em filtro 0,22 µm, 30 min antes da indução da precipitação.

O protocolo para este ensaio foi aprovado no comitê de ética da Universidade Federal da Grande Dourados, sob o protocolo número 197.530.

5.9 Análise Estatística

Os dados da sazonalidade e dos diferentes órgãos foram analisados com programa estatístico usando análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste de

Tukey (MORAES; DE SOUSA, 2007) por meio do *software* GraphPad Prism[®] versão 3, sendo que valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

A análise de correlação de Pearson (SANTOS et al., 2011) foi realizada por meio do *software* GraphPad Prism[®] versão 3, sendo que valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

Os dados do ensaio da avaliação da ação sobre a cristalização de oxalato de cálcio *in vitro* foram analisados com *software* GraphPad InStat 3[®], sendo que valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

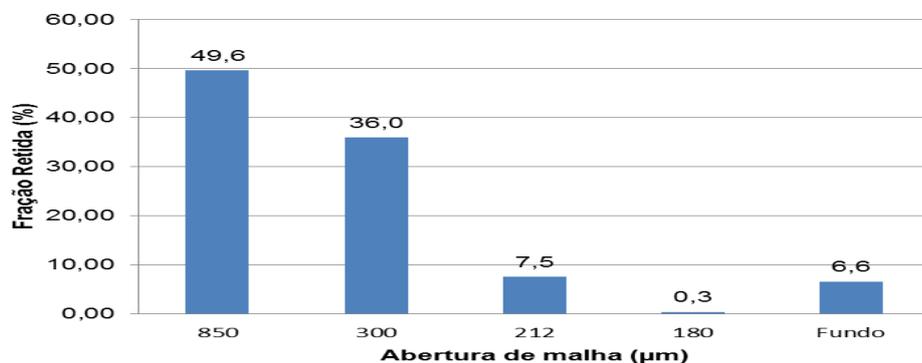
6.1. Controle de Qualidade da Droga Vegetal e Extrato Aquoso

6.1.1 Determinação de Granulometria da Droga Vegetal Utilizada na Obtenção do Extrato Bruto Seco

A avaliação granulométrica é um parâmetro importante pois representa influência direta sobre a eficiência no processo extrativo. Quando a droga moída tem diâmetro médio de partícula muito pequeno (menor que 0,2 mm) ocorre comprometimento da filtração. Da mesma forma, o diâmetro médio de partícula acima de 0,8 mm pode prejudicar a extração, não permitindo a penetração do líquido extrator em todas as células (ALBERTON et al., 2001; MICHELIN et al., 2010).

A determinação da granulometria da droga vegetal, partes aéreas de *P. niruri*, coletada no CPQBA – UNICAMP e utilizada na produção de extrato seco bruto (EBS) está abaixo representada através da porcentagem da massa retida em cada tamis (média de três determinações).

Gráfico 1 Distribuição granulométrica da droga vegetal – partes aéreas de *P. niruri*



A maior porcentagem, aproximadamente 50%, da droga vegetal moída apresenta tamanho de partícula acima de 850 µm, devido à presença do caule. Markom et al (2007) encontrou resultado semelhante para a análise da

granulometria de caule e partes aéreas de *P. niruri*, sendo que 43% apresentou tamanho de partícula entre 600 µm e 1,18 mm.

6.1.2 Determinação de Água em Drogas Vegetais – Método Gravimétrico

De acordo com Farias (2004), o excesso de água em drogas vegetais possibilita a ação de enzimas, além de propiciar o desenvolvimento de fungos e bactérias.

O resultado da determinação da água na droga vegetal, partes aéreas de *P. niruri*, utilizada na produção de extrato bruto seco (EBS), representada em porcentagem de água como média de três determinações foi de $9,45 \pm 0,06\%$. A perda avaliada por este método também inclui substâncias voláteis, mas cabe ressaltar que a espécie vegetal não apresenta óleo essencial.

Já as determinações de água nas amostras de droga vegetal da avaliação da sazonalidade estão representadas na tabela 2.

Tabela 2 Determinação de água: perfil sazonal de *P. niruri*

Mês/Ano	Água (%)
Fevereiro/2012	$9,23 \pm 0,40$
Março/2012	$7,89 \pm 0,37$
Abril/2012	$7,68 \pm 0,24$
Maio/2012	$8,91 \pm 0,01$
Junho/2012	$8,48 \pm 0,34$
Julho/2012	$8,25 \pm 0,09$
Agosto/2012	$8,55 \pm 0,17$
Setembro/2012	$8,86 \pm 0,25$
Outubro/2012	$8,94 \pm 0,10$
Novembro/2012	$8,80 \pm 0,11$
Dezembro/2012	$9,05 \pm 0,27$
Janeiro/2013	$8,10 \pm 0,11$
Média	$8,57 \pm 0,47$

A droga vegetal coletada no mês de Abril/2012 apresentou menor porcentagem de água e a de Fevereiro/2012 a maior porcentagem de água.

Os resultados encontrados estão próximos aos obtidos por Figueira e colaboradores (2004) em estudo de determinação do ponto de secagem adequado para manter a qualidade no armazenamento de *P. niruri* por meio de isotermas de

sorção, sendo 8,9% a porcentagem de umidade de equilíbrio encontrada pelos autores.

Borges et al. (2005) que também utilizaram o método de determinação de água em drogas vegetais descrito na Farmacopeia Brasileira para outra espécie vegetais, obtiveram $7,19 \pm 0,24\%$ para folhas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek) e $10,58 \pm 0,26\%$ para partes aéreas de maracujá (*Passiflora alata* Curtis).

A partir da determinação de água na droga vegetal é possível calcular o rendimento da extração.

6.1.3 Determinação da Perda por Dessecação no Extrato Bruto Seco - Método Gravimétrico

A perda por dessecação por gravimetria foi realizada no extrato bruto seco (EBS) para determinação do conteúdo de água e substâncias voláteis. O resultado encontrado em porcentagem de perda por dessecação como média de três determinações foi de $9,06 \pm 0,35\%$. A partir da perda por dessecação no extrato bruto seco é possível calcular o rendimento da extração.

6.1.4 Determinação do Teor de Taninos Totais na Droga Vegetal e no Extrato Bruto Seco

Os resultados de porcentagem (m/m) de teor de fenólicos totais e taninos totais como média de três determinações, considerando a porcentagem de água no cálculo, estão apresentados na tabela 3 abaixo:

Tabela 3 Determinação de Polifenóis Totais e Taninos Totais em *P. niruri*.

Amostra	Fenólicos Totais (% m/m)	Taninos Totais (% m/m)
Droga vegetal (DV)	$19,72 \pm 0,12$	$12,92 \pm 0,06$
Extrato bruto seco (EBS)	$48,43 \pm 1,31$	$26,44 \pm 0,27$

O teor de taninos totais da droga vegetal (12,9%) apresentou-se dentro do especificado na monografia de *P. niruri* presente na Farmacopeia Brasileira, cujo valor é de no mínimo 6,5% (BRASIL, 2010d).

Não há dados na literatura sobre a quantificação de taninos totais em *P. niruri* utilizando doseamento espectrofotométrico em 715 nm e padrão pirogalol, com exceção da Farmacopeia Brasileira 5ª edição. O teor de 48,4% m/m e 26,4% m/m de

fenólicos totais e taninos totais, respectivamente no extrato bruto seco (EBS) pode ser relacionados com dados de fenólicos totais encontrados na literatura. É descrito por Amir et al. (2002), o teor de 37,6% m/m (376 mg/g) de fenólicos totais calculados como ácido gálico para extrato aquoso 5% p/v da planta inteira de *P. niruri*. Harish e Shivanandappa (2006) realizando quantificação em extratos aquosos liofilizados 12,5% p/v de folhas e frutos de *P. niruri*, encontraram 9,74% m/m (97,4 mg/g) e 36,0% m/m (360,0 mg/g) de fenólicos totais quantificados como guaiacol. Já Sabir e Rocha (2008), obtiveram 10,8-11,1% m/m de fenólicos totais quantificados como ácido gálico em extrato aquoso 10% p/v de folhas de *P. niruri*.

6.2. Desenvolvimento de Método Analítico

6.2.1 Transferência de Método Analítico de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

Colombo et al. (2009) desenvolveram um método cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado a detector de arranjo de diodos (DAD) utilizando como fase móvel um sistema gradiente de ácido acético 1,0% e acetonitrila, o qual foi utilizado para a padronização de droga vegetal e extrato comercial de *P. niruri*

Com o intuito de tornar as análises cromatográficas da droga vegetal, bem como dos extratos, mais rápida, com menor consumo de solventes e consequentemente menor custo análise/produto e menor impacto ambiental, o método analítico foi transferido para a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a arranjo de diodos (CLUE-DAD).

As condições cromatográficas descritas por Colombo et al. (2009) e as dimensões das colunas cromatográficas foram lançadas no *software* Acquity UPLC[®] *Columns Calculator* (Figura 4) e este apresentou algumas condições cromatográficas para CLUE (Figura 5).

ACQUITY UPLC Columns Calculator - Quebra pedra condição cromatográfica.cc *

File Edit Help

Analytical Factors

Isocratic Gradient

Molecular Weight: 301-500 Da Column Temperature: 25 °C

Calculate

HPLC (Binary) From HPLC To UPLC UPLC (QSM)

From HPLC CV = 2.742 mL L/dp = 50,000

Column Length (L): 250 mm

Column Diameter: 4.6 mm

Particle Diameter (dp): 5 µm

Injection Volume: 20.0 µL

Dwell Volume: 0.65 mL

To UPLC CV = 0.229 mL L/dp = 58,824

Column Length (L): 100 mm

Column Diameter: 2.1 mm

Particle Diameter (dp): 1.7 µm

Maximum Pressure: 14997 psi

Dwell Volume: 0.400 mL

Organic Mix

Acetonitrile: 100.0 % Methanol: 0.0 %

Original Gradient

1493 psi

	Time (min)	Flow (mL/min)	%A (Aqueous)	%B (Organic)	Column Volumes
1	Initial	1.00	87.0	13.0	--
2	12.00	1.00	63.0	37.0	4.38

Figura 4 Software Acquity® UPLC columns calculator - dados de entrada.

Gradient Results - Quebra pedra condição cromatográfica.cc

Column	Run Time (min)	Peak Capacity	Flow Rate (mL/min)	Pressure (psi)	Injection Volume (µL)
Original HPLC column conditions					
250 mm x 4.6 mm, 5.0 µm	30.00	163	1.000	1493	20.0
New UPLC conditions with scaled gradient (accounting for particle size)					
100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm	4.08	172	0.613	16134	1.7
New UPLC conditions with scaled gradient (disregarding particle size)					
100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm	12.00	197	0.208	5486	1.7

Show additional options Show more UPLC columns Copy Gradient

New UPLC Gradient Use pre-injector volume = 346 µL

New UPLC conditions with scaled gradient (disregarding particle size), 100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm column

	Time (min)	Flow (mL/min)	%A (Aqueous)	%B (Acetonitrile)	%C (Methanol)	%D (Other)	Column Volumes
1	Initial	0.208	87.0	13.0	0.0	0.0	--
2	4.80	0.208	63.0	37.0	0.0	0.0	4.38
3	5.20	0.208	0.0	100.0	0.0	0.0	0.36
4	6.00	0.208	0.0	100.0	0.0	0.0	0.73
5	6.40	0.208	87.0	13.0	0.0	0.0	0.36
6	12.00	0.208	87.0	13.0	0.0	0.0	5.11

Figura 5 Software Acquity® UPLC columns calculator - dados de saída.

As condições cromatográficas descrita por Colombo et al. (2009) estão apresentada na tabela 4.

Tabela 4 Condições cromatográficas segundo Colombo et al. (2009).

Coluna	Luna Fenil Hexil 250 x 4,6 mm, 5 µm	
Pré-coluna	Luna Fenil Hexil 4 x 3 mm, 5 µm	
Temperatura coluna	25 °C	
Vazão	1,0 mL/min	
Volume de injeção	20 µL	
Detecção	267 nm	
Gradiente		
Tempo (min)	A % (Ácido acético 1,0 %)	B % (Acetonitrila)
0	87	13
12	63	37
13	0	100
15	0	100
16	87	13
30	87	13

As condições cromatográficas inicialmente sugeridas pelo software Acquity® UPLC *Columns Calculator* estão apresentadas nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 Condições cromatográficas sugeridas pelo software Acquity® UPLC columns calculator desconsiderando o tamanho da partícula.

Coluna	100 x 2,1 mm, 1,7 µm	
Temperatura coluna	25 °C	
Vazão	0,208 mLmin	
Volume de pré-injeção	0,346 mL	
Volume de injeção	1,7 µL	
Detecção	267 nm	
Gradiente		
Tempo (min)	A % (Ácido Acético 1,0%)	B % (Acetonitrila)
0	87	13
4,8	63	37
5,2	0	100
6,0	0	100
6,4	87	13
12	87	13

Tabela 6 Condições cromatográficas sugerida pelo *software Acquity® UPLC columns calculator* considerando o tamanho da partícula.

Coluna	100 x 2,1 mm, 1,7 µm	
Temperatura coluna	2 5°C	
Vazão	0,613 mL/min	
Volume de pré-injeção	0,346 mL	
Volume de injeção	1,7 µL	
Detecção	267 nm	
Gradiente		
Tempo (min)	A % (Ácido Acético 1,0%)	B % (Acetonitrila)
0	87	13
0,71	63	37
0,87	0	100
1,63	0	100
2,04	87	13
4,08	87	13

Com o intuito de preservar o perfil cromatográfico quando um método cromatográfico é transferido de CLAE para CLUE é necessário considerar o *dwell volume*, ou seja, o volume do sistema de mistura de fase móvel e tubulações entre os dois sistemas. O software *Acquity® UPLC Columns Calculator* automaticamente ajusta o tempo do gradiente baseado nessa diferença de volume.

O parâmetro volume de pré-injeção habilita o gradiente a iniciar antes que a injeção seja desencadeada, dessa forma mantém constante o *dwell volume* para a proporção de volume de coluna em ambos os sistemas (WATERS CORPORATION, 2010).

As condições propostas foram testadas utilizando-se a coluna *Acquity® BEH* fenil (100 x 2,1 mm; 1,7 µm) injetando-se o padrão corilagina na concentração de 0,095 mg/mL e o extrato bruto seco (EBS) na concentração de 4,8 mg/mL solubilizados em metanol: água purificada 40:60 (v/v) para avaliação dos parâmetros cromatográficos como tempo de retenção (t_r), resolução (R_s), pratos teóricos (N) e seletividade (α). As variações realizadas envolveram vazão de fase móvel, volume de pré-injeção, tempo de análise e fase móvel. As alterações realizadas estão descritas na tabela 7.

O monitoramento foi realizado entre 200 e 400 nm, porém os cromatogramas foram processados em 267 nm para todos os testes, segundo descrito em Colombo et al. (2009). O volume de injeção de 1,7 μL e a temperatura da coluna em 25 $^{\circ}\text{C}$ também foram mantidos iguais para todos os testes.

Tabela 7 Coluna BEH - condições cromatográficas testes 1 a 6.

Testes	Condições cromatográficas		
	Vazão (mL/min)	Pré-injeção (mL)	Tempo de corrida (min)
T1.BEH	0,208	0,346	12
T2.BEH	0,208	0,346	12
T3.BEH	0,500	0,346	4,08
T4.BEH	0,500	0,346	4,08
T5.BEH	0,300	0	4,08
T6.BEH	0,300	0	4,08

Os parâmetros avaliados nos testes com a coluna Acquity Fenil BEH estão demonstrados na tabela 8.

Tabela 8 Coluna BEH - Parâmetros cromatográficos avaliados.

Parâmetros Cromatográficas	Testes					
	T1.BEH	T2.BEH	T3.BEH	T4.BEH	T5.BEH	T6.BEH
$t_r^{(1)}$	2,5	2,4	0,8	0,8	1,3	2,1
$R_s^{(2)}$	1,7	3,0	1,7	1,2	3,8	3,3
N	26875	15429	36044	36058	12961	8979
$\alpha^{(3)}$	1,1	1,2	1,1	1,0	1,5	1,4

(1) Tempo de retenção da corilagina

(2) Resolução entre o pico da corilagina e o pico imediatamente anterior.

(3) Seletividade entre o pico da corilagina e o pico imediatamente anterior

Apesar do marcador corilagina, apresentar maior retenção nos testes T1.BEH, T2.BEH e T6.BEH, os testes realizados com a coluna Acquity Fenil BEH não foram satisfatórios para a resolução dos demais picos presentes no EBS, como pode ser visto nos cromatogramas anexos (Figura 53).

Dessa forma, foram realizados testes com a coluna Acquity[®] HSS T3, a qual é empacotada com sílica contendo grupo alquil C18 trifuncional, que aumenta a retenção de compostos polares (VRHOVSEK et al., 2012).

As condições cromatográficas apresentadas nas tabelas 6 e 7 foram testadas na coluna Acquity® C18 HSS T3 (100 x 2,1 mm; 1,8 µm) injetando-se o padrão corilagina na concentração de 0,078 mg/mL e o extrato bruto seco (EBS) na concentração de 5,6 mg/mL solubilizados em metanol: água purificada 40: 60 (v/v) para avaliação dos parâmetros cromatográficos como tempo de retenção (t_r), resolução (R_s), pratos teóricos (N) e seletividade (α). As otimizações realizadas estão descritas na tabela 9.

O monitoramento foi realizado entre 200 e 400 nm, porém os cromatogramas foram processados em 267 nm para todos os testes, segundo descrito em Colombo et al. (2009), o volume de pré-injeção de 0,346 mL e o volume de injeção de 1,7 µL também foram mantidos iguais para todos os testes.

Tabela 9 Coluna HSS T3 - condições cromatográficas testes T1 a T14.

Testes	Condições cromatográficas			
	Temperatura coluna (°C)	Vazão (mL/min)	FM	Tempo de corrida (min)
T1.HSST3	25	0,208	CH ₃ COOH 0,1% ACN	12
T2.HSST3	25	0,208	CH ₃ COOH 1,0% ACN	12
T3.HSST3	25	0,500	CH ₃ COOH 0,1% ACN	4,08
T4.HSST3	25	0,500	CH ₃ COOH 1,0% ACN	4,08
T5.HSST3	25	0,300	CH ₃ COOH 0,1% ACN	4,08
T6.HSST3	25	0,300	CH ₃ COOH 1,0% ACN	4,08
T7.HSST3	25	0,208	CH ₃ COOH 0,1% ACN	7,5
T8.HSST3	25	0,208	CH ₃ COOH 1,0% ACN	7,5
T9.HSST3	30	0,208	CH ₃ COOH 0,1% ACN	12
T10.HSST3	30	0,208	CH ₃ COOH 1,0% ACN	12
T11.HSST3	30	0,150	CH ₃ COOH 0,1%	12

ACN				
T12.HSST3	30	0,150	CH ₃ COOH 1,0% ACN	12
T13.HSST3	35	0,150	CH ₃ COOH 0,1% ACN	12
T14.HSST3	35	0,150	CH ₃ COOH 1,0% ACN	12

Os parâmetros avaliados nos testes com a coluna Acquity HSS T3 estão demonstrados na tabela 10.

Tabela 10 Coluna HSS T3 - Parâmetros cromatográficos avaliados em relação à corilagina.

Testes	Parâmetros cromatográficos			
	$t_r^{(1)}$	$R_s^{(2)}$	N	$\alpha^{(3)}$
T1.HSST3	2,9	5,3	56379	1,2
T2.HSST3	2,8	1,9	47223	1,1
T3.HSST3	0,9	1,8	31588	1,1
T4.HSST3	0,9	3,9	33719	1,2
T5.HSST3	2,5	4,0	159146	1,1
T6.HSST3	2,4	1,9	140388	1,0
T7.HSST3	2,8	4,4	59272	1,1
T8.HSST3	2,6	2,1	49857	1,1
T9.HSST3	2,7	4,5	58528	1,2
T10.HSST3	2,5	2,2	49094	1,1
T11.HSST3	3,4	3,6	60447	1,1
T12.HSST3	3,3	1,5	56451	1,0
T13.HSST3	3,3	3,5	59451	1,1
T14.HSST3	3,2	1,5	55432	1,0

(1) Tempo de retenção da corilagina

(2) Resolução entre o pico da corilagina e o pico imediatamente anterior.

(3) Seletividade entre o pico da corilagina e o pico imediatamente anterior

Por meio da avaliação dos cromatogramas obtidos (vide anexo Figura 54) e de seus respectivos parâmetros cromatográficos foi possível verificar que, embora o teste T1.HSST3 tenha apresentado a maior resolução ($R_s = 5,3$) entre a corilagina e o pico anterior a ela, o teste T11.HSST3 (Figura 6) apresentou maior tempo de retenção do marcador corilagina ($t_r = 3,4$ min) dentre todos os testes realizados, bem

como melhor resolução ($R_s = 3,6$) entre a corilagina e o pico anterior a ela no EBS quando comparado com os testes T12.HSST3 a T14.HSST3. Dessa forma, a condição cromatográfica do teste T11.HSST3 atende o critério de resolução adequada e foi elencada para a realização das análises por CLUE-DAD.

Realizando a varredura de 200 a 400 nm em arranjo de diodos pode-se confirmar que o comprimento de onda em 267 nm é o mais adequado para a extração do cromatograma (Figura 6), pois a corilagina apresenta banda com absorção máxima neste comprimento de onda.

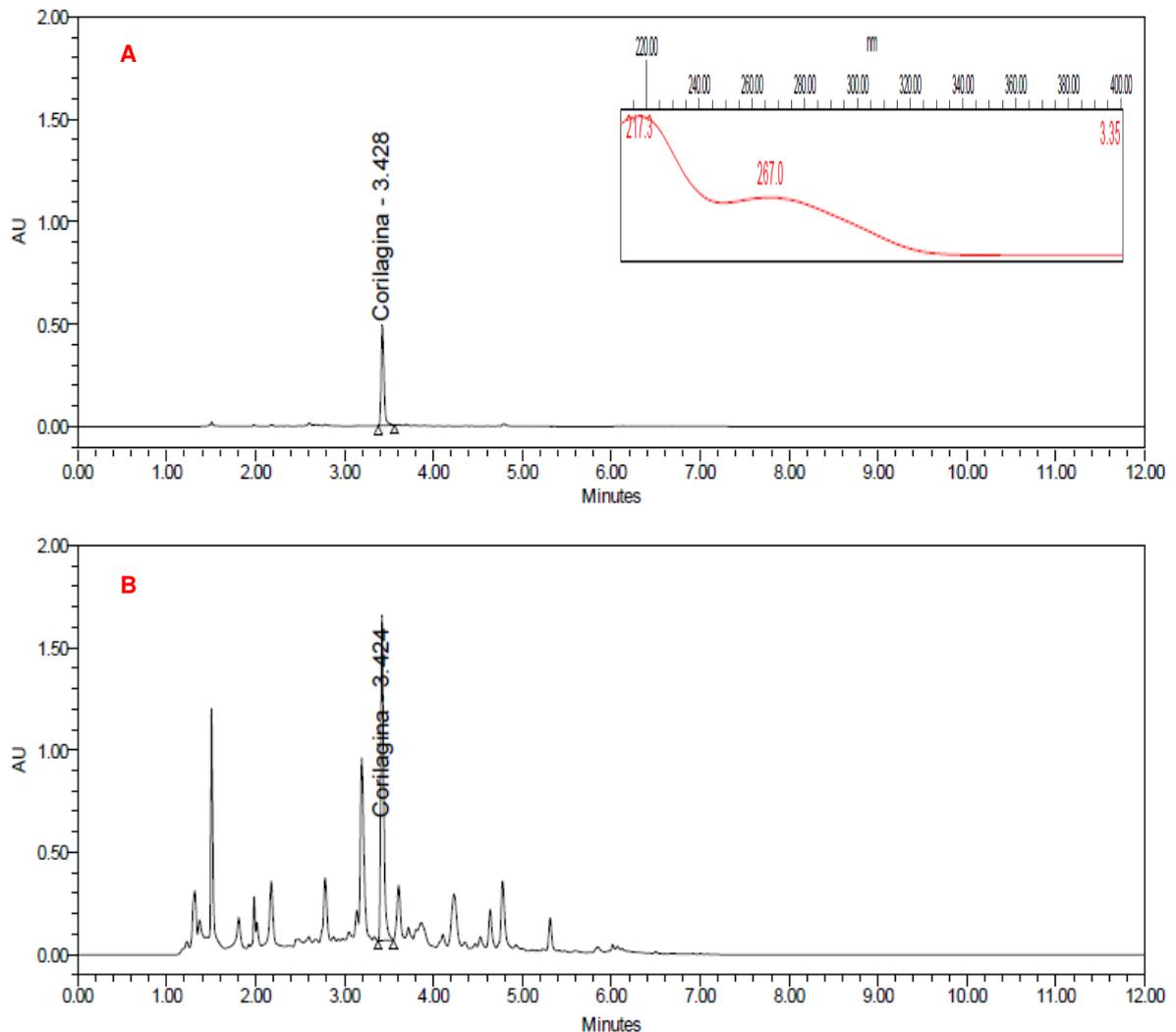


Figura 6 Cromatogramas Corilagina (A) e EBS (B) – condição T11.HSST3.

Como após o tempo de 7 min não se observa nenhum pico, e aos 6,4 min o gradiente inicia o retorno a sua condição inicial, o tempo de análise foi reduzido de 12 para 8 min sem prejuízo dos parâmetros cromatográficos e resolução dos picos.

Abaixo (tabela 11) segue a descrição da condição cromatográfica transferida de CLAE-DAD para CLUE-DAD.

Tabela 11 Método analítico transferido de CLAE-DAD para CLUE-DAD.

Coluna	Acquity® C18 HSS T3 100 x 2,1 mm, 1,8 µm
Temperatura coluna	30 °C
Temperatura amostrador	25 °C
Vazão	0,150 mL/min
Volume de pré-injeção	0,346 mL
Volume de injeção	1,7 µL
Detecção	267 nm

Gradiente		
Tempo (min)	FM A % (Ácido acético 0,1 %)	FM B % (Acetonitrila)
0	87	13
4,8	63	37
5,2	0	100
6,0	0	100
6,4	87	13
8	87	13

Em trabalho realizado para a avaliação do perfil químico de extratos produzidos por extração com fluido supercrítico, utilizando etanol 50% e 70% como co-solvente, foi possível a detecção de flavonoides como quercetina e rutina (Markom et al., 2011).

Na tentativa de identificar os demais picos existentes no extrato bruto seco (EBS) foi realizada a comparação deste com metabólitos secundários descritos na literatura em *P. niruri*

Foi realizada a identificação em EBS por meio da comparação dos t_R e espectro de absorção no UV dos picos dos cromatogramas (200 - 400 nm) dos padrões analíticos corilagina (0,062 mg/mL), ácido gálico (0,115 mg/mL), ácido elágico (0,101 mg/mL), rutina (0,121 mg/mL), quercetina (0,143 mg/mL), quercitrina (0,061 mg/mL) com picos no cromatograma da solução de EBS (8,040 mg/mL).

Na tabela 12 são apresentados os valores de t_R dos padrões analíticos e de picos no cromatograma de EBS.

Tabela 12 Identificação de metabólitos secundários.

Marcadores	Tempo de retenção (min)	
	Padrões analíticos	EBS
Ácido gálico	2,161	2,149
Corilagina	3,346	3,363
Ácido elágico	4,720	4,694
Rutina	4,282	ND
Quercetina	6,279	ND
Quercitrina	5,227	5,225

ND – Não Detectado

Pode-se observar que os valores de t_R do ácido gálico, ácido elágico, corilagina e quercitrina são muito semelhantes na solução padrão e na solução EBS, indicando que estes marcadores estão presentes no extrato seco. Não foi observado no EBS nenhum pico com t_R próximo ao da quercetina e da rutina.

Nas figuras 7 a 14 estão representados os cromatogramas e respectivos espectros de absorção no UV dos picos dos padrões corilagina (0,062 mg/mL), ácido gálico (0,115 mg/mL), ácido elágico (0,007 mg/mL), quercetina (0,143 mg/mL), quercitrina (0,061 mg/mL) e rutina (0,121 mg/mL), bem como da solução EBS (8,04 mg/mL).

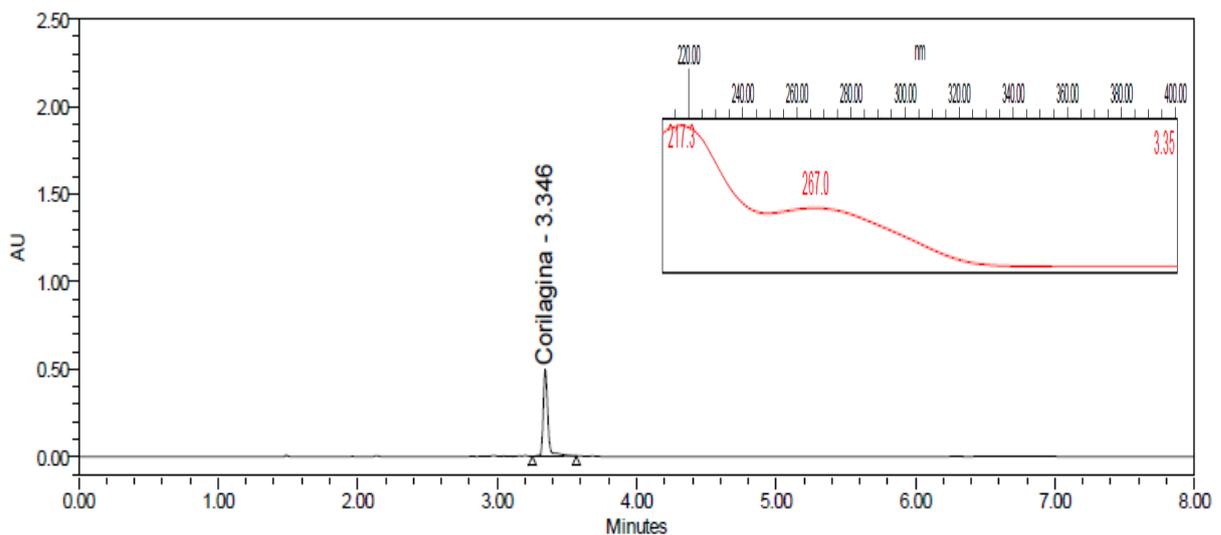


Figura 7 Cromatograma e espectro no UV: corilagina.

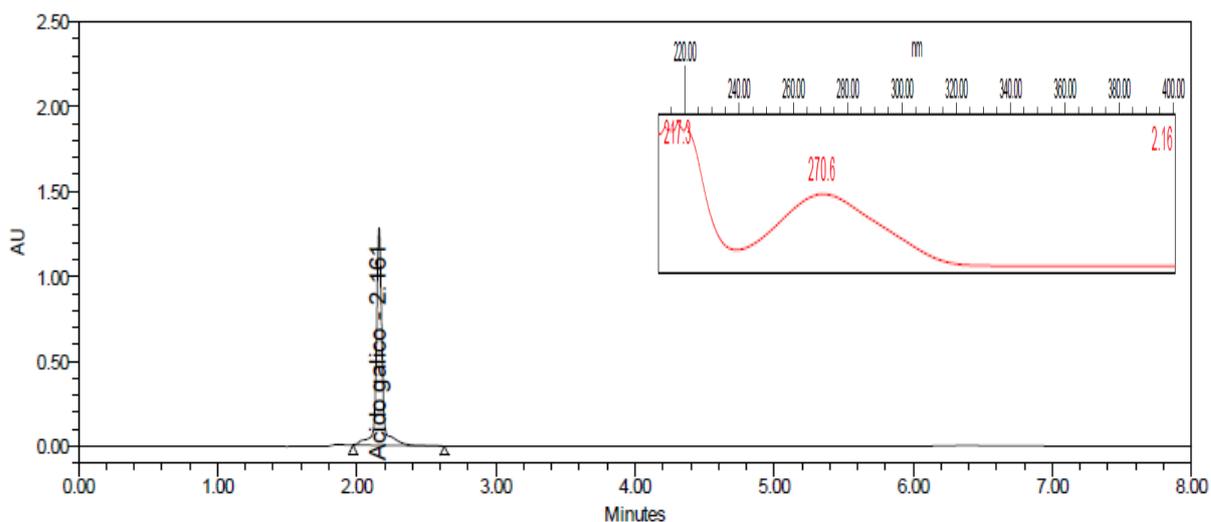


Figura 8 Cromatograma e espectro no UV: ácido gálico.

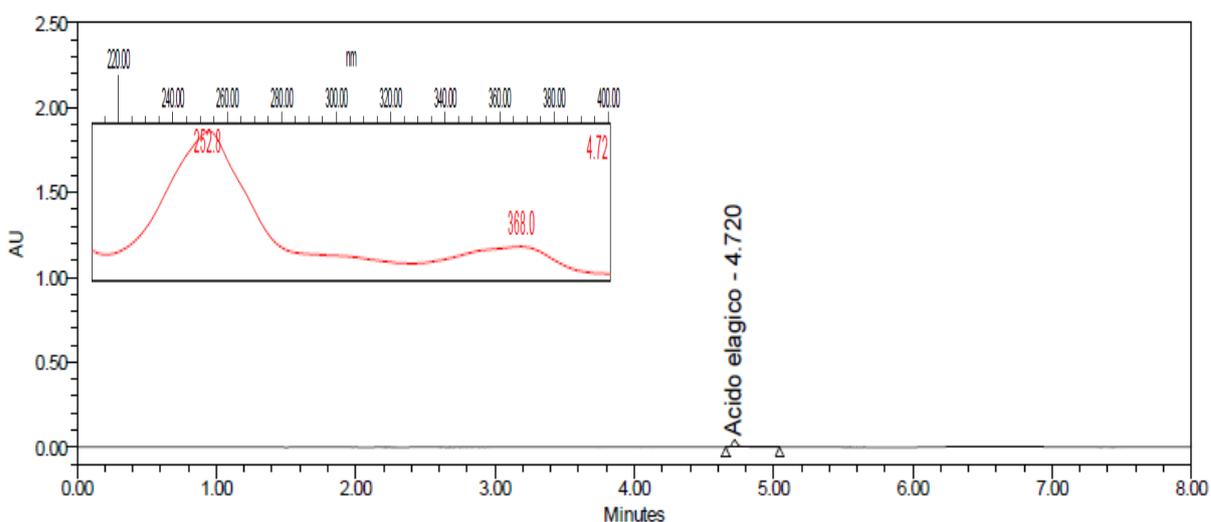


Figura 9 Cromatograma e espectro no UV: ácido elágico.

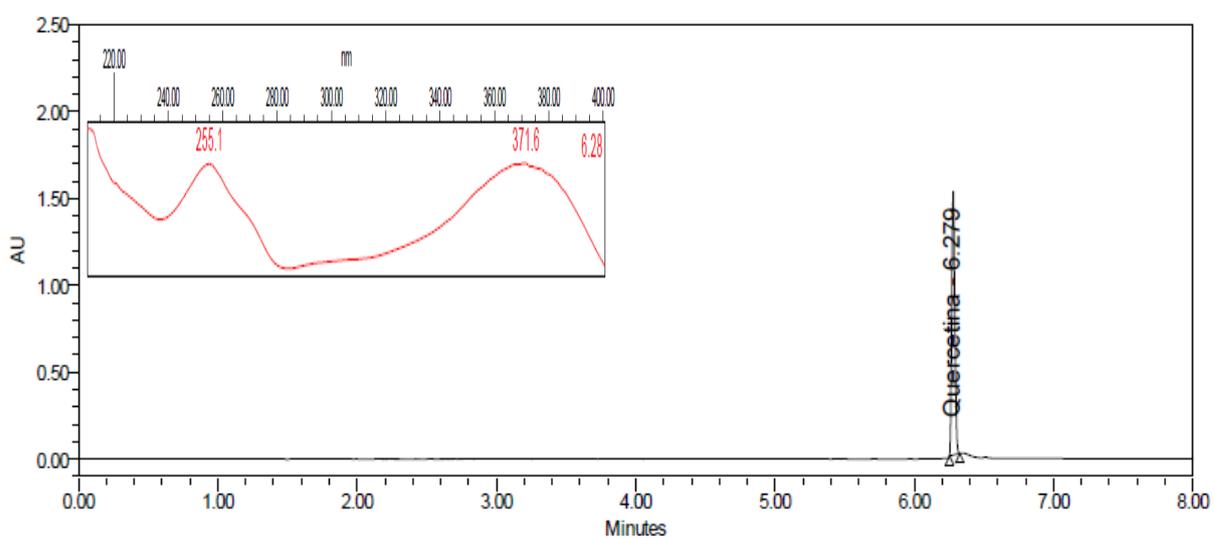


Figura 10 Cromatograma e espectro no UV: quercetina.

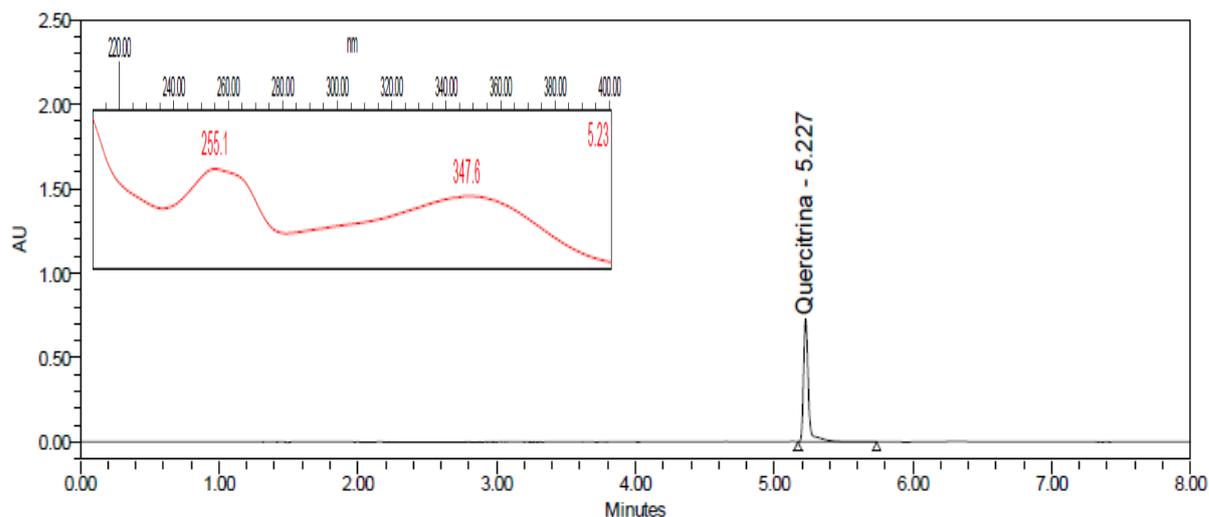


Figura 11 Cromatograma e espectro no UV: quercitrina.

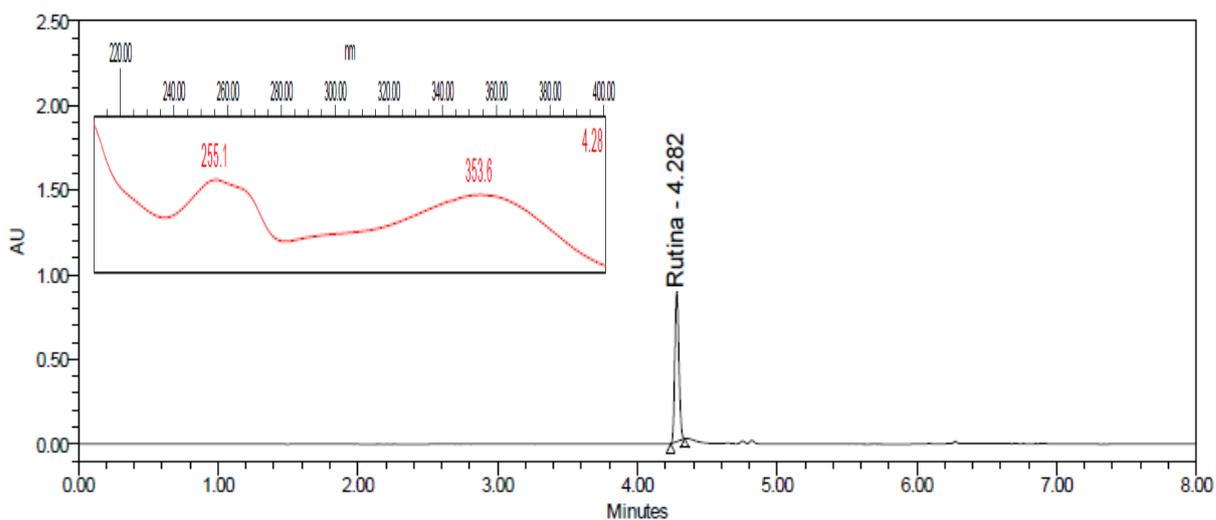


Figura 12 Cromatograma e espectro no UV: rutina.

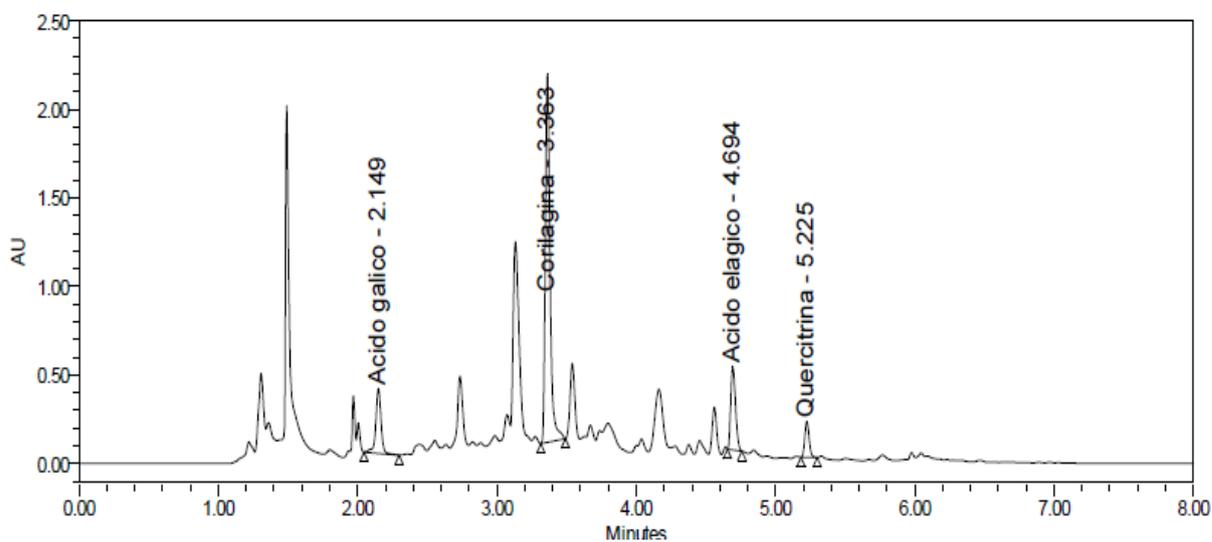


Figura 13 Cromatograma: extrato bruto seco (EBS).

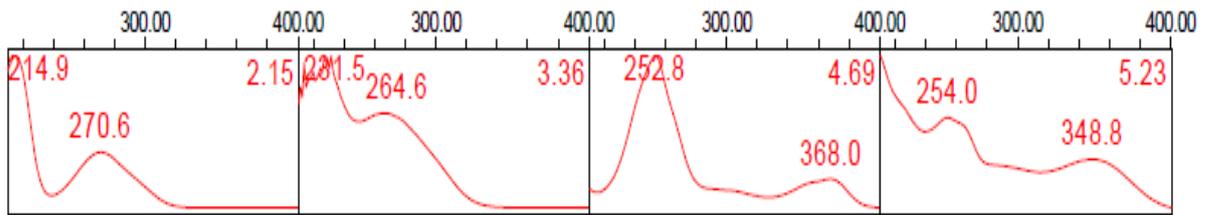


Figura 14 Espectros no UV de picos do cromatograma do extrato bruto seco (EBS); t_R estão indicados na parte superior direita.

Por meio dos espectros de absorção no UV foi possível confirmar que os picos com t_R de 2,15, 3,36 e 4,69 min se tratam de ácido gálico, corilagina e ácido elágico, respectivamente. O espectro de absorção no UV do pico com t_R de 4,04 min, que poderia ser correspondente à rutina, apresentou máximo de absorção distinto na segunda banda, sendo 255 nm e 354 nm na solução padrão rutina e 254 e 349 nm na solução EBS. O pico com t_R de 5,22 min se trata do marcador quercitrina, pois o perfil do espectro no UV apresenta os máximos de absorção em 254 e 348 nm tanto na solução padrão quercitrina como na solução EBS.

Através da avaliação do t_R e espectro de absorção no UV, não foi possível detectar rutina e quercetina no extrato bruto seco (EBS).

Dessa forma, o método analítico demonstrou ser adequado para a quantificação de ácido gálico, corilagina e ácido elágico em *P. niruri*. Markom et al. (2007; 2011), realizaram a quantificação dos mesmos marcadores em extratos preparados por diferentes solventes e métodos de extração, bem como em extrato comercial padronizado de *P. niruri* (HEPAR-P[®]) utilizando sistema gradiente contendo ácido fosfórico 0,1% e acetonitrila, coluna C18 e detecção em 270 nm.

6.2.2 Curvas Analíticas (Padrão Externo) : Ácido Gálico, Corilagina e Ácido Elágico

Para as análises das amostras de *P. niruri* com o método analítico transferido e otimizado foram construídas três curvas analíticas (ácido gálico, corilagina e ácido elágico) com cinco soluções de diferentes concentrações cada, sendo utilizado o software Empower[®] 3.

A solução estoque de ácido gálico a 0,20 mg/mL foi diluída originando soluções com as seguintes concentrações: 0,004 mg/mL, 0,032 mg/mL, 0,040 mg/mL, 0,048 mg/mL, 0,080 mg/mL, e cada solução foi injetada em triplicata.

Na figura 15 está representada a curva analítica do ácido gálico como uma relação entre a média da área do pico e a respectiva concentração (*Amount*; mg/L)

de cada ponto da curva, sendo $y = 3,28 \cdot 10^4 x + 2,82 \cdot 10^4$ a equação da reta e o $R^2 = 0,9990$.

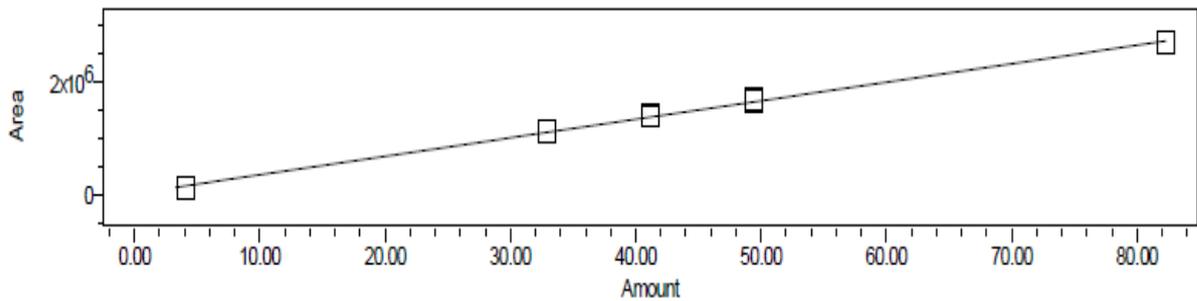


Figura 15 Curva analítica padrão externo: ácido gálico.

A solução estoque de corilagina a 0,30 mg/mL foi diluída originando soluções com as seguintes concentrações: 0,015 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,075 mg/mL, 0,090 mg/mL, 0,150 mg/mL, e cada cada solução foi injetada em triplicata.

Na figura 16 está representada a curva analítica da corilagina como uma relação entre a média da área do pico e a respectiva concentração (*Amount*; mg/L) de cada ponto da curva, sendo $y = 2,03 \cdot 10^4 x - 1,37 \cdot 10^4$ a equação da reta e o $R^2 = 0,9996$.

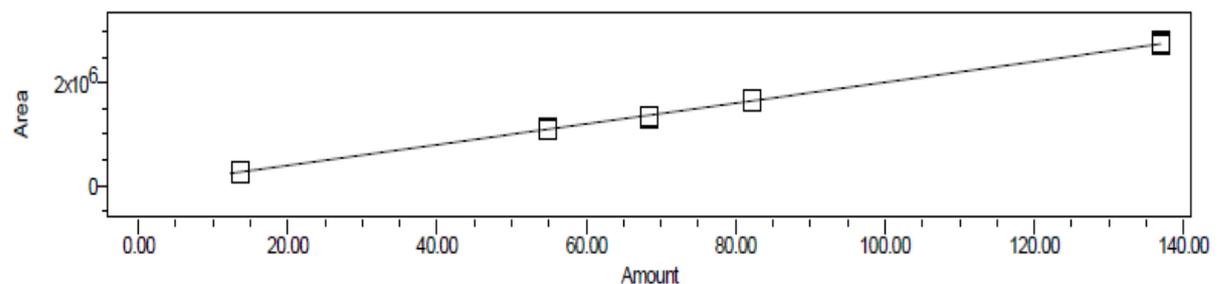


Figura 16 Curva analítica padrão externo: corilagina.

A solução estoque de ácido elágico a 0,15 mg/mL foi diluída originando soluções com as seguintes concentrações: 0,007 mg/mL, 0,028 mg/mL, 0,035 mg/mL, 0,042 mg/mL, 0,063 mg/mL, e cada concentração injetada em triplicata.

Na figura 17 está representada a curva analítica do ácido elágico como uma relação entre a média da área do pico e a respectiva concentração (*Amount*; mg/L) de cada ponto da curva, sendo $y = 3,35 \cdot 10^4 x + 1,89 \cdot 10^5$ a equação da reta e o $R^2 = 0,9813$.

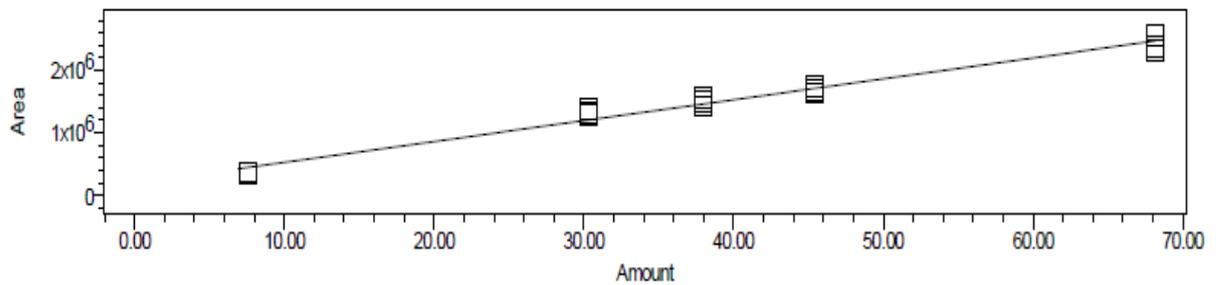


Figura 17 Curva analítica padrão externo: ácido elágico.

Por meio das curvas analíticas foram determinados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) teóricos através das equações abaixo:

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC}$$

Onde:

DP = desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas analíticas

IC = inclinação da curva analítica (BRASIL, 2003).

Os resultados teóricos encontrados para o limite de detecção (LD) foram: 0,459 mg/L; 0,946 mg/L e 1,460 mg/L para ácido gálico, corilagina e ácido elágico, respectivamente. Os limites de quantificação (LQ) obtidos para ácido gálico, corilagina e ácido elágico, foram respectivamente: 1,530 mg/L; 3,153 mg/L e 4,867 mg/L.

Os resultados de LD e LQ para o marcador corilagina no método transferido de CLAE-DAD para CLUE-DAD estão condizentes com os encontrados por Colombo et al. (2009), sendo eles 0,987 mg/L e 3,290 mg/L, respectivamente.

6.3. Determinação de Teor de Ácido Gálico, Corilagina e Ácido Elágico em Droga Vegetal *P. niruri*

6.3.1 Desenvolvimento do Preparo de Amostra Droga Vegetal

Afim de conseguir extrair da droga vegetal a maior quantidade possível dos três analitos (ácido gálico, corilagina e ácido elágico) realizou-se testes de extração seguindo o procedimento descrito no item 5.5.2.4 e utilizando-se as soluções extratoras descritas na tabela 13.

As soluções extrativas obtidas foram analisadas por CLUE em triplicata e os respectivos resultados de teor estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 13 - Testes extrações droga vegetal.

Teste	Fração	Ácido gálico (%, m/m)	Corilagina (%, m/m)	Ácido elágico (%, m/m)
T1	Água purificada	0,14±0,00	1,48±0,02	0,16±0,00
T2	Metanol: água purificada 50:50 v/v	0,04±0,00	1,87±0,00	0,21±0,01
T3	Metanol	0,01±0,02	0,29±0,00	0,18±0,00
T4	Metanol: água purificada 40:60 v/	0,04±0,00	1,80±0,00	0,21±0,00
T5	Metanol: água purificada 30:70 v/v	0,05±0,00	1,88±0,00	0,23±0,00
T6	Metanol: água purificada 20:80 v/v	0,06±0,00	1,83±0,01	0,25±0,01
T7	Metanol: água purificada 25:75 v/v	0,24±0,02	2,00±0,04	0,35±0,03

A condição de extração T7 apresentou a maior recuperação total dos três marcadores, dessa forma ela foi elencada como sendo a condição de preparo para a droga vegetal.

Para garantir a melhor amostragem da droga vegetal e a confiabilidade dos resultados, a tomada de amostra foi ajustada de 0,5 g para 1,2 g, bem como a concentração, ou melhor, a relação droga vegetal/ solvente foi alterada de 10 mg/mL para 6 mg/mL mantendo-se o método de extração como descrito em 5.5.2.4.

Na figura 18 está representado o cromatograma da solução extrativa da droga vegetal na relação de 6 mg/mL.

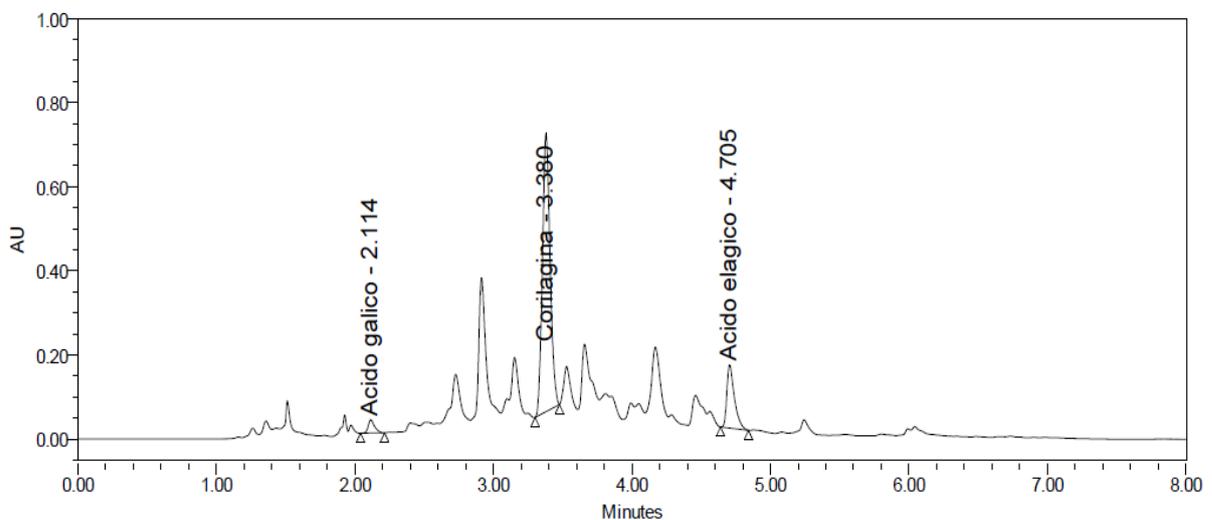


Figura 18 Cromatograma: droga vegetal *P. niruri* (relação droga vegetal/ solvente de 6 mg/mL).

Os teores médios (% m/m) de três determinações na droga vegetal de ácido gálico, corilagina, ácido elágico, bem como a somatória de ácido elágico, ácido gálico e corilagina (AEGC) foram $0,18 \pm 0,01\%$, $2,46 \pm 0,04\%$, $0,41 \pm 0,01\%$ e $3,51 \pm 0,06\%$, respectivamente, considerando a porcentagem de umidade no cálculo (Item 6.1.2).

Ao avaliarem o efeito de solventes e métodos de extração na obtenção de taninos hidrolisáveis (ácido gálico, corilagina e ácido elágico), Markom et al. (2007) encontraram o teor de 0,18% m/m de ácido gálico realizando extração por Soxhlet com etanol 70% durante 3 h. Neste mesmo trabalho, utilizando-se extração com água pressurizada e água como co-solvente em extração com fluido supercrítico, obtiveram-se respectivamente, 2,42% e 2,45% m/m de corilagina. Para o ácido elágico, todos os solventes e métodos de extração testados apresentaram teores superiores a 5,10% m/m. Os dados encontrados por Markom et al. (2007) corroboram com os obtidos neste trabalho, com exceção do ácido elágico, sendo que essa diferença pode estar relacionada ao método de extração (Soxhlet) ou devido a origem da droga vegetal. Os autores dos estudos aqui citados não mencionam se consideravam a umidade dos extratos no cálculo.

A somatória de ácido elágico, ácido gálico e corilagina (AEGC) (3,51% m/m) quantificados por CLUE representam aproximadamente 27,2% dos taninos totais quantificados por método UV-Vis. Isso pode ter ocorrido devido à diferença de especificidade dos métodos de análise, sendo que a cromatografia líquida é mais específica do que métodos espectrofotométricos para análise de matérias-primas vegetais, mas também deve ser considerada a possível presença de outros taninos não identificados neste estudo.

6.4 Extratos e Análises Cromatográficas

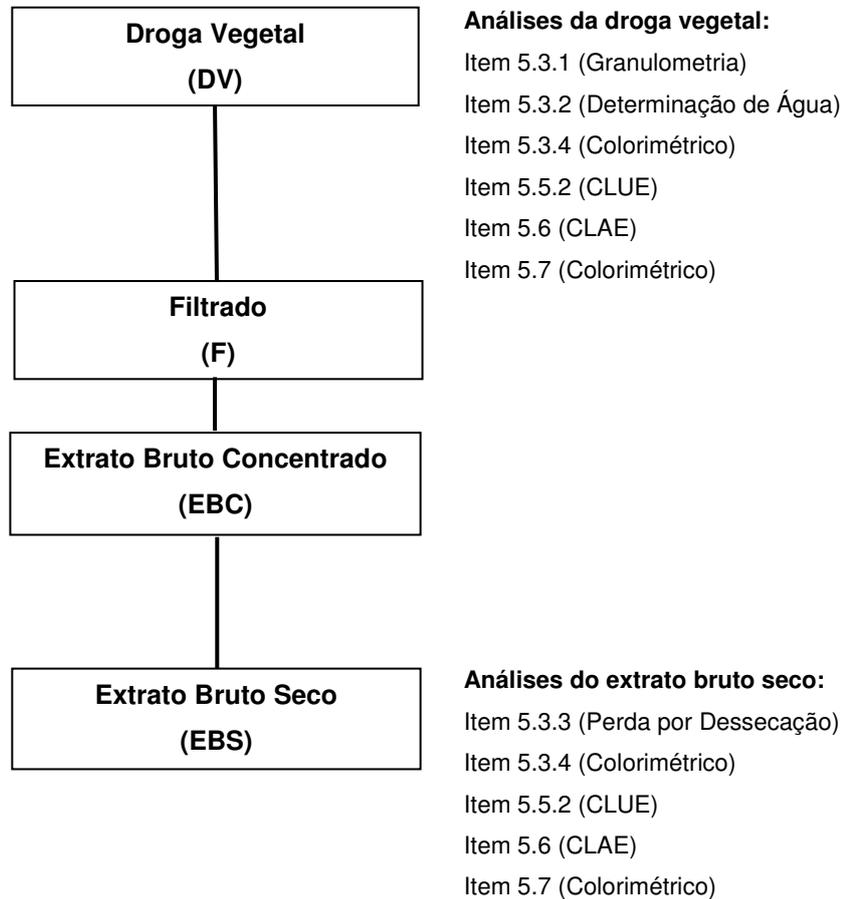
6.4.1 Extrato Bruto Seco

Foram utilizados 3,0 kg de droga vegetal moída e 60 L de água potável. Após o tempo de extração, a solução extrativa obtida foi filtrada, obtendo-se 42 L de filtrado (F). O filtrado foi então concentrado obtendo-se 1,65 L de extrato bruto concentrado (EBC) com $21,47 \pm 0,33\%$ de sólidos totais.

Posteriormente o extrato bruto concentrado (EBC) foi congelado a -80°C e liofilizado, obtendo-se 326,87 g do extrato bruto seco (EBS), com umidade de

9,06±0,35% e rendimento de 10,9% (m/m), calculado em base seca tanto para a droga vegetal como para o extrato.

O fluxograma 1 representa a obtenção do extrato bruto seco a partir da droga vegetal respectivas análises realizadas.



Fluxograma 1 Obtenção do extrato bruto seco de *P. niruri* e análises realizadas.

O rendimento obtido apresenta-se abaixo do encontrado por Sabir e Rocha (2008), os quais prepararam extratos aquosos com dois lotes diferentes de *P. niruri* na proporção de droga vegetal: solvente extrator 1:10 m/v, obtendo de 21- 23% m/m de rendimento. Harish e Shivanandappa (2006) obtiveram rendimento de 56% para extrato aquoso liofilizado 12,5% m/v de folhas e 32% m/m de rendimento para extrato aquoso liofilizado 12,5% m/v de frutos de *P. niruri*.

Para extrações realizadas com caules e partes aéreas de *P. niruri* foram encontrados rendimentos de 26,2% m/m para extração aquosa a 3,3% m/v por Soxhlet; 17,8% m/m para extração a 13,9% m/v por fluido supercrítico, sendo água o co-solvente; e 27,0% m/m para extração com água pressurizada a 5,6% m/v (MARKOM et al., 2007).

O rendimento mais próximo ao obtido para o EBS, foi também reportado por Markom et al (2007), sendo de 8,5% m/m para extração de caules e partes aéreas de *P. niruri* a 3,3% p/v por fluido supercrítico com etanol 70% como co-solvente.

Foi realizada a determinação de ácido gálico, corilagina e ácido elágico por CLUE-DAD, injetando-se soluções do EBS (1,5 mg/mL) preparadas em triplicata, segundo descrito no item 5.5.2.2.

Na figura 19 está apresentado o cromatograma do EBS.

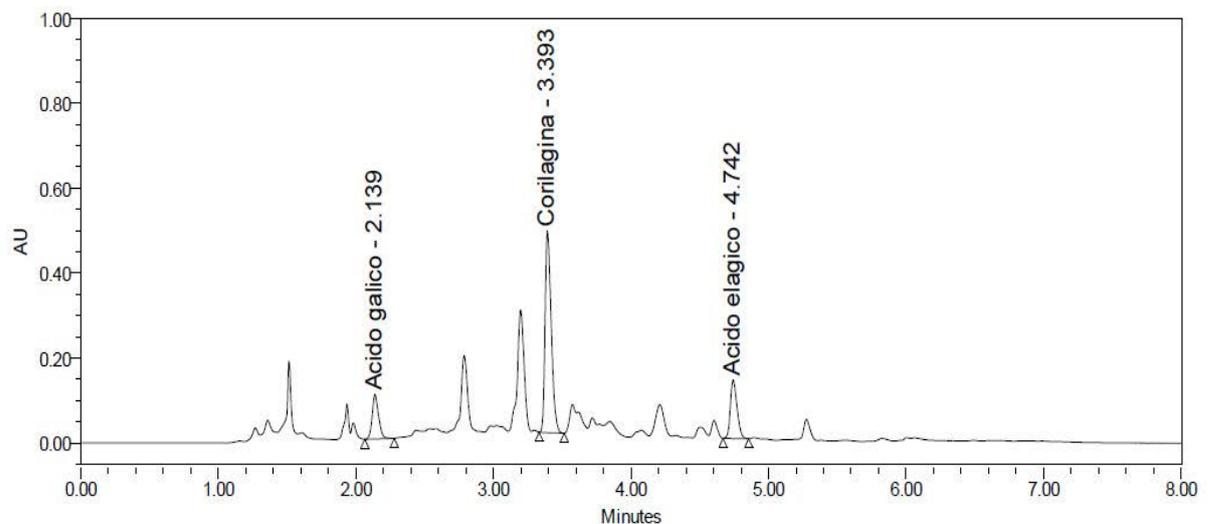


Figura 19 Cromatograma extrato bruto seco *P. niruri*.

Os teores médios (% m/m) de três determinações no extrato bruto seco de ácido gálico, corilagina, ácido elágico, bem como a somatória de ácido elágico, ácido gálico e corilagina (AEGC) foram $0,53 \pm 0,01\%$, $4,78 \pm 0,03\%$, $0,78 \pm 0,01\%$ e $6,09 \pm 0,06\%$, respectivamente, considerando a porcentagem de umidade do extrato bruto seco cálculo (Item 6.1.3).

Tais resultados apresentam-se superiores ao encontrados por Markom et al. (2007) em extrato comercial de *P. niruri* padronizado (HEPAR-P[®]), sendo 0,21% m/m de ácido gálico, 2,64% m/m de corilagina e 4,17% m/m de ácido elágico.

O teor de ácido gálico encontrado no EBS também é maior que o apresentado por Markom et al. (2007), em extração de caules e partes aéreas de *P. niruri* com fluido supercrítico (0,48% m/m) quando água é utilizada como co-solvente. Já o teor de corilagina encontrado no EBS é maior em extrações a 27,8% m/v com água pressurizada a 100°C e 100 bar (4,11%, m/m), fluido supercrítico (2,42%, m/m) e Soxhlet (2,96%, m/m) utilizando água como co-solvente e solvente, respectivamente. O teor de ácido elágico é maior para todas as extrações aquosas realizadas por

Markom et al. (2007), com exceção da extração com água pressurizada a 60 °C e 150 bar (5,10%, m/m). Os autores dos estudos aqui citados não mencionam se a umidade do extrato é descontada no cálculo dos resultados.

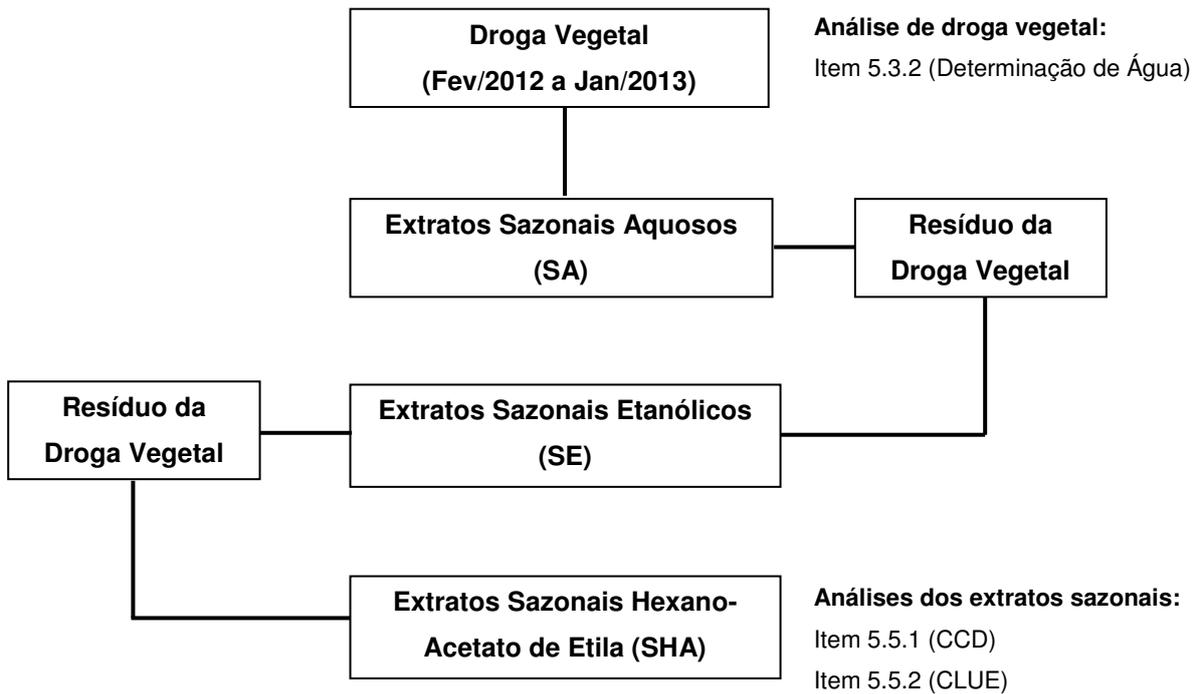
Relacionando-se os resultados da somatória AEGC, quantificados por CLUE com o teor de taninos totais obtidos por espectrofotometria UV-Vis, tem-se que estes (AEGC) representam aproximadamente 23,0% dos taninos totais encontrados por UV-Vis.

6.4.2 Extratos Sazonalidade

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), a época em que uma droga é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano, sendo relatadas na literatura variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários.

Para a avaliação do efeito da sazonalidade na produção de metabólitos secundários a droga vegetal moída de cada mês de coleta extraída sequencialmente com água purificada, etanol e acetato de etila: hexano (1:1 v/v), resultou em extratos secos sazonais aquosos (SA), extratos secos sazonais etanólicos (SE) e extratos secos sazonais hexano-acetato de etila (SHA), respectivamente. O uso da extração sequencial com polaridade decrescente justifica-se pelo fato de obter-se inicialmente o perfil químico relacionado ao uso da espécie na forma de infuso ou extrato aquoso e, a seguir, com o uso de etanol e de hexano: acetato de etila um perfil químico mais amplo incluindo substâncias de média a baixa polaridade presentes no material vegetal.

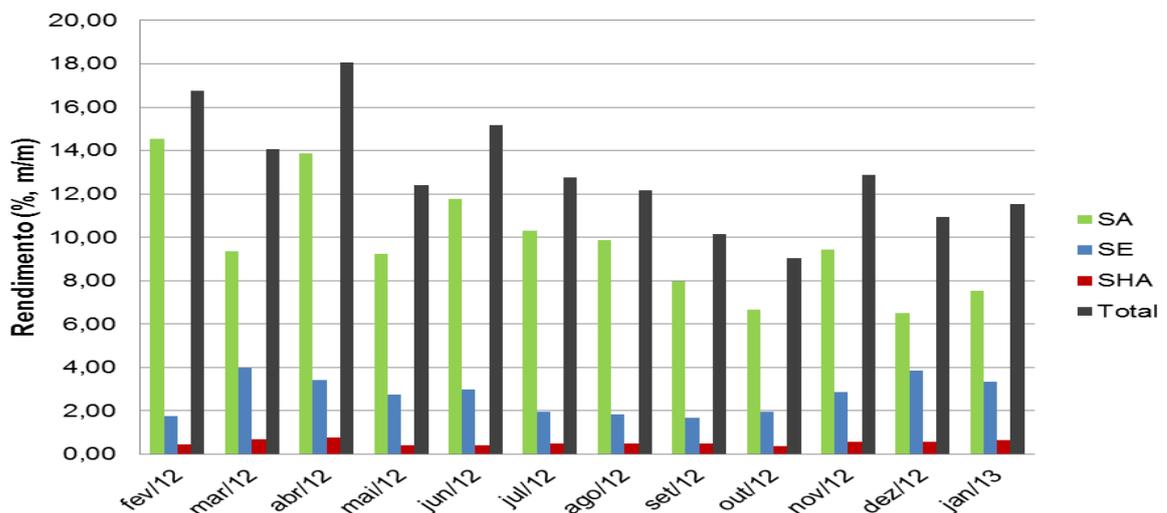
O fluxograma 2 representa a obtenção dos extratos sazonais e respectivas análises realizadas.



Fluxograma 2 Obtenção dos extratos sazonais e análises realizadas.

Seguem abaixo (Gráfico 2) os rendimentos totais e de cada solvente extrator para os extratos sazonais.

Gráfico 2 Rendimento extrações perfil sazonal de *P. niruri*.



Por meio dos resultados apresentados no gráfico pode-se observar que os maiores rendimentos do extrato aquoso e do total foram conseguidos em fevereiro e abril/2012. Já os menores valores para o extrato aquoso foram obtidos em outubro e dezembro/2012 e para o total em setembro e outubro/2012. De forma geral, os maiores rendimentos foram observados nos primeiros seis meses do ano.

Segundo Martins (2008), o rendimento (%m/m) de extratos aquosos obtidos a partir de *P. niruri* cultivado na UFSCar-São Carlos, sendo as coletas realizadas nos meses de janeiro, abril e outubro de 2007, foram respectivamente, 14,1%, 13,1% e 16,1%. O rendimento da extração aquosa (SA), 13,9% m/m, a partir de coleta realizada em Botucatu-SP, no mês de abril/2012, apresenta-se próximo ao obtido por Martins (2008) para o mesmo mês no ano de 2007, em coleta realizada em São Carlos-SP. Já os rendimentos das extrações aquosas de outubro/2012 (6,7% m/m) e janeiro/2013 (7,5% m/m) das coletas de Botucatu-SP diferem das encontradas por Martins (2008).

Não há relatos na literatura sobre avaliações do perfil qualitativo e quantitativo de extratos de diferentes polaridade e de coletas realizadas durante doze meses de um ano, para a espécie *P. niruri*. Segundo Yariwake et al. (2005), para propor critérios de padronização de medicamentos fitoterápicos é imprescindível conhecer a variabilidade química da espécie vegetal utilizada como matéria-prima.

Através da cromatografia em camada delgada foi possível avaliar qualitativamente o perfil cromatográfico dos extratos de diferentes polaridades (SA, SE e SHA) obtidos com coletas realizadas durante doze meses de um ano.

Foram realizadas análises com condições cromatográficas para taninos, lignanas, flavonoides e terpenos, segundo item 5.5.1.3.

Para taninos, não foi observada diferença no perfil químico entre as amostras dos meses de janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012 sob luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm (cromatoplasmas não apresentadas) e após revelação com cloreto férrico a 3% em observação sob luz visível (Figuras 20 a 22) para a mesma polaridade de extrato, pois as manchas presentes apresentaram o mesmo R_f para as doze amostras. Aparentemente pode-se observar uma variação na intensidade das manchas o que sugere diferenças quantitativas entre os extratos.

Nas figuras 20 e 21, correspondente aos extratos aquosos e etanólicos, respectivamente, aparecem nas doze amostras para ambos os extratos, manchas bastante intensas com coloração azulada e com mesmo fator de retenção ($R_f = 0,76$) do padrão ácido gálico. Quercetina ($R_f = 0,84$) e rutina ($R_f = 0,14$) não foram observados nestes extratos.

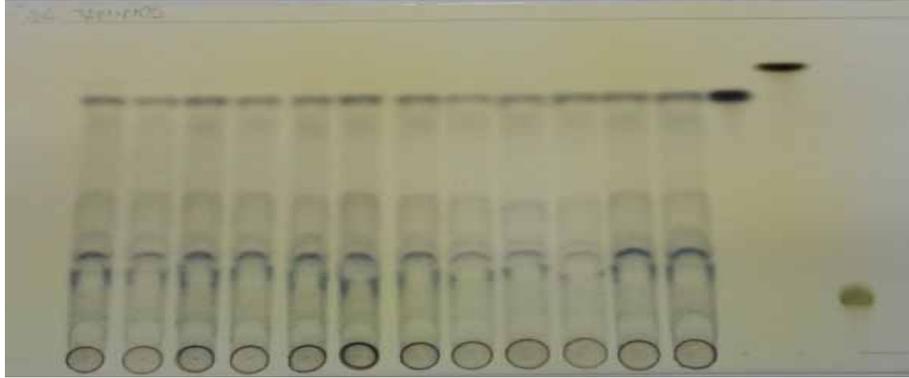


Figura 20 Cromatoplaça referente aos extratos SA, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para direita. Revelador cloreto férrico 3%.

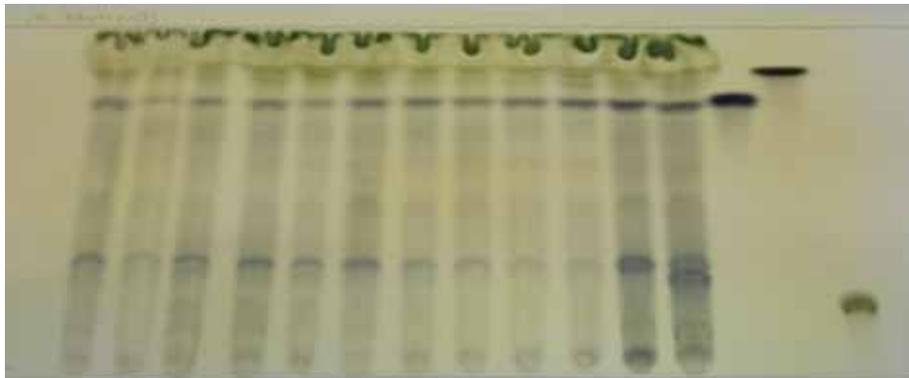


Figura 21 Cromatoplaça referente aos extratos SE, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para direita. Revelador cloreto férrico 3%.

Já na figura 22 abaixo, correspondente aos extratos sazonais hexano-acetato de etila, apenas em algumas amostras aparecem manchas suaves com R_f semelhante ao da quercetina ($R_f = 0,84$). Ácido gálico e rutina não aparecem neste extrato.

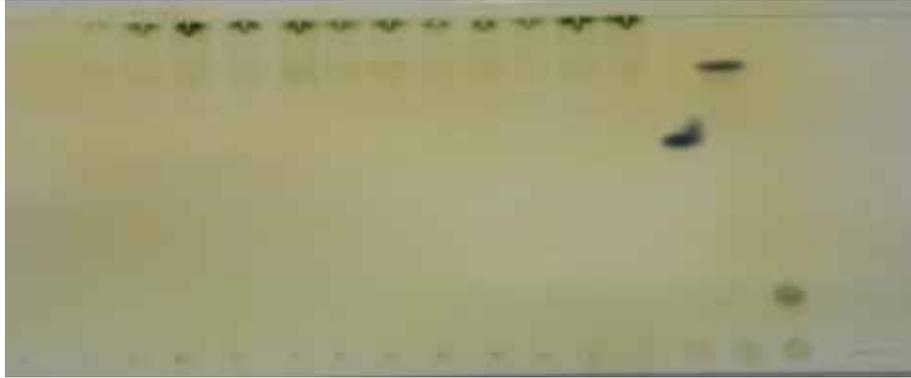


Figura 22 Cromatoplaça referente aos extratos SHA, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para direita. Revelador cloreto férrico 3%.

Na condição cromatográfica de lignanas, não foram observadas diferenças no perfil químico entre as amostras dos meses de janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012 sob luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm (cromatoplaças não apresentadas) e após revelação com anisaldeído sulfúrico seguido de observação sob luz visível (Figuras 23 a 25) para a mesma polaridade de extrato, pois as manchas presentes apresentaram o mesmo R_f para as doze amostras, sendo que no extrato SA a mancha observada está na origem do ponto da aplicação devido a alta polaridade do solvente extrator deste extrato e a baixa polaridade da fase móvel utilizada (Figura 23).



Figura 23 Cromatoplaça referente aos extratos SA, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, da esquerda para direita. Revelador anisaldeído sulfúrico.

Já os extratos SE (Figura 24) e SHA (Figura 25) apresentaram diversas manchas, algumas bastante evidenciadas, como por exemplo a mancha verde claro

($R_f = 0,70$) e a mancha verde escuro ($R_f = 0,74$) no extrato SE, e a mancha verde escuro ($R_f = 0,67$) no extrato SHA.

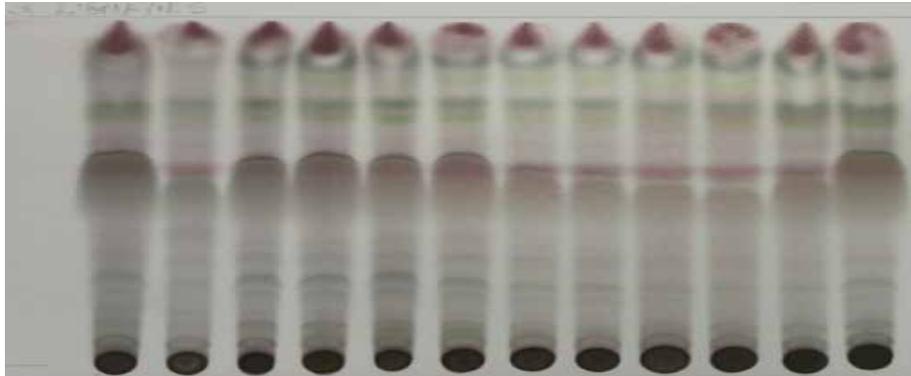


Figura 24 Cromatoplaça referente aos extratos SE, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, da esquerda para direita. Revelador anisaldeído sulfúrico.

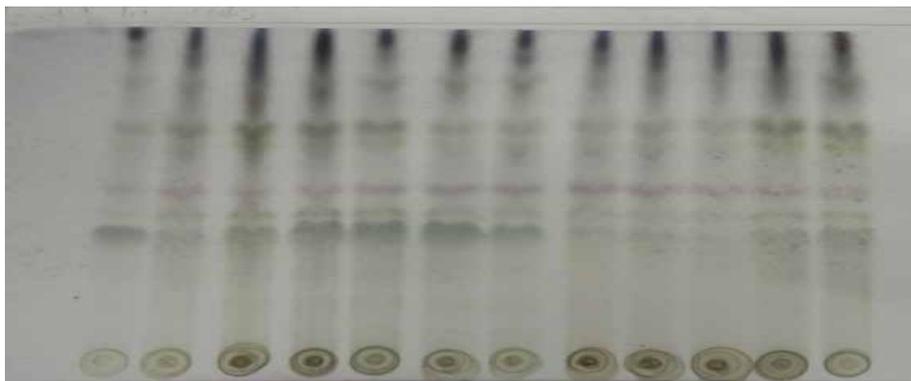


Figura 25 Cromatoplaça referente aos extratos SHA, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, da esquerda para direita. Revelador anisaldeído sulfúrico.

As cromatoplaças de flavonoides não apresentaram nenhuma diferença no perfil entre as amostras dos meses de janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012 sob luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm (cromatoplaças não apresentadas) e após revelação com NP/PEG e observação em luz UV a 365 nm (Figuras 26 a 28) para a mesma polaridade de extrato, pois as manchas presentes apresentam o mesmo R_f para as doze amostras.

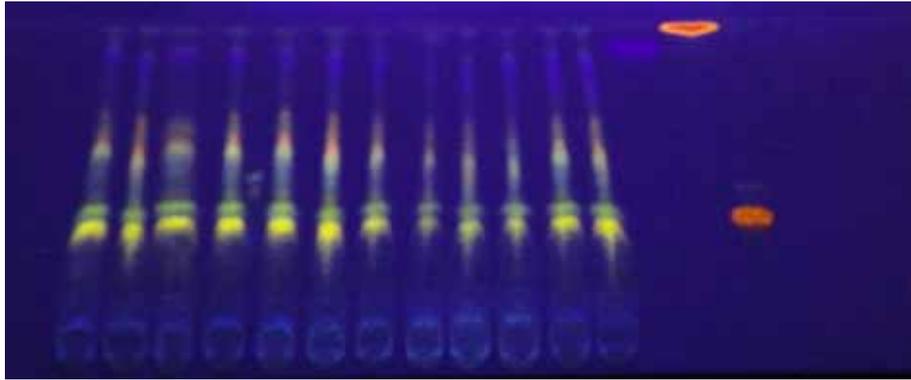


Figura 26 Cromatoplaca referente aos extratos SA, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para direita. Fase móvel: acetato de etila: acetona: ácido acético: água 6:2:1:1 v/v. Revelador NP/PEG sob luz UV 365 nm.

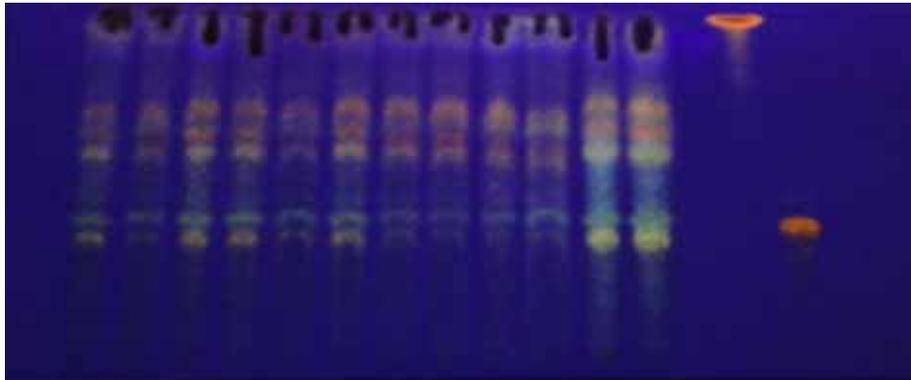


Figura 27 Cromatoplaca referente aos extratos SE, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para direita. Fase móvel: acetato de etila: acetona: ácido acético: água 6:2:1:1 v/v. Revelador NP/PEG sob luz UV 365 nm.



Figura 28 Cromatoplaca referente aos extratos SHA, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para

direita. Fase móvel: acetato de etila: acetona: ácido acético: água 6:2:1:1 v/v. Revelador NP/PEG sob luz UV 365 nm.

No entanto, ao se comparar os extratos com polaridades diferentes (extração aquosa, etanólica ou hexano-acetato de etila), observa-se grande quantidade de manchas nos extratos SA e SE com coloração característica de flavonoides, o que pode ser explicado pela afinidade deste grupo de substâncias com solventes de média a alta polaridade. O extrato SHA, mais apolar apresenta manchas apenas no ponto de aplicação e no *front* da fase móvel.

Para a cromatoplas de terpenos também não foram observadas diferenças no perfil químico entre as amostras dos meses janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012 sob luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm (cromatoplas não apresentadas) e após revelação com revelador anisaldeído sulfúrico (Figura 29 e 30) para o mesmo tipo de extrato.

No extrato SA - revelação com anisaldeído sulfúrico e observação sob a luz visível (cromatoplas não apresentada) - as manchas observadas estão concentradas no ponto de aplicação, devido a maior polaridade dos compostos extraídos com água, que possuem baixa afinidade pela fase móvel utilizada.

Já os extratos SE e SHA apresentam diversas manchas, algumas bastante evidenciadas, como por exemplo a mancha marrom escuro com R_f de 0,28 (Figuras 29 e 30), presente nas cromatoplas de ambos os extratos.

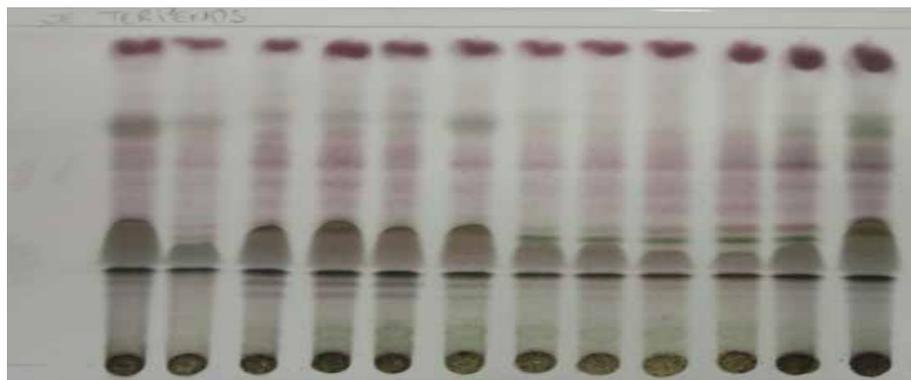


Figura 29 Cromatoplas referente aos extratos SE, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, da esquerda para direita. Revelador anisaldeído sulfúrico.

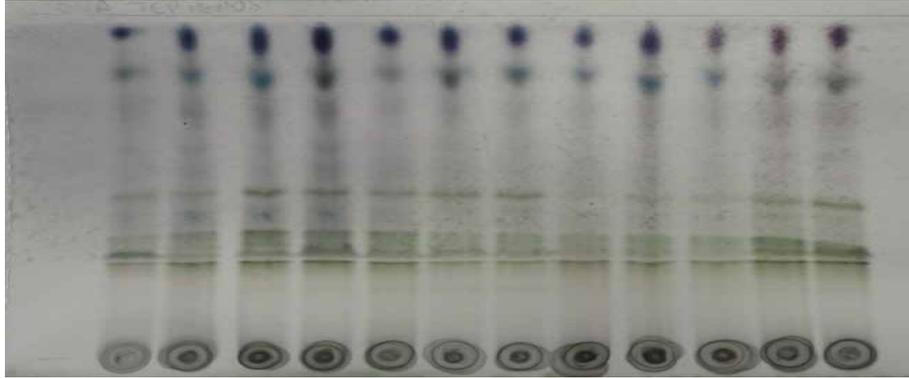


Figura 30 Cromatoplaça referente aos extratos SHA, sazonalidade janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, da esquerda para direita. Revelador anisaldeído sulfúrico.

Os resultados aqui encontrados corroboram com os obtidos por Nascimento e colaboradores (2008), os quais avaliaram a fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD), de extratos etanólicos de três espécies de *Phyllanthus*, dentre elas *P. niruri*, em coletas realizadas nos meses de junho e novembro de 2004 em diferentes localidades do estado de Pernambuco. As três espécies apresentaram perfis de CCD semelhantes para flavonoides, taninos e terpenos independentemente do local de coleta, sendo que ficou evidente a presença de taninos hidrolisáveis nas amostras de *P. niruri* e taninos condensados nas amostras de *P. tenellus* e *P. amarus*.

Segundo Cimanga et al. (2004), no extrato etanólico da planta inteira de *P. niruri* são detectados por CCD alcaloides, flavonoides, composto fenólicos, taninos e terpenos.

Na figuras 31 a 33 estão representandos o perfil cromatográfico por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a detector de arranjo de diodos (CLUE-DAD) processados em 267 nm das amostras sazonais de janeiro/2013, fevereiro/2012 a dezembro/2012 das extrações sazonais aquosas (SA), das extrações sazonais etanólicas (SE) e das extrações sazonais hexano-acetato (SHA), respectivamente.

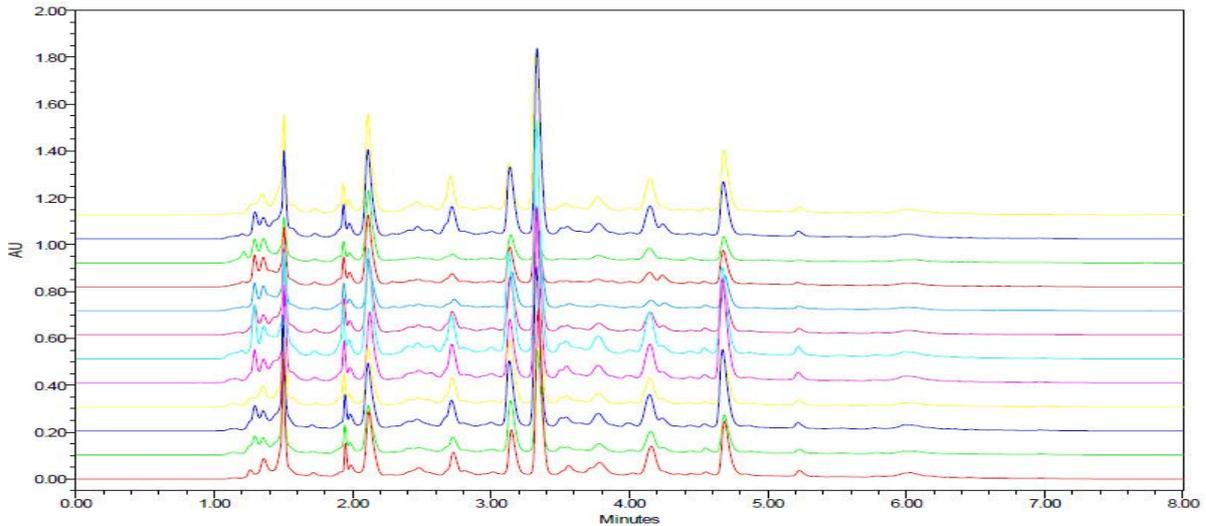


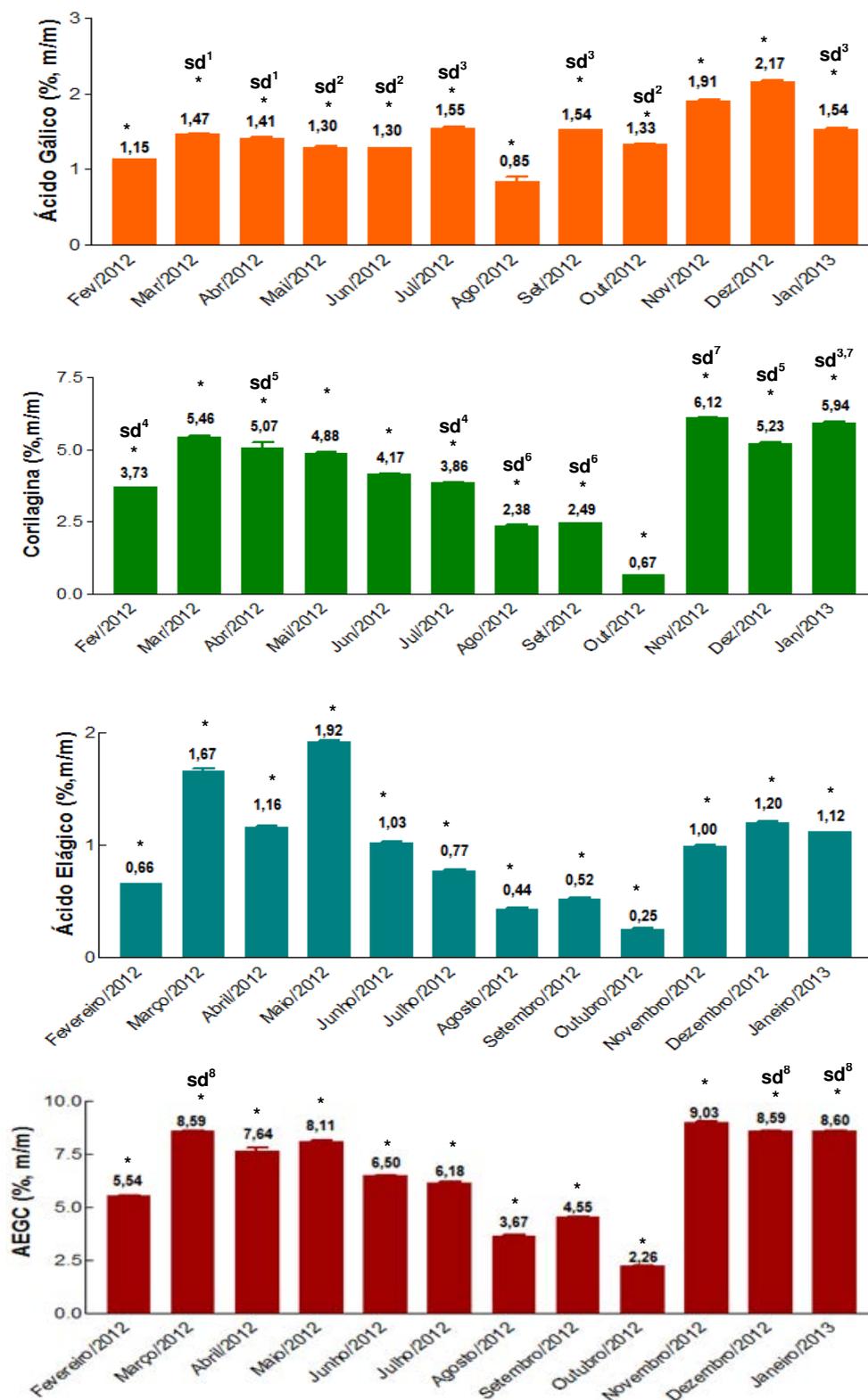
Figura 31 Cromatogramas SA de janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012 sobrepostos, de baixo para cima (t_R ácido gálico = 2,1 min; t_R corilagina = 3,3 min; t_R ácido elágico = 4,7).

Pela cromatografia líquida é possível confirmar que o perfil cromatográfico é muito semelhante em termo de tempo de retenção (t_R) para todos os extratos sazonais aquosos (Figura 31), havendo diferença apenas na altura e área dos picos (quantitativa).

Nos gráficos 3 a 5, estão relacionados os teores médios em porcentagem (m/m) dos marcadores ácido gálico, corilagina, elágico, assim como a somatória de ácido elágico, ácido gálico e corilagina (AEGC) das amostras da extração sazonal aquosa (SA), extração sazonal etanólica (SE) e extração sazonal hexano-acetato de etila (SHA), respectivamente.

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão de três determinações e foram analisados estatisticamente usando análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste de *Tukey*. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

Gráfico 3 Teor de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC em SA.



* Médias apresentam diferenças significativas entre si $p < 0,05$

sd Médias com mesmo número não apresentam diferenças significativas entre si $p > 0,05$

Pela análise estatística é possível afirmar que há uma diminuição no teor de corilagina e ácido elágico nos meses de agosto a outubro. Já o ácido gálico possui menor teor no mês de agosto.

O teor de corilagina encontrado no mês de Janeiro/2013 (5,94% m/m) está próximo aos obtidos por Martins (2008) ao analisar por CLAE-UV o teor de corilagina em extrato aquoso de partes aéreas de amostras cultivadas de *P. niruri*, cuja análise quantificou 5,18 e 6,17% m/m em coletas realizadas no mês de Janeiro/2006 em Paulínia/SP (CPQBA) e Janeiro/2007 em São Carlos (UFSCar), respectivamente.

Os extratos sazonais etanólicos (SE), segundo cromatograma abaixo (Figura 32), também não apresentam diferenças qualitativas no perfil cromatográfico quando comparados entre si.

No entanto é visível que os picos de ácido elágico nos extratos etanólicos apresentam maior altura em relação aos extratos aquosos. Isso pode ser explicado devido a maior afinidade do ácido elágico pelo solvente etanol.

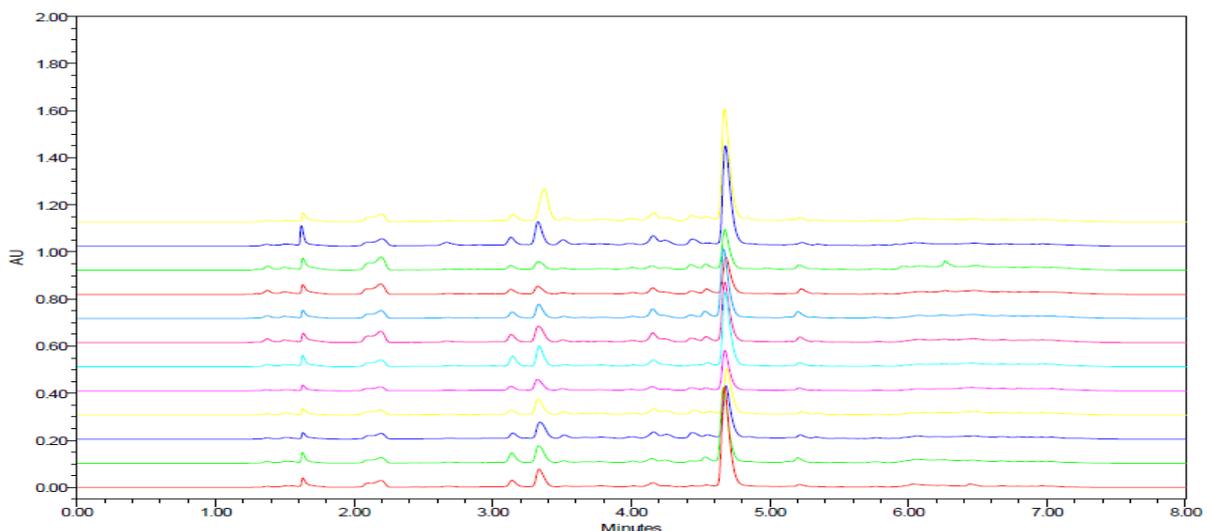
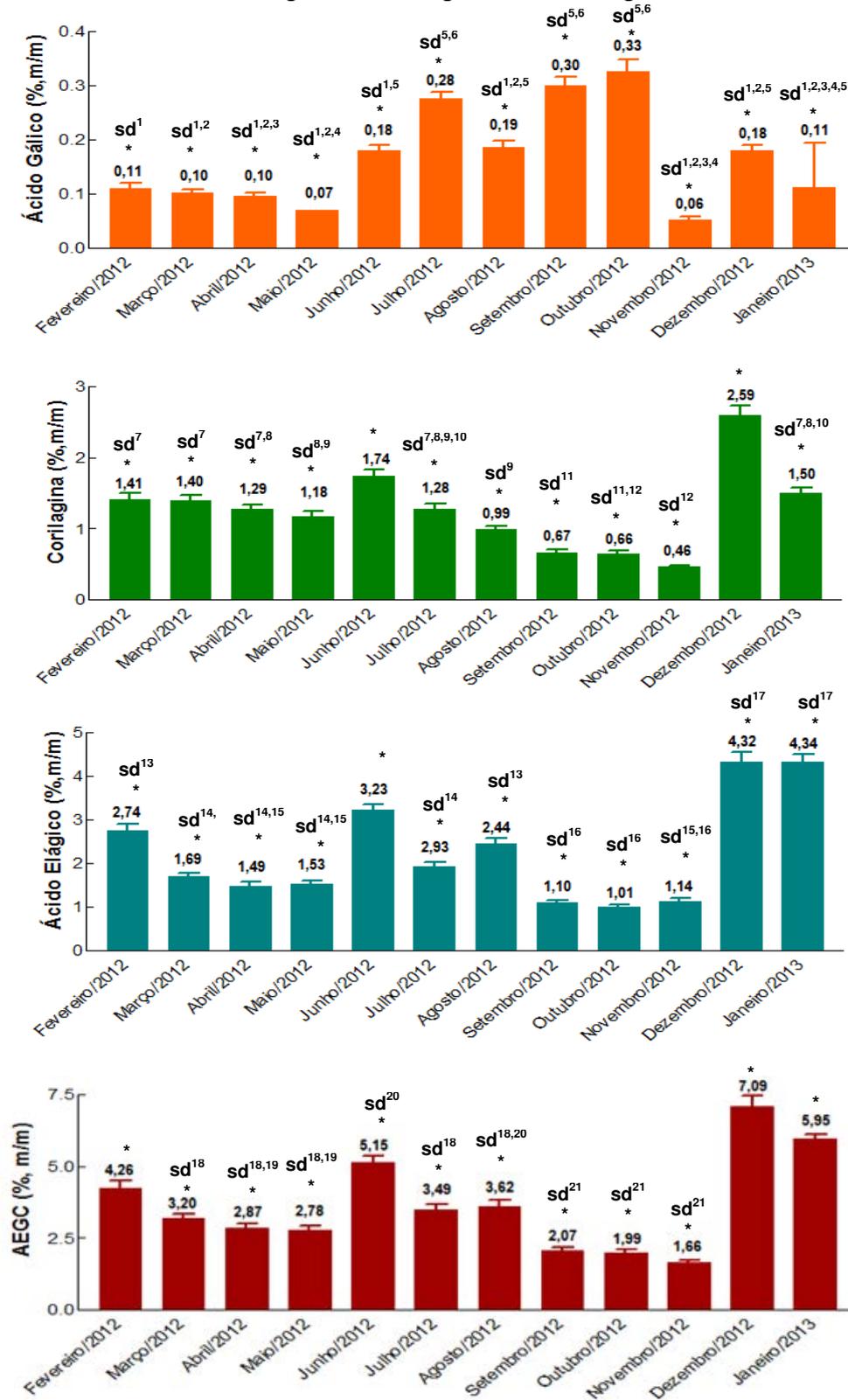


Figura 32 Cromatogramas SE de janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, sobrepostos, de baixo para cima (t_R ácido gálico = 2,1 min; t_R corilagina = 3,3 min; t_R ácido elágico = 4,7).

No gráfico 4 é possível comprovar que o etanol extrai melhor o ácido elágico.

Gráfico 4 Teor de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC em SE.



* Médias apresentam diferenças significativas entre si $p < 0,05$

sd Médias com mesmo número não apresentam diferenças significativas entre si $p > 0,05$

É possível afirmar por meio da análise estatística, que há uma diminuição da concentração de corilagina e ácido elágico entre os meses de setembro e novembro, sendo que dezembro/2012 e janeiro/2013 são os meses com maior porcentagem de ácido elágico.

No cromatograma abaixo (Figura 33) estão representados os extratos obtidos com extração hexano – acetato de etila 1:1 v/v (SHA).

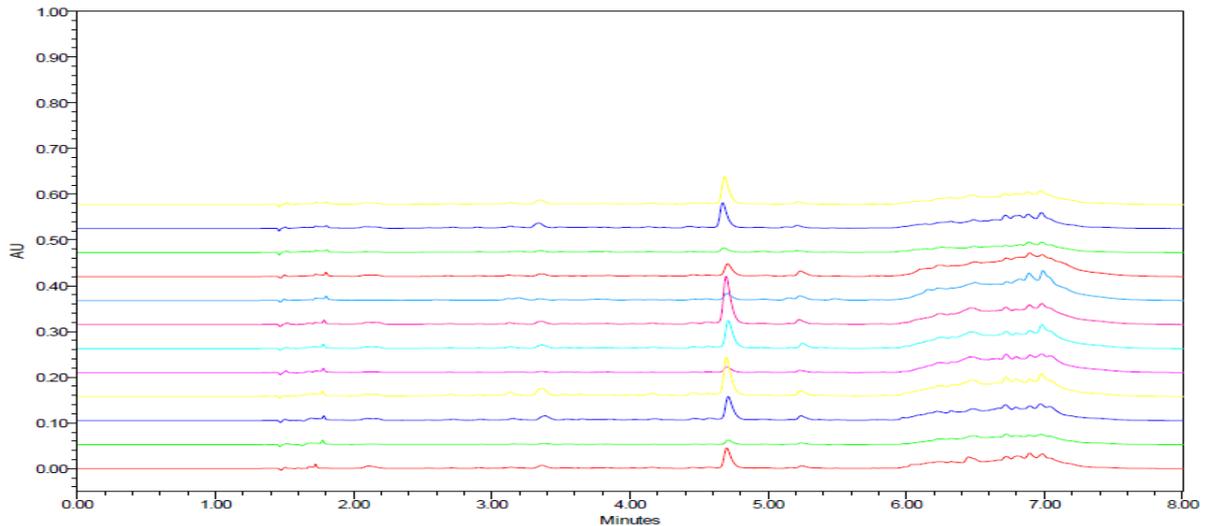
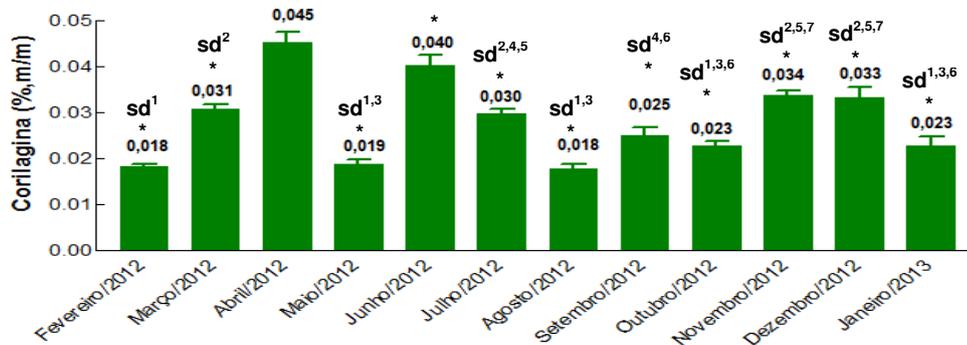
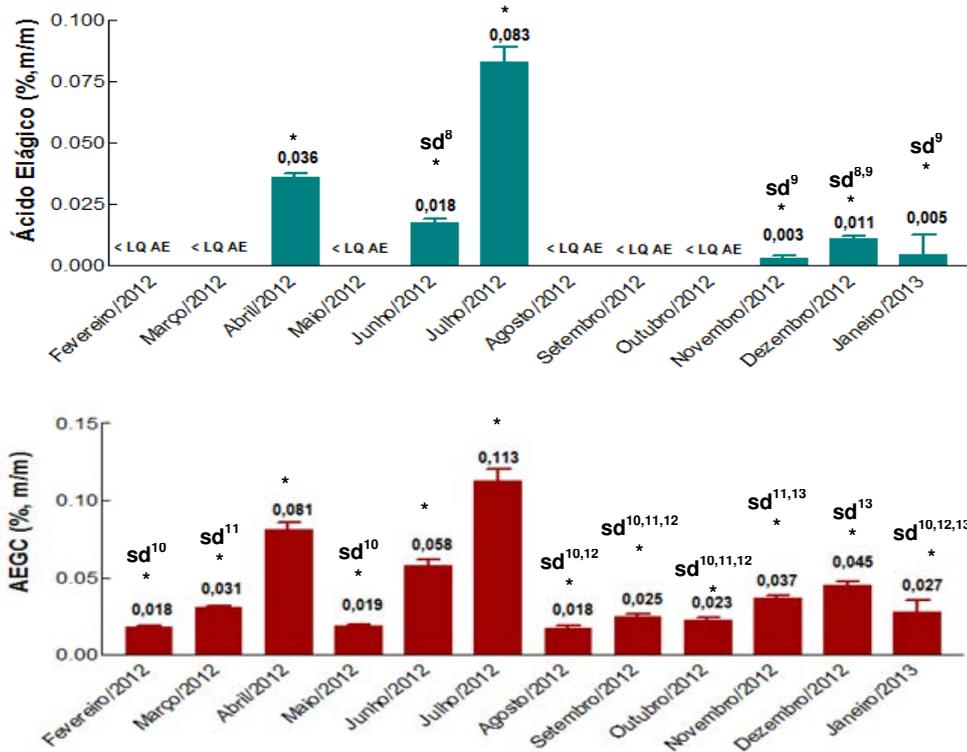


Figura 33 Cromatogramas SHA de janeiro/2013, fevereiro a dezembro/2012, sobrepostos, de baixo para cima (t_R ácido gálico = 2,1 min; t_R corilagina = 3,3 min; t_R ácido elágico = 4,7).

O perfil químico dos cromatogramas também não diferem entre si, mas apresentam ausência ou concentração menor que o limite de quantificação (LQ) para os marcadores de ácido gálico e ácido elágico, respectivamente, o que pode ser confirmado pelo gráfico 5.

Gráfico 5 Teor de corilagina, ácido elágico e AEGC em SHA.





* Médias apresentam diferenças significativas entre si $p < 0,05$

sd Médias com mesmo número não apresentam diferenças significativas entre si $p > 0,05$

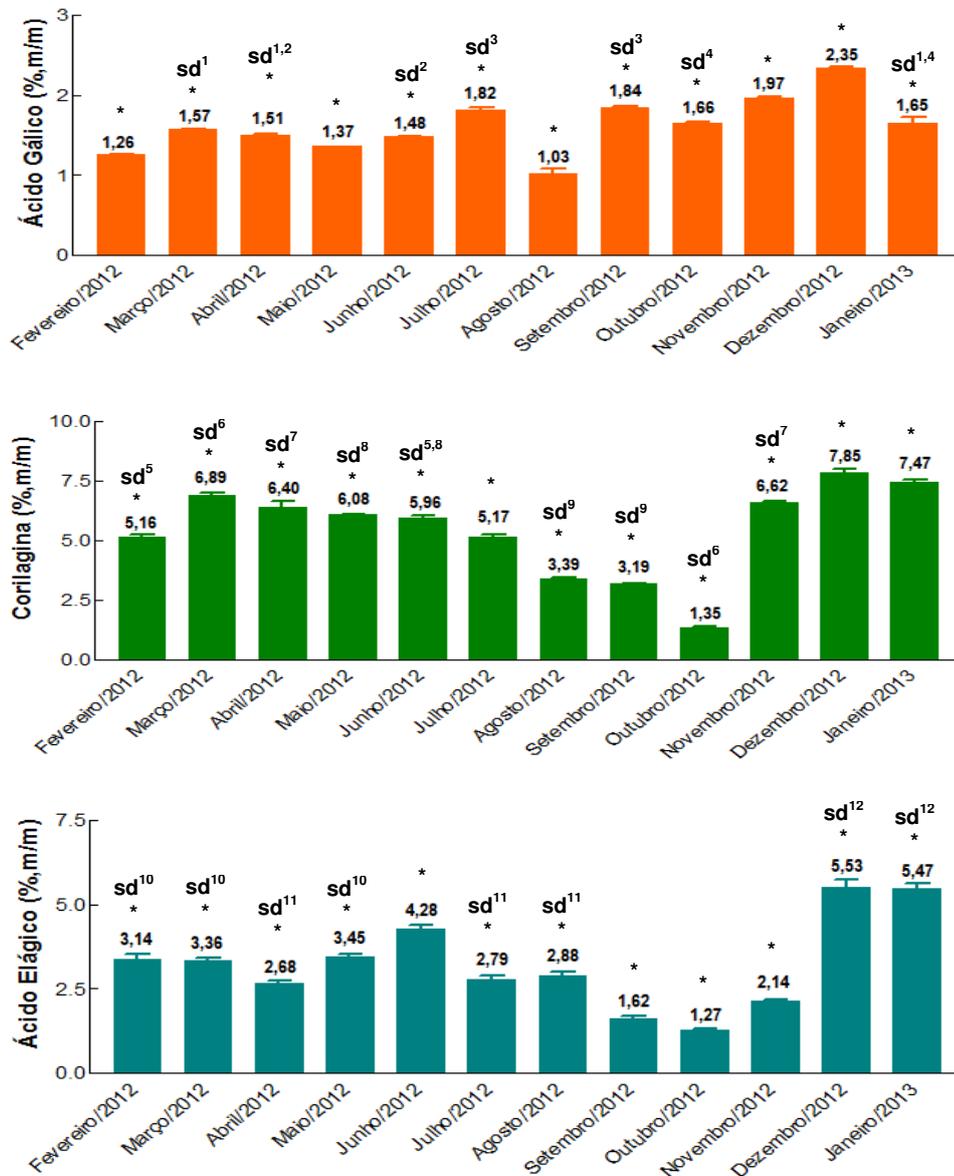
Apesar de identificados todos os marcadores (ácido gálico, corilagina e ácido elágico) nos extratos SHA janeiro/2013, fevereiro/2012 a dezembro/2012, para alguns meses a concentração de ácido gálico e ácido elágico apresentaram-se menores que seus respectivos limites de detecção e/ou quantificação, e portanto não sendo dessa forma detectados e/ou quantificados pelo *software Empower® 3*.

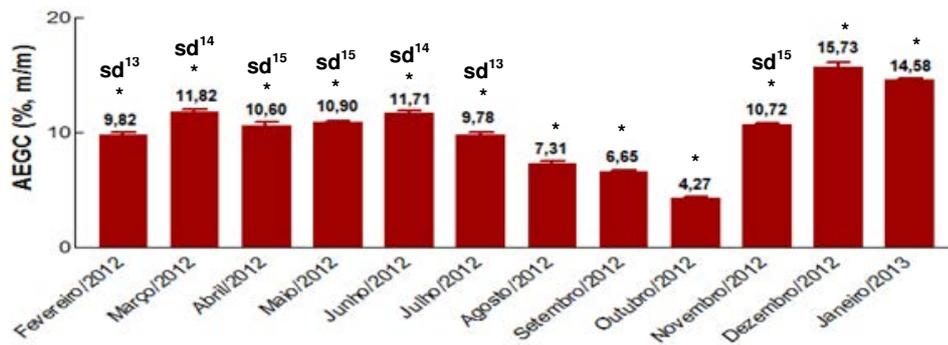
Estudo de avaliação sazonal a partir de extratos de diferentes polaridade também foram conduzidos por Coutinho e colaboradores (2010) para a espécie *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. (guabiroba). Neste estudo foram coletadas folhas de guabiroba nos períodos de verão, outono (estágios vegetativos) e primavera (estágio reprodutivo) do ano de 2007, sendo realizadas extrações sucessivas e em ordem crescente de polaridade com n-hexano, acetato de etila, etanol e metanol. Os autores avaliaram qualitativamente o perfil cromatográfico de cada extrato de mesma polaridade e, posteriormente, o teor de flavonoides de todos os extratos produzidos. Como resultado, Coutinho e colaboradores (2010) demonstraram que as amostras referentes ao extratos hexânico e acetato de etila apresentaram pouca variação sazonal nas diferentes estações do ano, no entanto o

extrato etanólico mostrou alteração significativa em relação a composição química, indicando variação sazonal e diferenças durante o desenvolvimento do vegetal.

No gráfico 6 estão representadas as somatórias dos teores de ácido gálico, corilagina e ácido elágico, respectivamente, extraídos sequencialmente com água, etanol e hexano-acetato de etila para cada mês do ano. Aparece também a somatória dos três marcadores ácido gálico, corilagina e ácido elágico para cada mês do ano, sendo chamados de AEGC.

Gráfico 6 Variação sazonal de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC.





* Médias apresentam diferenças significativas entre si $p < 0,05$

sd Médias com mesmo número não apresentam diferenças significativas entre si $p > 0,05$

Pela análise estatística dos dados do gráfico 6 fica evidente que nos meses de agosto a outubro há uma diminuição na quantidade de AEGC (ácido elágico, ácido gálico e corilagina) em *P. niruri*, sendo que nos meses de dezembro e janeiro estão presentes a maior quantidade dos mesmos.

Segundo descrito por Monteiro et al. (2005), diversos autores relatam variações na concentração de taninos de acordo com a época do ano.

Couto et al. (2013b) em estudo de condições de cultivo e coleta de parte aéreas de *P. niruri* observou que a concentração de ácido gálico é maior nas folhas que se desenvolveram predominantemente no inverno. No entanto esta relação não pode ser observado no presente estudo de variação sazonal.

Yariwake et al. (2005) observaram grande semelhança no perfil cromatográfico por CLAE de flavonoides em todas as amostras de *Maytenus aquifolium* Mart. (espinheira-santa) de coletas realizadas em diferentes estações (inverno, primavera, verão e outono) cobrindo dois anos (inverno de 1992 até outono de 1993 e inverno de 1994 até outono de 1995). A variação do teor de fenóis totais e de flavonoides apresentou correlação positiva, sendo que a menor concentração destes ocorre em fotoperíodos bem definidos: inverno (dias curtos e noites longas) e verão (dias curtos e noites longas), e a maior concentração deste metabólitos está correlacionada com as estações que apresentam diferenças menos nítidas na duração dos dias e noites (primavera e outono). Dessa forma, constatou-se variações sazonais quantitativas significativas na composição química das folhas de espinheira-santa.

Na tabela abaixo (Tabela 14) estão apresentados as observações fenológicas durante as coletas nos doze meses do ano.

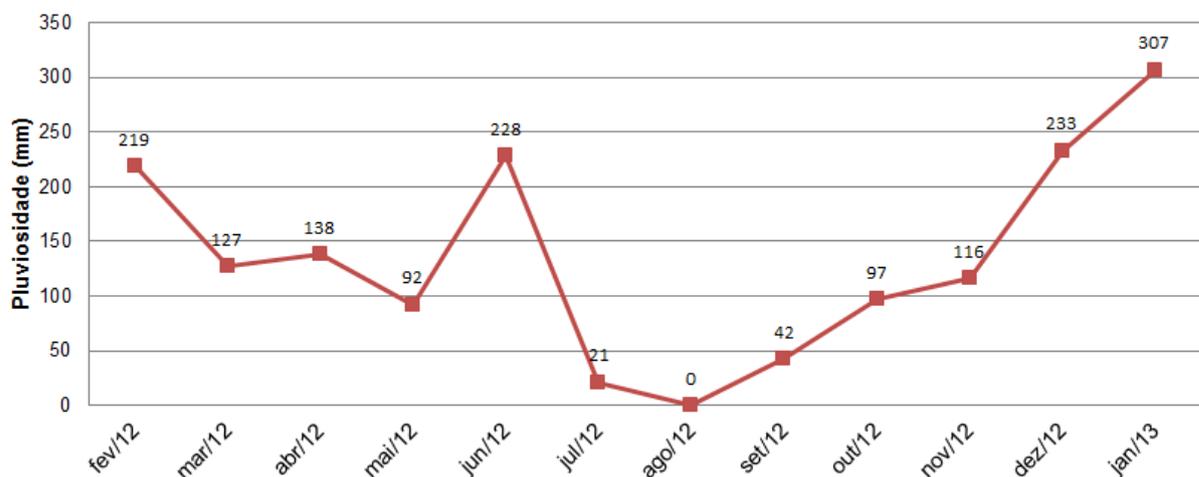
Tabela 14 Estado fenológico *versus* meses do ano.

Meses	Estado Fenológico
Fevereiro/2012	Flores e frutos
Março/2012	Flores e frutos
Abril/2012	Botões florais
Maio/2012	Flores e frutos
Junho/2012	Flores e frutos
Julho/2012	Flores e frutos
Agosto/2012	Frutos e poucas folhas
Setembro/2012	Poucas folhas
Outubro/2012	Folhas novas
Novembro/2012	Folhas e ramos novos
Dezembro/2012	Muitas folhas e sementes
Janeiro/2013	Muitas folhas e sementes

Comparando-se os resultados apresentados no gráfico de variação sazonal de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC (Gráfico 6) com a tabela acima (Tabela 14), observa-se que nos meses de menor concentração de AEGC (agosto a outubro) também são os meses relatados como contendo poucas folhas ou com formação de novas folhas.

No gráfico 7 está apresentada a pluviosidade mensal acumulada nos meses de fevereiro de 2012 a janeiro de 2013 em Botucatu-SP, segundo dados experimentais do Departamento de Botânica da Anidro Extrações do Brasil Ltda, Grupo Centroflora.

Gráfico 7 Pluviosidade mensal acumulada dos meses de fevereiro/2012 a janeiro/2013.



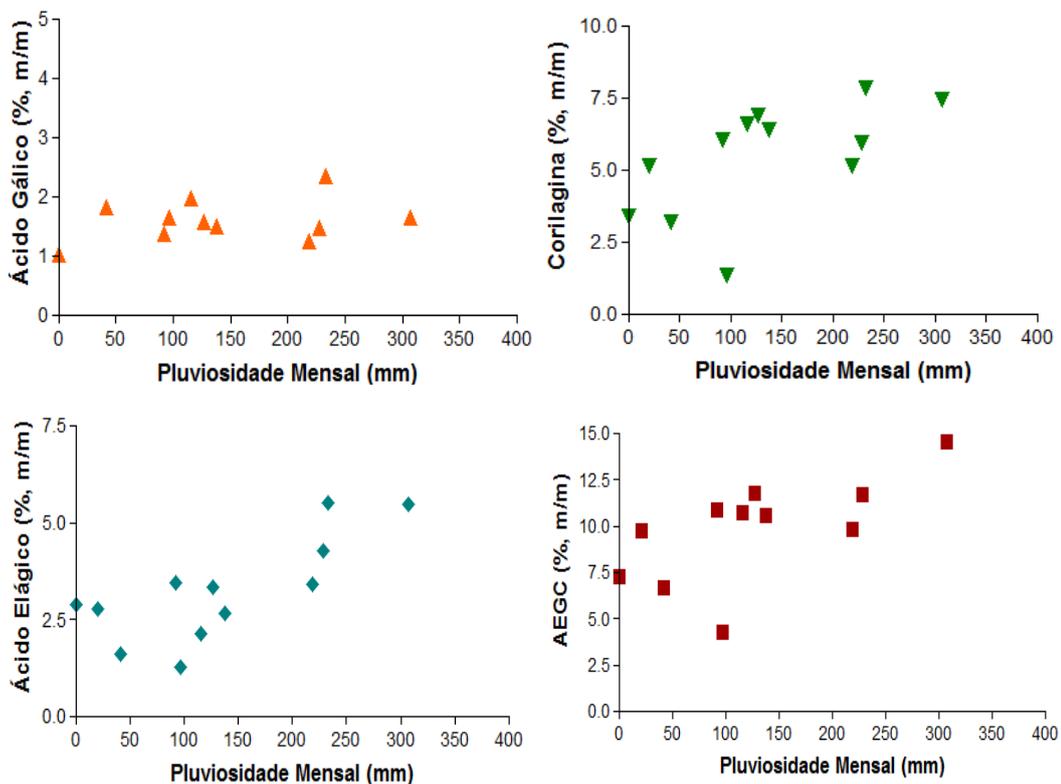
Por meio dos resultados do gráfico 7 observa-se que os meses com menor índice pluviométrico são maio e o período de julho a outubro com resultados menores que 100 mm por mês.

Estes resultados corroboram com os encontrados por Santos et al. (2006), em estudo de variação sazonal do conteúdo de taninos totais em cascas de espécies de barbatimão coletadas em Goiânia-GO, no qual os meses de maio, agosto e setembro apresentam as menores precipitações (<100 mm por mês), bem como os menores teores de fenóis, taninos condensados e precipitação de proteínas.

Nos gráficos 8 e 10 estão demonstrados os dados de correlação entre os teores médios em porcentagem (m/m) dos marcadores (ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC, respectivamente) somando-se os valores obtidos nas extrações aquosa, etanólica e hexano-acetato de etila, *versus* a pluviosidade mensal acumulada ou a temperatura no dia da coleta.

Os resultados foram analisados estatisticamente usando análise de correlação de Pearson (SANTOS et al., 2011) através do *software* GraphPad Prism® versão 3. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

Gráfico 8 Correlação pluviosidade mensal *versus* teor de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC.

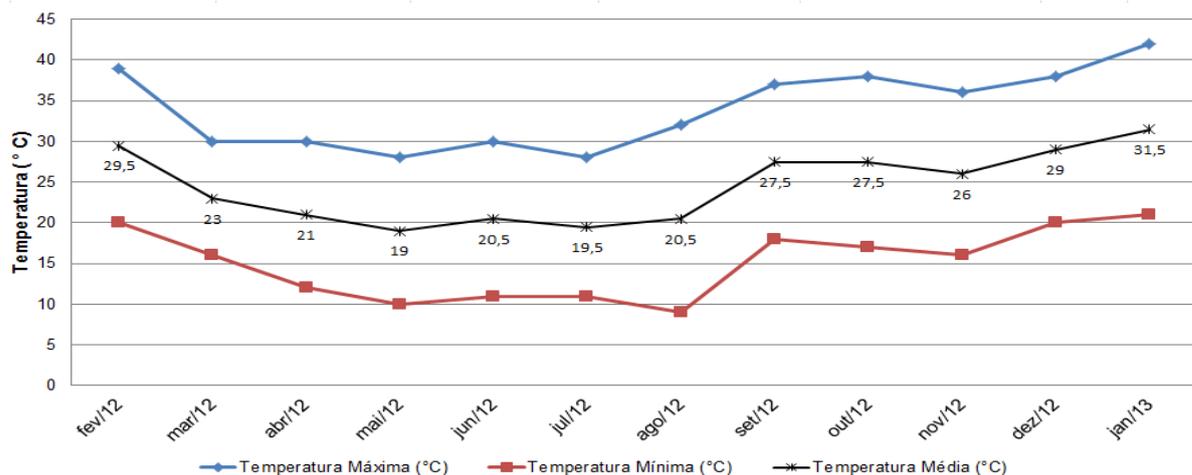


Por meio da correlação de Pearson foi possível observar que o teor total de ácido gálico (extrações aquosa, etanólica e hexano-acetato de etila) nos diferentes meses ($r = -0,3366$; $p > 0,05$) não apresenta correlação com a pluviosidade acumulada para o local de coleta estudado. Já os teores totais de corilagina ($r = 0,6077$; $p < 0,05$), ácido elágico ($r = 0,7550$; $p < 0,01$) e AEGC ($r = 0,7067$; $p < 0,05$) apresentam correlação positiva com a pluviosidade acumulada para o local de coleta estudado (Botucatu/SP), isto é, estão diretamente correlacionadas.

Santos et al. (2011) também encontraram correlação positiva entre a relação taninos/fenóis e a pluviosidade mensal, em estudo realizado com folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) coletadas em Anápolis-GO. Além disso, estão diretamente correlacionados a umidade e a nebulosidade com o teor de taninos/fenóis, sendo que os taninos hidrolisáveis apresentaram apenas correlação positiva com a nebulosidade.

No gráfico 9 estão apresentadas a amplitude térmica (temperatura máxima e mínima), bem como a temperatura média no dia da coleta, nos meses de fevereiro 2012 a janeiro 2013, segundo dados experimentais do Departamento de Botânica da Anidro Extrações do Brasil Ltda, Grupo Centroflora.

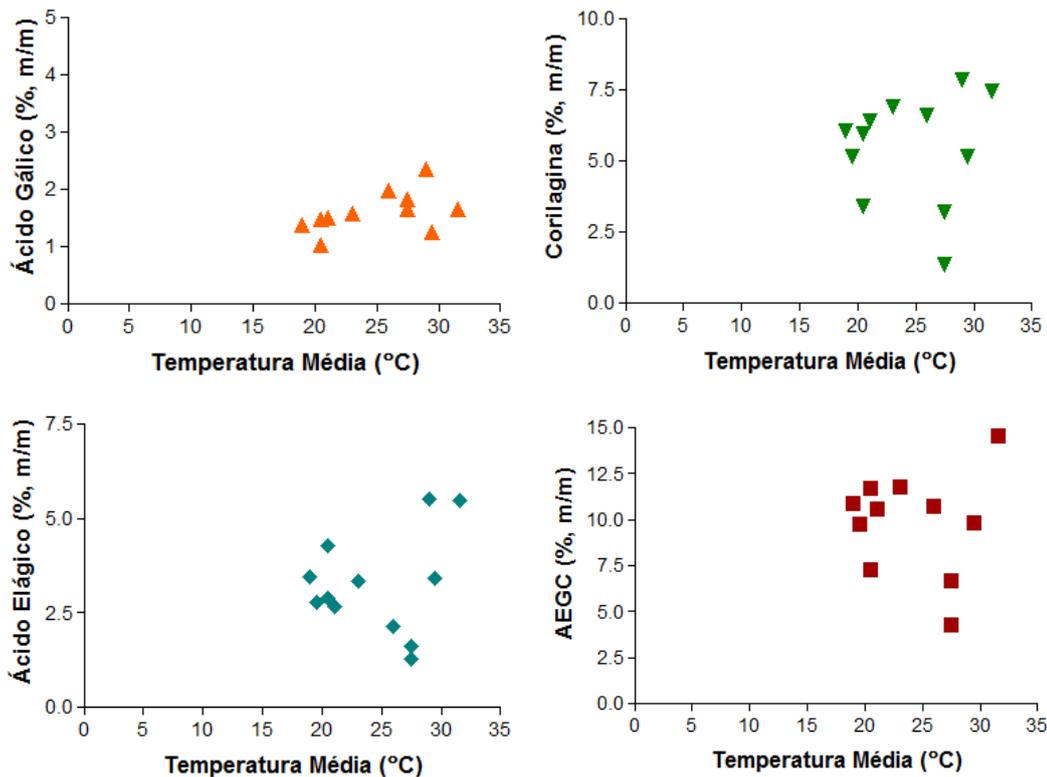
Gráfico 9 Amplitude térmica e temperatura média no dia da coleta de fevereiro/2012 a janeiro/2013.



Por meio dos resultados do gráfico 9 pode-se observar que a temperatura máxima (42 °C) é encontrada em janeiro/2013. Já a menor temperatura (9 °C) ocorre em agosto/2012. A temperatura média mensal observada em Botucatu-SP durante os doze meses apresenta temperaturas variando de 19 °C a 31,5 °C.

No gráfico 10 estão apresentadas as correlações de Pearson entre a temperatura média no dia da coleta e os teores médios de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC.

Gráfico 10 Correlação temperatura média *versus* teor de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC.



A correlação de Pearson demonstra que os teores totais de ácido gálico ($r = -0,2871$; $p > 0,05$), corilagina ($r = 0,0510$; $p > 0,05$), ácido elágico ($r = 0,2212$; $p > 0,05$) e AEGC ($r = 0,1663$; $p > 0,05$) das extrações aquosa, etanólica e hexano-acetato de etila) não apresentam correlação com a temperatura média no dia da coleta para o local estudado (Botucatu/SP), embora os valores do coeficiente de correlação (r) encontrados sejam negativo para o ácido gálico e positivo para corilagina, ácido elágico e AEGC. Estes resultados podem explicados pela insuficiência na coleta de dados, sendo necessária a informação da temperatura média mensal e não apenas no dia da coleta.

De acordo com Santos et al. (2006), os resultados das análises quimiométricas de cascas de espécies de barbatimão coletadas mensalmente na cidade de Goiânia-GO, durante um ano (Junho/1997 a Maio/1998) demonstraram que altos níveis de fenóis totais, taninos condensados e precipitação de proteínas ocorrem em outubro, dezembro, janeiro, fevereiro e março, meses de maiores

temperatura, umidade e precipitação na região de coleta no dado período, sugerindo que fatores ambientais podem afetar a produção de taninos em espécies de barbatimão, provavelmente pelo excesso de água ou pelo aumento da proliferação de insetos e micro-organismos patogênicos, sendo necessário o aumento dos níveis de defesas endógenas, como taninos condensados e fenóis em geral.

De acordo com Nascimento et al. (2008), a constituição química de espécies vegetais pode ser influenciada qualitativamente e quantitativamente por variações climáticas, com repercussão direta sobre a atividade biológica.

Fatores como temperatura e disponibilidade hídrica também têm influências significativas nos níveis de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Períodos de altas temperaturas são conhecidos pelo aumento no teor de compostos fenólicos em muitas plantas (MONTEIRO et al., 2006).

A ausência de diferenças qualitativas no perfil cromatográfico de compostos fenólicos durante a avaliação sazonal e a averiguação da diferença no teor dos compostos fenólicos quantificados é de suma importância para a cadeia produtiva de extratos vegetais. Desse forma, é possível garantir que durante todo o ano os marcadores de interesse para a atividade farmacológica requerida estarão presente no extrato padronizado. Da mesma maneira, é possível realizar coletas durante a época do ano cujo rendimento do extrato e teor de compostos fenólicos seja maior ou adequar a relação droga vegetal e extrato padronizado, devido a maior concentração de marcadores na planta.

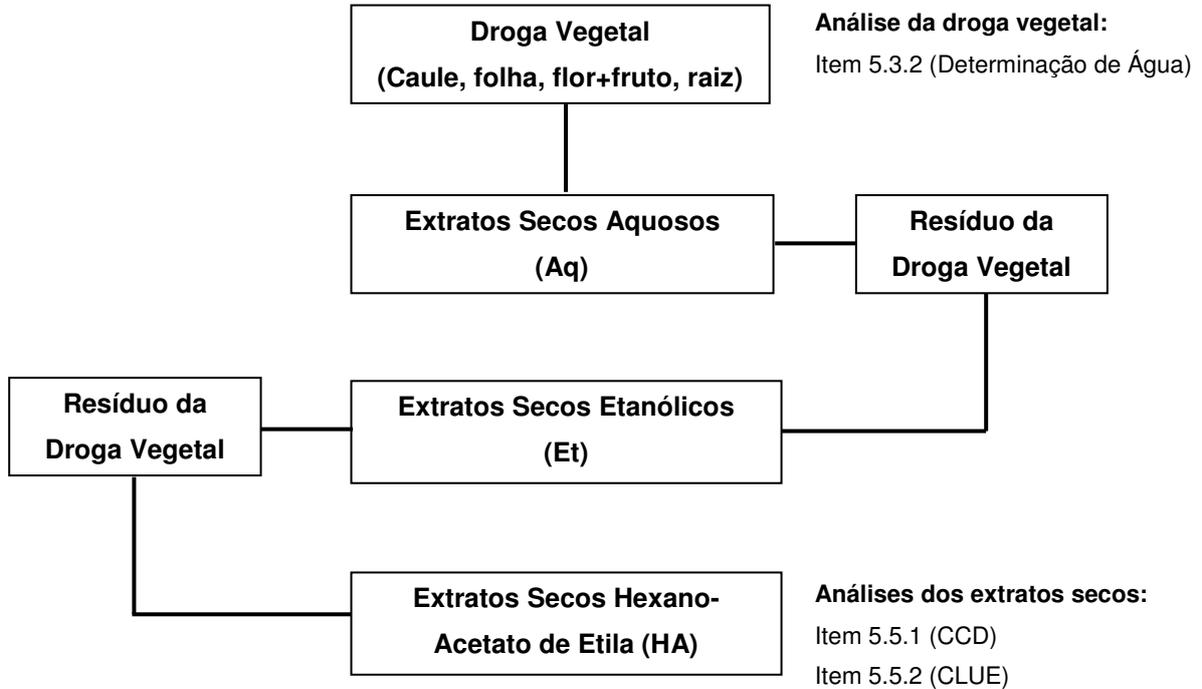
Segundo Santos e Mello (2004), o ácido elágico se origina da hidrólise ácida do hexa-hidróxi-difenoil-D-glicose (HHDP) - formado pelo acoplamento oxidativo de dois resíduos de ácido gálico - seguido de rearranjo espontâneo do intermediário formado. A relação praticamente constante do teor de ácido gálico durante os doze meses do ano (Teor médio = $1,63 \pm 0,33\%$), pode ser explicado devido a sua acumulação na planta para ser utilizado como precursor biossintético de corilagina e e ácido elágico.

6.4.3 Extratos Diferentes Órgãos

Foram utilizados 5 g de droga vegetal moída de cada parte da planta (caule, folha, flor+fruto, raiz) em extrações sequenciais com água purificada, etanol e hexano: acetato de etila (1:1), resultando em extratos secos aquosos (Aq), extratos

secos etanólicos (Et) e extratos secos hexano-acetato de etila (HA), respectivamente.

O fluxograma 3 representa a obtenção dos extratos de diferentes órgãos e respectivas análises realizadas.



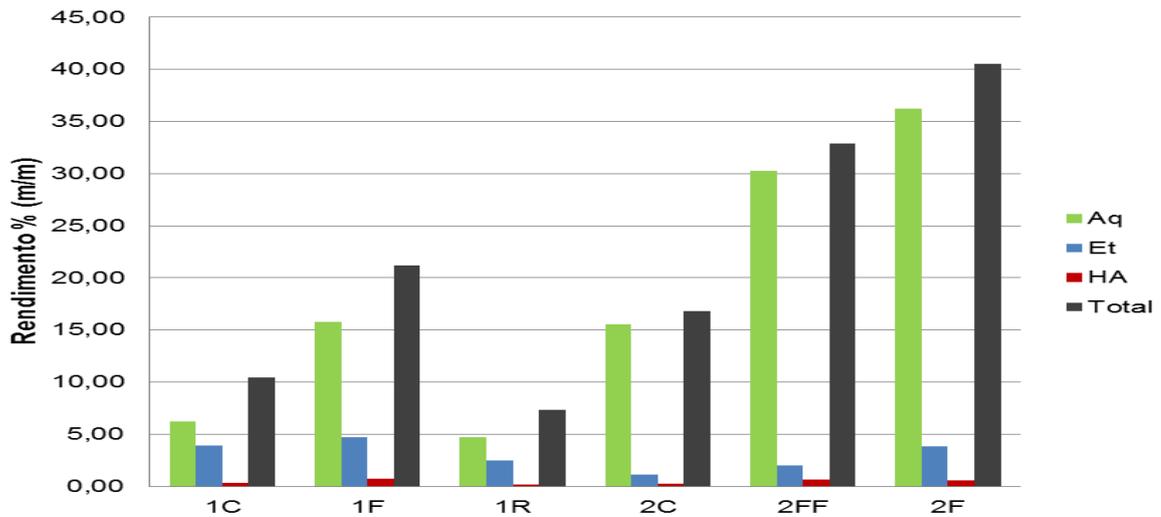
Fluxograma 3 Obtenção dos extratos de diferentes órgãos e respectivas análises.

Na tabela 15 estão apresentados os códigos de identificação dos extratos, divididos de acordo com o local de coleta e o órgão da planta estudado.

Tabela 15 Códigos para identificação dos extratos de diferentes órgãos de *P. niruri*.

Origem	Órgão da Planta	Extrato		
		Aquoso	Etanólico	Acetato de etila:hexano (1:1)
Centroflora	Caule	1CAq	1CEt	1CHA
Botucatu-SP	Folha	1FAq	1FEt	1FHA
Agosto	Raiz	1RAq	1REt	1RHA
CPQBA/UNICAMP	Caule	2CAq	2CEt	2CHA
Paulínia-SP	Flor+Fruto	2FFAq	2FFEt	2FFHA
Fevereiro	Folha	2FAq	2FEt	2FHA

No gráfico abaixo (Gráfico 11) seguem os rendimentos totais e de cada solvente extrator dos extratos de diferentes órgãos.

Gráfico 11 Rendimento extrações perfil diferentes órgãos de *P. niruri*.

O maior rendimento total encontrado foi obtido na amostra de folhas coletadas no CPQBA em fevereiro/2012 e o menor na amostra de raiz coletada na empresa Centroflora em agosto/2012 (Gráfico 11).

Pode-se concluir que tanto o rendimento da extração aquosa quanto o rendimento da extração total de caules e folhas coletados em fevereiro (códigos iniciados por 2) foi aproximadamente duas vezes maior do que os rendimentos da extração aquosa e total de caules e folhas coletados em agosto (códigos iniciados por 1). No estudo de sazonalidade com as partes aéreas os resultados também mostraram maior rendimento para o material coletado em fevereiro. Comparando-se os extratos etanólicos e hexano:acetato de etila 1:1 (v/v) de caules e folhas coletados nos diferentes meses, a relação se inverte, sendo que neste caso o rendimento apresentado na extração das partes coletadas em agosto foi um pouco maior.

Pode-se observar que o extrato aquoso é o que apresentou maior rendimento em todos os casos, o que está relacionado não apenas à solubilidade dos metabólitos de *P. niruri* em água quente (65 °C), mas também ao fato das extrações terem sido sequencias, sendo a água o primeiro líquido extrator utilizado. A mesma relação pode-se estabelecer ao se comparar o rendimento dos extratos etanólicos com os hexano:acetato de etila.

Comparando o rendimento das extrações com água e etanol de diferentes partes da droga vegetal coletadas em fevereiro (2), pode-se concluir que o rendimento foi maior na ordem folhas, flores+frutos e caule. Para a mistura hexano:acetato de etila 1:1, o rendimento da extração de flores+frutos foi superior ao

de folhas, o qual foi superior ao de caules. Comparando o rendimento das extrações de diferentes partes da droga vegetal coletadas em agosto (1), pode-se concluir que para todos líquidos extratores o rendimento da extração das folhas foi maior que o do caule, que por sua vez foi maior que o da raiz.

Rendimentos altos na extração de folhas e frutos de *P. niruri* foram obtidos por Harish e Shivanandappa (2006) com extrações sequenciais com água e metanol, sendo que para extração aquosa os rendimentos encontrados foram 56% e 32%, e para a extração metanólica foram 20% e 18,4%, respectivamente para folhas e frutos.

Através da cromatografia em camada delgada avaliou-se qualitativamente o perfil cromatográfico dos extratos de diferentes polaridades (Aq, Et e HA) e obtidos com as coletas realizadas em diferentes locais/épocas (Paulínia/Fevereiro e Botucatu/Agosto) e separadas em diferentes órgãos (folha, flor+fruto, raiz e caule).

A partir das placas obtidas segundo condição cromatográfica para taninos, observadas sob luz visível, os extratos aquosos de folhas (1FAq e 2FAq) e de flores+frutos (2FFAq) apresentaram mesmo perfil cromatográfico (3 manchas), que mostrou-se mais complexo do que os perfis de caules e raízes. Os extratos etanólicos apresentaram perfis mais simples.

Na observação sob luz UV 365 nm, 1FAq, 1CAq, 2FAq, 2CAq e 2FFAq mostraram perfil químico semelhante. O extrato 2FAq apresentou duas manchas fluorescentes ausentes nos outros extratos. 1RAq não demonstrou manchas.

Na observação da cromatoplaça sob luz UV 254 nm, tanto o extrato 1CAq quanto o 1FAq apresentaram 5 manchas cada, sendo 3 comuns entre eles. O extrato 1RAq não apresentou manchas. O extrato 2CAq e o extrato 2FFAq apresentaram as mesmas manchas que o extrato 1CAq. O extrato 2FAq apresentou as mesmas manchas que o extrato 1FAq.

As cromatoplaças observadas sob a luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm não estão aqui apresentadas.

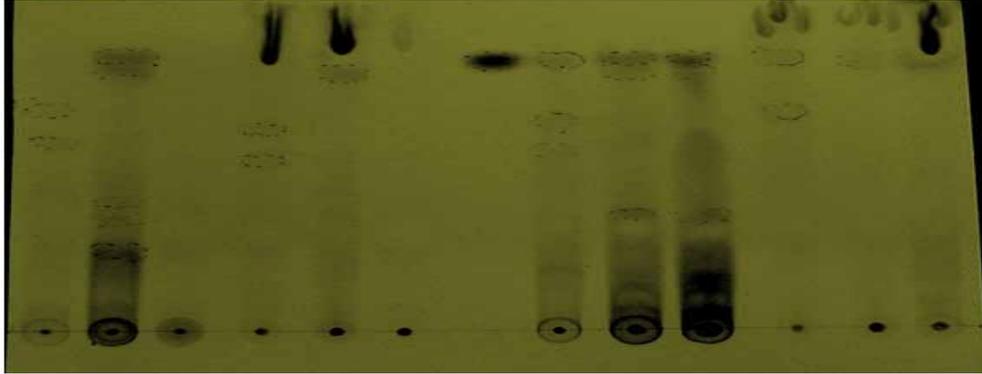


Figura 34 Cromatoplaça referente aos extratos diferentes órgãos: 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, ácido gálico, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, da esquerda para direita. Revelação com cloreto férrico 3%.

A observação da placa após a mesma ter sido revelada com cloreto férrico (Figura 34) demonstrou que os extratos aquosos de folhas e flores+frutos (5-6 manchas) possuem perfil químico semelhante de fenólicos e mais complexo do que o observado para caules e raízes (0-2 manchas).

O ácido gálico foi identificado em 1FAq, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt e 2FEt. Em 1CAq e nos extratos de raízes (1RAq e 1REt) o ácido gálico não foi identificado, demonstrando mais uma vez diferenças químicas dos materiais de diferentes coletas e entre partes aéreas e raízes.

Para lignanas, as placas obtidas mostram que os extratos aquosos não apresentaram manchas - força de eluição (ϵ) da FM muito baixa. Com a visualização sob luz visível, UV 365 nm e 254 nm os extratos etanólicos de caule (1CEt e 2CEt) e de folhas (1FEt e 2FEt), além de 1FHA apresentaram as mesmas 3 manchas. 2FFEt e 1REt não apresentaram manchas.

É interessante destacar o fato do extrato etanólico de flor+fruto não ter apresentado nenhuma mancha, uma vez que em grande parte das análises realizadas ele apresentou perfil de manchas semelhante ao apresentado pelo extrato de folhas.

As cromatoplaças observadas sob a luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm não estão aqui apresentadas.

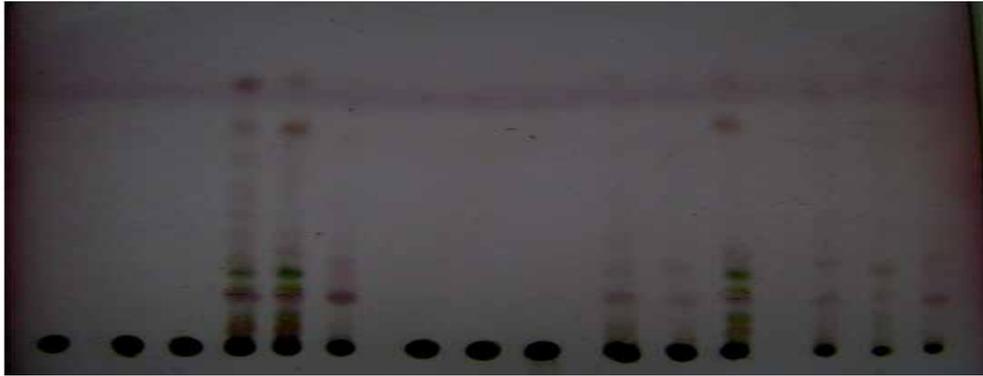


Figura 35 Cromatoplaça referente aos extratos diferentes órgãos: 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA, da esquerda para direita. Revelação com anisaldeído sulfúrico.

Após revelação com anisaldeído sulfúrico (Figura 35), 1CEt, 1FEt e 2FEt apresentaram o mesmo número de manchas (12), com perfil cromatográfico praticamente idêntico (valores de R_f e coloração das manchas); 1REt e 2FFEt apresentaram 4 manchas e 2CEt apresentou 7 manchas, sendo que de modo geral todas correspondentes às apresentadas pelos extratos de folhas. Da mesma forma, os extratos HA apresentaram as mesmas 4-5 manchas.

O revelador anisaldeído sulfúrico não é seletivo apenas para lignanas e, portanto, pode-se apenas sugerir a presença de lignanas, considerando-se também a fase móvel utilizada. Novamente, observou-se perfil químico mais simples para raízes.

Segundo Murugaiyah e Chan (2007), ao avaliarem o extrato metanólico de *P. niruri* por cromatografia líquida, a maior e menor concentração de lignanas é observada em folhas (2,47% m/m) e raízes (0,05% m/m), respectivamente.

Na condição de flavonoides (Figura 36), os extratos aquosos apresentaram 2 manchas com mesmo R_f , com exceção de 2FAq com uma mancha fluorescente adicional (365 nm; NP/PEG) e de 1CAq e 1RAq que não apresentaram manchas. Tanto 1CEt quanto 1FEt apresentaram as mesmas 4 manchas, sendo que 1REt não apresentou nenhuma mancha. Os extratos 2CEt, 2FFEt e 2FEt apresentaram cada um 5 manchas.

O padrão quercetina apresentou 2 manchas, sendo a maior correspondente à quercetina e a menor a um contaminante do padrão; cabe ressaltar que a concentração utilizada foi alta para a análise (mancha grande). Este flavonoide não foi identificado em nenhum dos extratos, da mesma forma que na análise da

sazonalidade, apesar do relato na literatura de sua ocorrência na espécie (CALIXTO et al., 2006).

As cromatoplasmas observadas sob a luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm não estão aqui apresentadas.

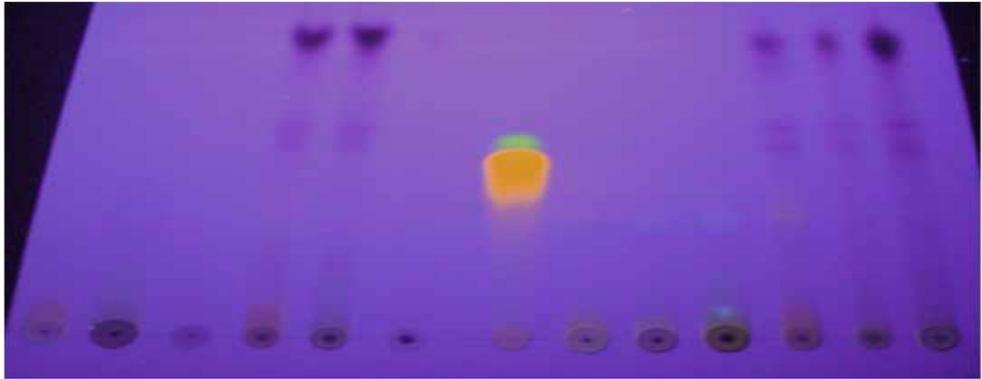


Figura 36 Cromatoplasma referente aos extratos de diferentes órgãos: 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, da esquerda para direita. Fase móvel: tolueno: acetato de etila: metanol: ácido acético 5,3: 4,0: 0,5: 0,2 v/v. Revelador NP/PEG sob luz UV 365 nm.

Sabir e Rocha (2008) descreveram a detecção de rutina, glicosídeo da quercetina, por CCD após revelação com cloreto de alumínio em análise de extrato metanólico de folhas de *P. niruri*.

Para terpenos, tanto na visualização sob luz visível quanto após a revelação com anisaldeído sulfúrico (Figura 37), os extratos aquosos não apresentaram nenhuma mancha.

Na visualização, percebe-se que 1FEt apresenta 2 manchas (amarelas) a mais que 1CEt, estando uma muito próxima a origem (é a segunda mancha observada) e a outra no limite da distância total de eluição. As outras manchas apresentadas por 1FEt são correspondentes às manchas apresentadas por 1CEt. No extrato de raízes não foram evidenciadas manchas. 2CEt e 2FEt apresentaram perfil semelhante entre si, e semelhante ao extrato 1CEt; 2FFEt apresentou 1 mancha a menos do que estes extratos. Comparando 1FEt e 2FEt, é interessante ressaltar que as 2 manchas amarelas já citadas em 1FEt não estão presentes em 2FEt, o que é outra evidência da variabilidade da produção de metabolitos secundários. Em relação aos extratos HA, somente 1FHA apresentou manchas, tendo perfil semelhante à 1CEt/2CEt.

As cromatoplacas observadas sob a luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm não estão aqui apresentadas.

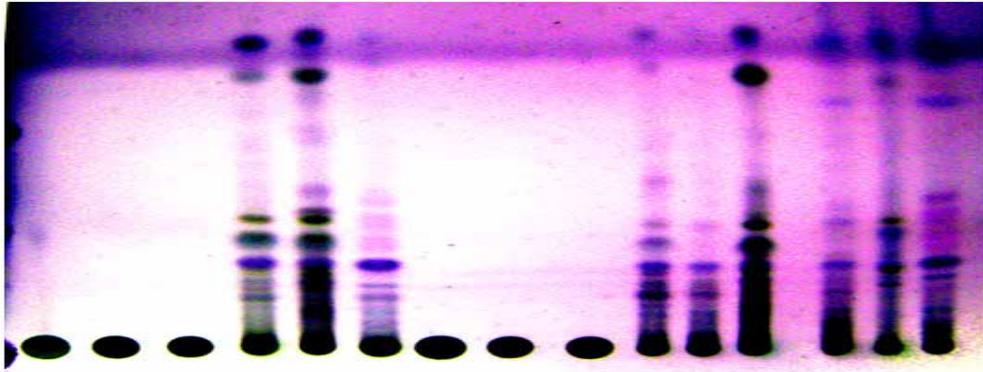


Figura 37 Cromatoplaca referente aos extratos diferentes órgãos: 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA, da esquerda para direita. Revelação com anisaldeído sulfúrico.

Os perfis cromatográficos após revelação com anisaldeído sulfúrico demonstraram maior complexidade. Os perfis de extratos Et e HA de folhas e caules foram semelhantes. Já os extratos de raízes e flores+frutos apresentaram menor complexidade e, em geral, suas manchas corresponderam às observadas nos outros órgãos.

A presença de taninos, flavonoides e terpenos é relatada por Nascimento e colaboradores (2008) em análises por CCD de extrato de etanólico de partes aéreas de *P. niruri*.

Nas figuras 38 e 39 estão representados os perfis cromatográficos por CLUEDAD, processados em 267 nm, das amostras de diferentes órgãos das coletas realizadas em Botucatu/SP (1) e Paulínia/SP (2) das extrações aquosa (Aq) e etanólica (Et), respectivamente.

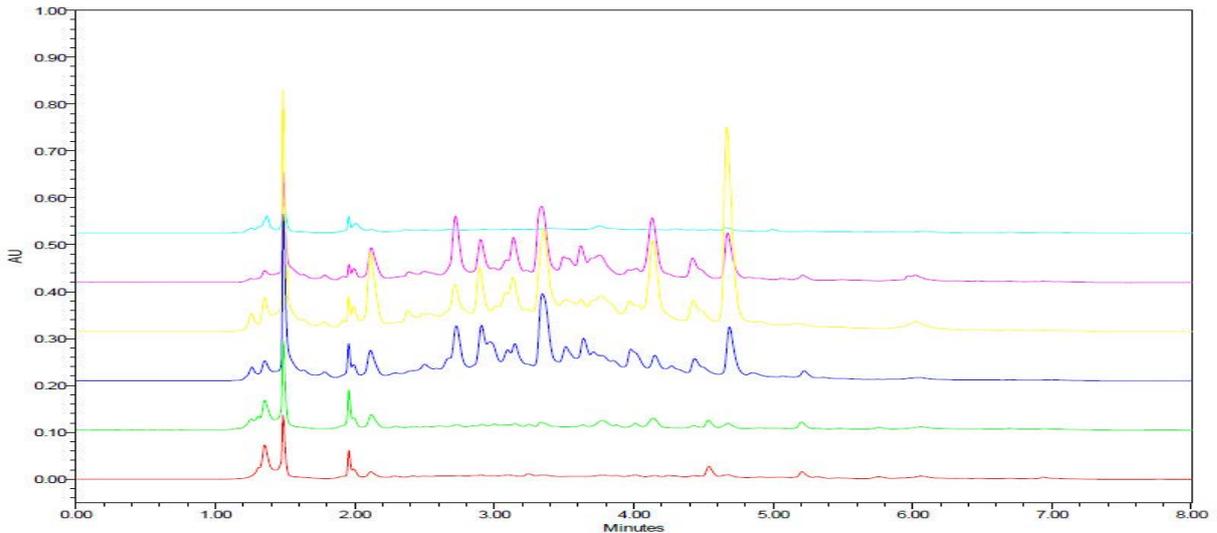


Figura 38 Cromatogramas dos extratos aquosos (Aq) dos diferentes órgãos: 1CAq, 2CAq, 2FFAq, 1FAq, 2FAq e 1RAq sobrepostos, de baixo para cima (t_R ácido gálico = 2,1 min; t_R corilagina = 3,4 min; t_R ácido elágico = 4,7).

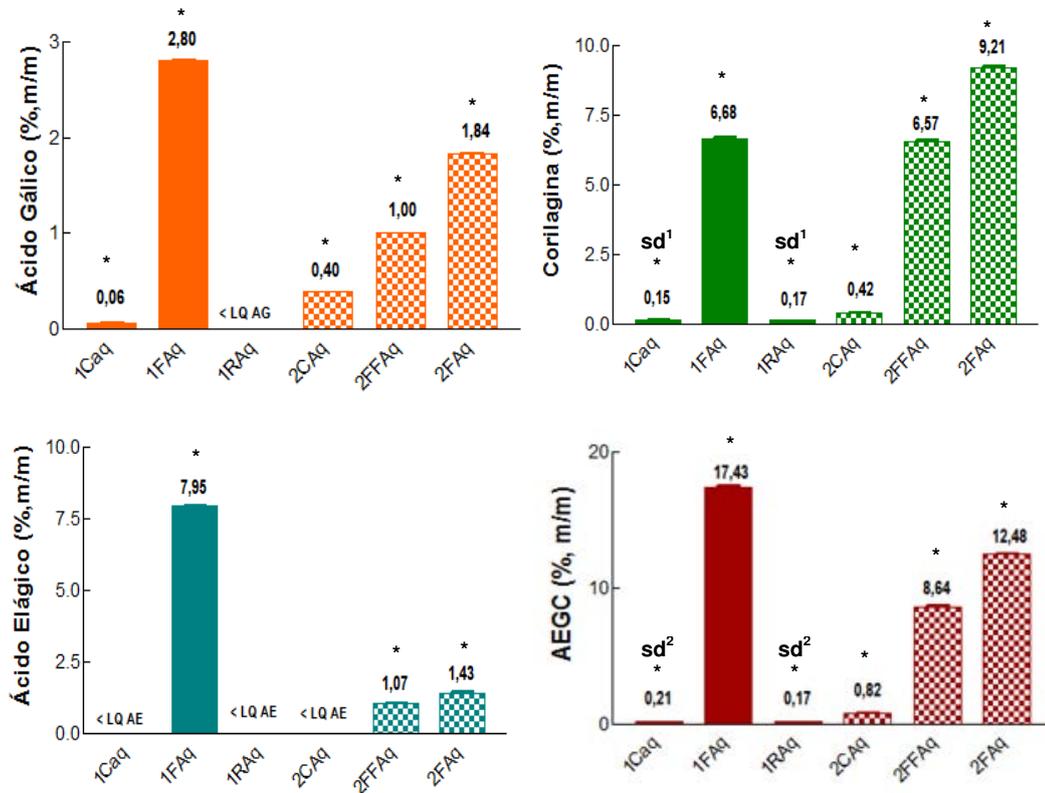
Por meio dos cromatogramas acima pode-se perceber que o perfil cromatográfico de caule (1CAq e 2CAq) e raiz (1RAq) na extração aquosa são qualitativa (número de picos) e quantitativamente (área dos picos) diferentes de folhas (1FAq e 2FAq) e flor+fruto (2FFAq).

Segundo Couto et al. (2013a), o perfil cromatográfico por CLAE do extrato seco aquoso de diferentes partes (folhas, caule, raízes, folhas+caule e planta inteira) de *P. niruri* demonstrou que folhas, caules e a mistura de folhas+caule apresentam perfil muito similar, enquanto diferenças qualitativas e quantitativas foram observados no perfil de raízes.

Os gráficos 12 e 13, relacionam os teores médios em porcentagem (m/m) dos marcadores ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC das amostras de diferentes locais de coleta e diferentes órgãos, das extrações aquosa (Aq) e etanólica (Et).

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão de três determinações e foram analisados estatisticamente usando análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste de *Tukey*. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

Gráfico 12 Teor de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC em Aq diferentes órgãos.



* Médias apresentam diferenças significativas entre si $p < 0,05$

sd Médias com mesmo número não apresentam diferenças significativas entre si $p > 0,05$

< LQ AG Menor que o limite de quantificação para ácido gálico

< LQ AE Menor que o limite de quantificação para ácido elágico

Pela análise estatística observa-se que há menor teor de ácido gálico, corilagina e AEGC, bem como ausência de ácido elágico, em caules (1CAq e 2CAq) e raízes (1RAq). O teor de ácido gálico, ácido elágico e AEGC apresenta-se maior nas folhas da coleta de Botucatu/SP (1FAq), sendo 2,8% m/m, 7,95% m/m e 17,43% m/m, respectivamente. No entanto, o teor de corilagina (9,21% m/m) apresenta-se maior nas folhas da coleta de Paulínia/SP (2FAq).

O teor de ácido gálico encontrado no caule variou de 0,06% m/m (1CAq) a 0,40% m/m (2CAq), nas folhas oscilou de 1,84% m/m (2FAq) a 2,80% m/m (1FAq) e nas raízes não pode ser quantificado por estar abaixo do limite de quantificação. Estes resultados diferem dos obtidos por Couto e colaboradores (2013a), os quais realizaram a quantificação de ácido gálico no extrato seco aquoso de diferentes partes (folhas, caule, raízes, folhas+caule e planta inteira) de *P. niruri* sendo obtido os seguintes resultados: 0,22% m/m no caule, 0,62% m/m nas folhas, 0,06% m/m

nas raízes, 0,48% m/m na mistura folhas+caule e 0,34% m/m na planta inteira. De Souza et al. (2002) realizaram a quantificação de ácido gálico em extrato aquoso de folhas e ramos de *P. niruri* e também apresentaram maior teor deste marcador nas folhas (177 µg/mL).

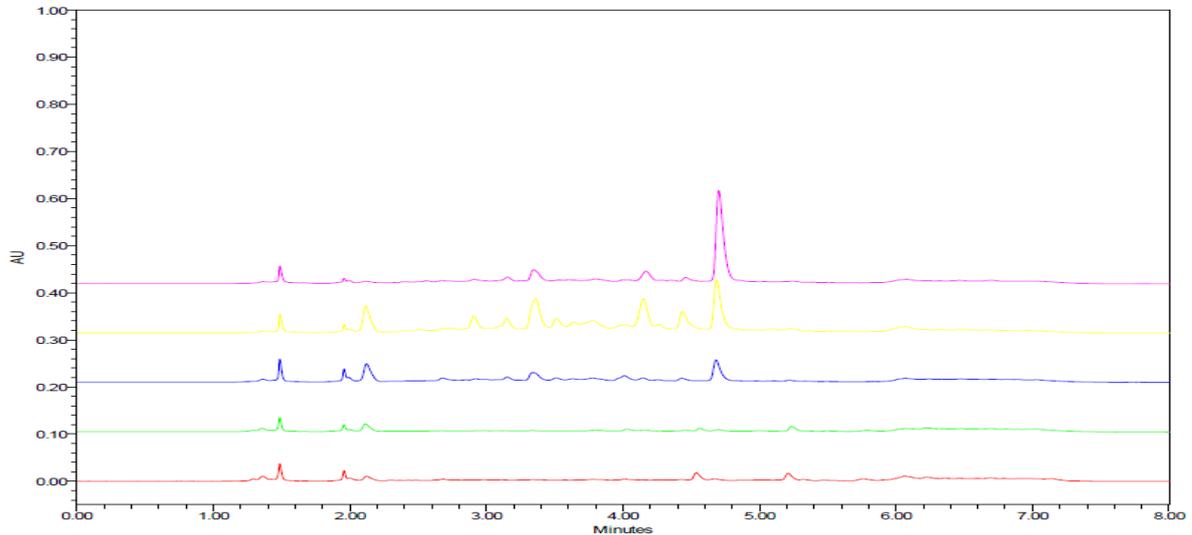
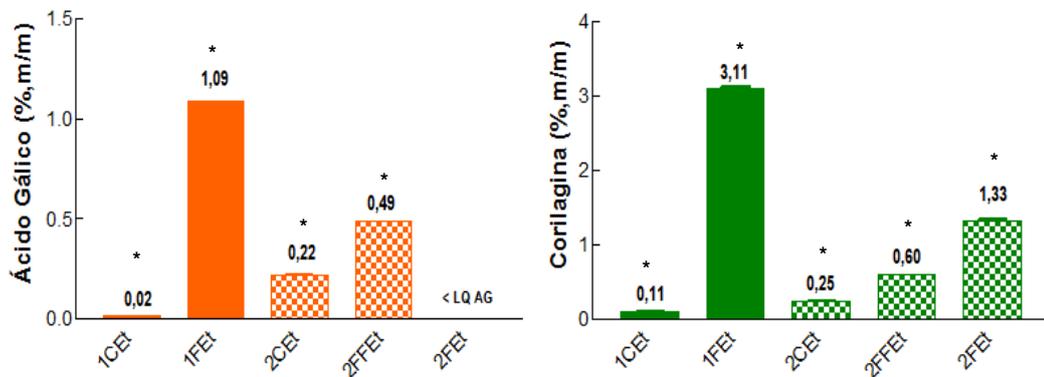
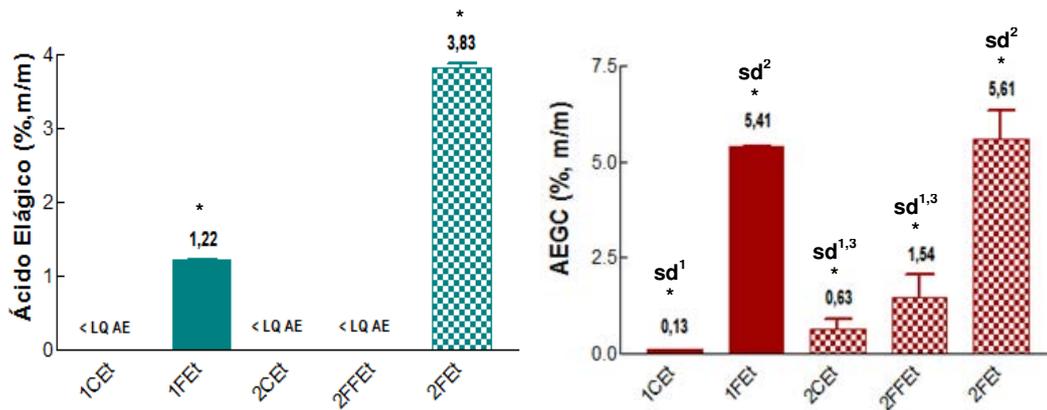


Figura 39 Cromatogramas dos extratos etanólicos (Et) dos diferentes órgãos: 1CEt, 2CEt, 2FFEt, 1FEt e 2FEt sobrepostos, de baixo para cima (t_R ácido gálico = 2,1 min; t_R corilagina = 3,4 min; t_R ácido elágico = 4,7).

Na extração etanólica o perfil cromatográfico de caule (1CEt e 2CEt) também apresenta-se diferentes das folhas (1FEt e 2FEt) e flor+fruto (2FFEt).

Gráfico 13 Teor de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC em Et diferentes órgãos.





* Médias apresentam diferenças significativas entre si $p < 0,05$

sd Médias com mesmo número não apresentam diferenças significativas entre si $p > 0,05$

< LQ AG Menor que o limite de quantificação para ácido gálico

< LQ AE Menor que o limite de quantificação para ácido elágico

Em todos os extratos foram identificados os padrões utilizados, mas em algumas amostras não foi possível quantificá-los. Com relação ao ácido elágico, o mesmo foi quantificado apenas nos extratos de folhas e flores+frutos, sendo o maior teor observado para 1FAq (7,95% m/m); 2FAq apresentou teor de 1,43% m/m.

Os extratos de folhas apresentaram as maiores proporções de ácido gálico, porém, comparando-se os extratos produzidos com material vegetal coletado em diferentes condições, o extrato de folhas coletado em agosto (1FAq) apresentou novamente maior conteúdo do que o correspondente coletado em fevereiro (2FAq). Em relação ao ácido gálico, os extratos de caule apresentaram teores menores; nos extratos 1RAq e 2FEt não foi possível quantificá-lo. Nos extratos de caules produzidos com material vegetal coletado em fevereiro, foram detectados de 5,2 a 11,4 vezes mais ácido gálico do que nos respectivos extratos produzidos com o material vegetal colhido em agosto.

Com relação à corilagina, em todas as amostras foi possível sua quantificação. A amostra que apresentou o menor conteúdo foi a 1RAq, seguida pelas amostras de caule. Outra vez os extratos aquosos de folhas apresentaram os maiores teores. As amostras 2CAq e 2CEt apresentaram maior conteúdo de corilagina do que 1CAq e 2CEt, tendo essa variação sido de aproximadamente 1,7 vezes para os extratos aquosos e 2,0 vezes para os extratos etanólicos.

Com relação aos perfis cromatográficos observados nos cromatogramas (Figuras 38 e 39), os extratos de folhas e frutos+flores apresentaram perfis mais complexos e similares entre si, em oposição aos extratos de caules e raiz.

Os diferentes órgãos vegetais, bem como a idade e o desenvolvimento da planta são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (GOBBO-NETO, LOPES; 2007).

6.5 Fracionamentos e Análises Cromatográficas

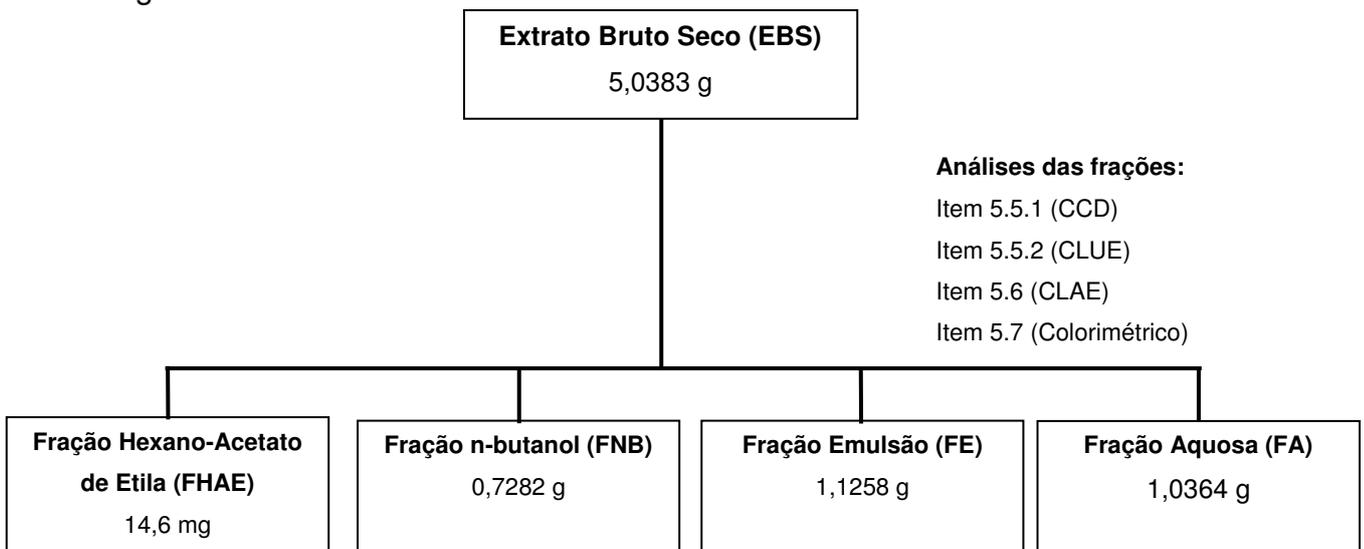
6.5.1 Partição Líquido – Líquido

Após a obtenção de um extrato, este pode ser submetido a um processo de partição líquido-líquido como procedimento de fracionamento inicial, com solventes de polaridades crescentes, com o intuito de realizar uma separação de substâncias por meio de suas polaridades em um número pequeno de frações ainda bastante complexas. A partição realiza uma dissolução seletiva e distribuição entre as fases de dois líquidos imiscíveis (SANTOS, MELLO, 2004).

Na partição líquido-líquido o extrato seco bruto (EBS) foi solubilizado em água purificada e submetido ao fracionamento com hexano-acetato de etila e n-butanol, sequencialmente.

Durante a partição líquido-líquido houve a formação de uma fase intermediária com aspecto de emulsão, esta foi separada das demais e denominada fração emulsão (FE).

A obtenção das frações e respectivas quantidades encontram-se no fluxograma 4.



Fluxograma 4 Fracionamento por partição líquido-líquido.

Na tabela 16 estão representados os rendimentos das frações obtidas por partição líquido – líquido.

Tabela 16 Rendimento partição líquido-líquido

Fração	Rendimento % (m/m)
Hexano-acetato de etila (FHA)	0,29
n-butanol (FNB)	14,45
Emulsão (FE)	22,34
Aquosa (FA)	20,57
<i>Total das Frações</i>	<i>57,65</i>

O menor rendimento encontrado foi o da fração FHAEE, possivelmente devido a presença de pequena quantidade de compostos apolares e solúveis em hexano - acetato de etila. No entanto, a fração com maior rendimento é a FE, a qual apresenta polaridade intermediária.

O rendimento total ficou abaixo de 60%, sendo que as frações FE e FA representam juntas quase 75% deste total.

Cimanga et al. (2004) obtiveram 78,9% de rendimento em partição líquido-líquido de extrato etanólico da planta inteira de *P. niruri*, sendo que a fração de maior rendimento foi a mais apolar, sendo diclorometano o solvente responsável pelo rendimento de 32,3% enquanto a fração aquosa representou 16,2% de rendimento.

Através da CCD foi avaliado qualitativamente o perfil cromatográfico das frações obtidas com o fracionamento por partição líquido – líquido para as classes de metabólitos secundários: taninos, flavonoides, lignanas e terpenos.

Segundo a condição cromatográfica para taninos, foram observadas diferenças no perfil químico entre as frações FE, FHAEE, FA e FNB sob luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm (cromatoplasmas não apresentadas) e após revelação com cloreto férrico a 3% em observação sob luz visível (Figura 40).

Na figura 40 é possível visualizar presença da mancha de ácido gálico ($R_f = 0,71$) nas frações FA e FNB, e ausência nas frações FHAEE e FE. A mancha semelhante ao padrão quercetina ($R_f = 0,78$) não foi identificado em nenhuma das frações, e a mancha semelhante ao do padrão rutina ($R_f = 0,14$) não aparece com nitidez nas frações FE, FA e FNB, não sendo possível afirmar que se trata de rutina.

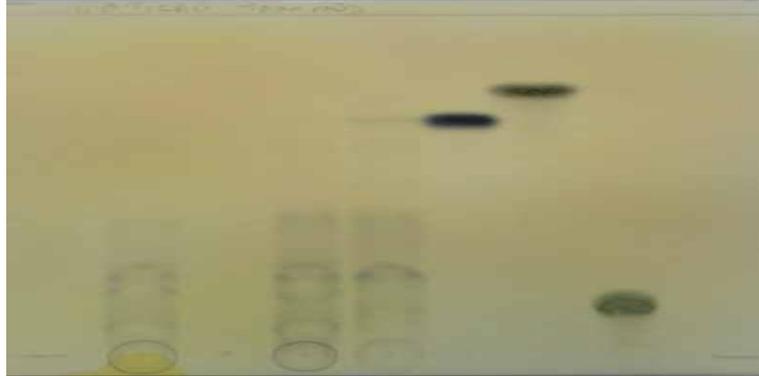


Figura 40 Cromatoplaça referente às frações FE, FHAE, FA e FNB da partição líquido-líquido, ácido gálico, quercetina e rutina da esquerda para direita. Revelador cloreto férrico 3%.

Para lignanas, não foram observadas diferenças no perfil químico entre as frações FE, FHAE FA e FNB sob luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm (cromatoplaças não apresentadas).

No entanto, após revelação com anisaldeído sulfúrico em observação sob luz visível (Figura 41) foi possível visualizar a existência de uma mancha bem delimitada com R_f de 0,32 e outras manchas menos intensas em sobreposição uma nas outras, na fração FHAE. Nas demais frações não apareceu nenhuma mancha.



Figura 41 Cromatoplaça referente às frações FE, FHAE, FA e FNB da partição líquido-líquido. Revelador anisaldeído sulfúrico.

Para a classe de flavonoides, foram observadas diferenças no perfil em CCD entre as frações FE, FHAE, FA e FNB sob luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm (cromatoplaças não apresentadas) e após revelação com NP/PEG em observação sob luz visível (Figura 42).

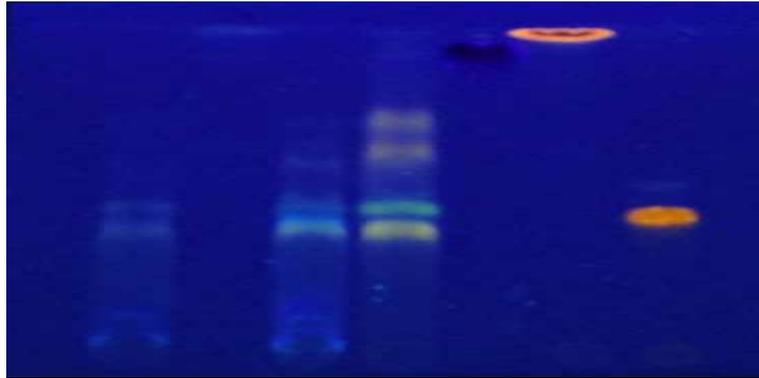


Figura 42 Cromatoplaça referente às frações FE, FHAE, FA e FNB da partição líquido-líquido, ácido gálico, quercetina e rutina da esquerda para direita. Fase móvel: acetato de etila: acetona: ácido acético: água 6:2:1:1 v/v. Revelador NP/PEG sob luz UV 365 nm.

Na figura 42 é possível visualizar a presença de mancha com R_f próximo ao do padrão rutina ($R_f = 0,43$) nas frações FE, FA e FNB, no entanto a coloração alaranjada da rutina não é a mesma das manchas presente nas frações.

Verifica-se a ausência de qualquer mancha na fração FHAE e nas frações FE, FA e FNB não pode ser visualizada manchas com R_f semelhante aos padrões ácido gálico ($R_f = 0,89$) e quercetina ($R_f = 0,96$).

Já na fração FNB podemos visualizar quatro manchas bem delimitadas com coloração características de flavonoides nos R_f 0,36, 0,44, 0,60 e 0,71.

Nas cromatoplaças segundo condição cromatográfica para terpenos, não foram encontradas diferenças no perfil químico entre as frações FE, FHAE FA e FNB sob luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm (cromatoplaças não apresentadas).

No entanto, após revelação com anisaldeído sulfúrico em observação sob luz visível (Figura 43) foi possível visualizar a existência de três manchas bem delimitadas com R_f de 0,24, 0,27 e 0,28, respectivamente, na fração FHAE. Nas demais frações não há nenhuma mancha.

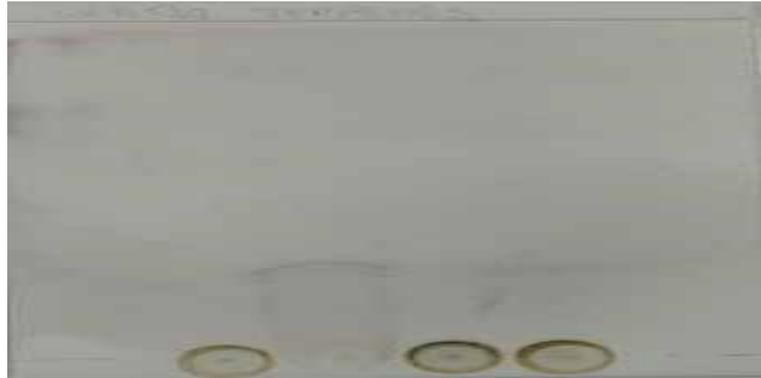


Figura 43 Cromatoplaça referente às frações FE, FHAE, FA e FNB da partição líquido-líquido. Revelador anisaldeído sulfúrico.

Análises fitoquímicas realizadas em extrato etanólico de *P. niruri* fracionado por partição líquido-líquido revelaram presença de terpenos e/ou esteróis na fração diclorometano e flavonoides em fração alcóolica isoamilica (CIMANGA et al., 2004).

A figura 44 apresenta o perfil cromatográfico por CLUE-DAD processados em 267 nm das frações FE, FHAE, FA e FNB, obtidas na partição líquido – líquido.

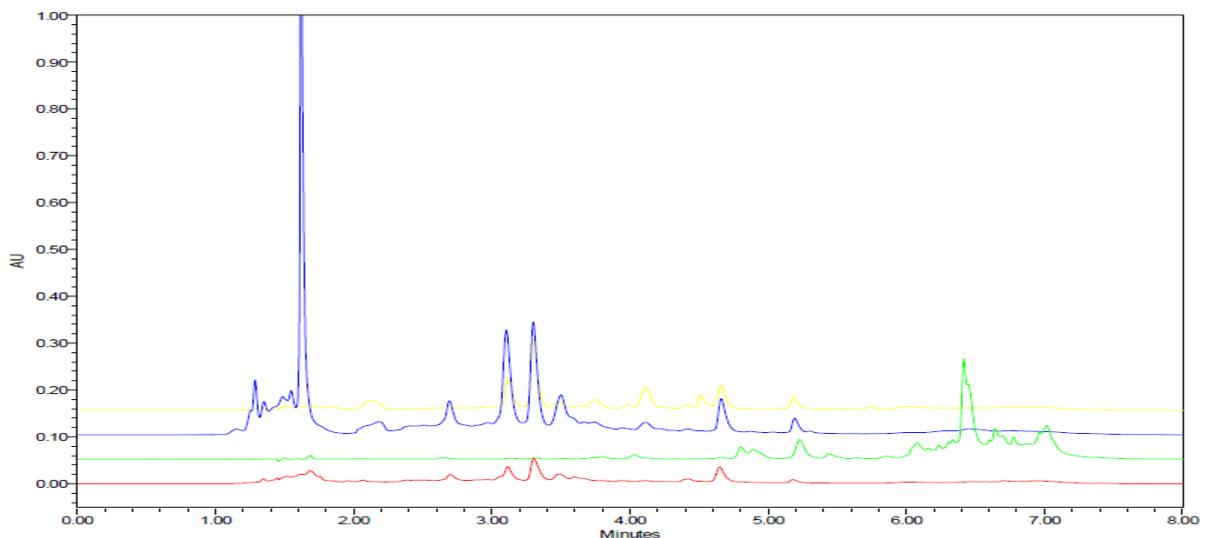


Figura 44 Cromatogramas das frações obtidas por partição líquido-líquido FE, FHAE, FA e FNB sobrepostos, de baixo para cima (t_R ácido gálico = 2,0 min; t_R corilagina = 3,3 min; t_R ácido elágico = 4,7).

É possível observar no cromatograma acima que existem diferenças qualitativas significativas entre as frações, em que a fração FHAE é a única a apresentar picos com t_R maior do que 6 min.

Na tabela 17, estão relacionados teores médios em porcentagem (m/m) de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC (somatória de ácido elágico, ácido gálico e corilagina) nas frações obtidas por partição líquido-líquido.

Tabela 17 Teor de ácido gálico, corilagina e ácido elágico e AEGC em amostras de fracionamento por partição líquido - líquido.

Amostra	Ácido gálico (%, m/m)	Corilagina (%, m/m)	Ácido elágico (%, m/m)	AEGC (%, m/m)
FE	< LQ	0,96±0,00	< LQ	0,96±0,00
FHAE	< LD	0,07±0,00	< LQ	0,07±0,00
FA	0,05±0,01	1,72±0,00	0,10±0,01	1,88±0,01
FNB	1,04±0,04	8,22±0,05	< LQ	9,27±0,08

< LQ – Menor que o limite de quantificação.

< LD – Menor que o limite de detecção

Foi possível a quantificação da corilagina em todas as frações, sendo que a fração FNB apresenta alta concentração deste marcador, aproximadamente 8,22% m/m. Já nas frações FE, FHAE e FNB o ácido elágico não pode ser quantificado pois está em concentração menor que o limite de quantificação nestas frações. O ácido gálico não foi detectado na FHAE, e não pode ser quantificado na FE, por estar em concentração menor que os limites de detecção e quantificação, respectivamente. O maior teor de AEGC (9,27%, m/m) está presente na fração FNB.

Ueno et al. (1988) realizaram partição líquido-líquido de extrato etanólico de *P. niruri* com hexano, clorofórmio e n-butanol, sendo que a fração n-butanol obtida foi posteriormente fracionada em coluna cromatográfica contendo Sephadex LH-20, obtendo-se ácido gálico, ácido elágico e geraniina. Vale ressaltar que a corilagina é um precursor da geraniina (BAGALKOTKAR et al., 2006).

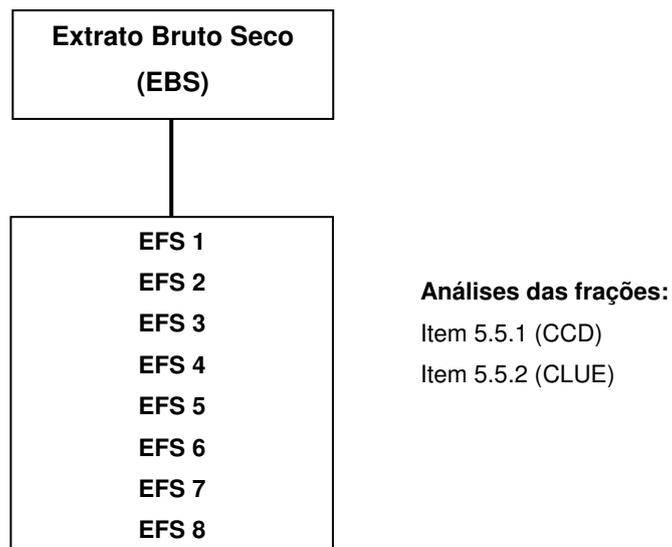
Agyare et al (2011) obtiveram ácido gálico, corilagina, geraniina, furosina e alguns flavonoides glicosilados a partir de fracionamento por partição líquido-líquido de extrato metanólico de *P. muellerianus* com diclorometano e acetato de etila, seguido de cromatografia em coluna contendo Sephadex LH-20.

O perfil químico das frações FA, FE e FNB obtidas por partição líquido-líquido demonstra predominância de flavonoides e taninos, sendo que a fração FNB possui alta porcentagem de corilagina, AEGC e maior número de flavonoides (CCD).

6.5.2 Extração em Fase Sólida

Outro método de fracionamento inicial de extratos é a extração em fase sólida (EFS) que consiste num método similar à cromatografia em coluna, porém com menor eficiência, permitindo obter pequeno número de frações do extrato ainda complexas, mas com perfil químico distinto.

O fluxograma 5 representa a obtenção das frações por partição extração em fase sólida e análises realizadas.



Fluxograma 5 Fracionamento por extração em fase sólida.

Realizou-se o fracionamento de 4,07 g do extrato seco bruto (EBS) por EFS sendo que na tabela 18 estão representadas as frações obtidas, seus respectivos solventes de eluição, as quantidades obtidas, bem como o rendimento das mesmas.

Tabela 18 Rendimento da extração em fase sólida

Fração	Eluente (v/v)	Massa (g)	Rendimento % (m/m)
EFS 1	acetato de etila	0,0257	0,63
EFS 2	acetato de etila: metanol 90:10	0,0306	0,75
EFS 3	acetato de etila: metanol 80:20	0,0890	2,19
EFS 4	acetato de etila: metanol 60:40	0,3012	7,40
EFS 5	acetato de etila: metanol 40:60	0,2302	5,95
EFS 6	acetato de etila: metanol 20:80	0,2809	6,90
EFS 7	metanol	0,2980	7,32
EFS 8	água	1,4706	36,12
<i>Total das Frações</i>		<i>2,7262</i>	<i>66,96</i>

O maior rendimento obtido foi da fração EFS8, eluída com água, e o rendimento total ficou em torno de 67%.

Por CCD foi avaliado qualitativamente o perfil cromatográfico das frações EFS para taninos, flavonoides, lignanas e terpenos.

Nas condições cromatográficas de taninos, foram observadas diferenças no perfil químico entre as frações EFS1 a EFS8 sob luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm (cromatoplasmas não apresentadas) e após revelação com cloreto férrico a 3% em observação sob luz visível (Figura 45).

Na figura 45 é possível visualizar presença da mancha de ácido gálico ($R_f = 0,71$) nas frações EFS1 a EFS8, sendo que intensidade da mancha varia entre as mesmas. A mancha semelhante ao padrão quercetina ($R_f = 0,78$) não foi identificada em nenhuma das frações, e a mancha semelhante ao do padrão rutina ($R_f = 0,14$) não aparece com nitidez nas frações EFS1 a EFS8, não sendo possível afirmar que se trata de rutina.

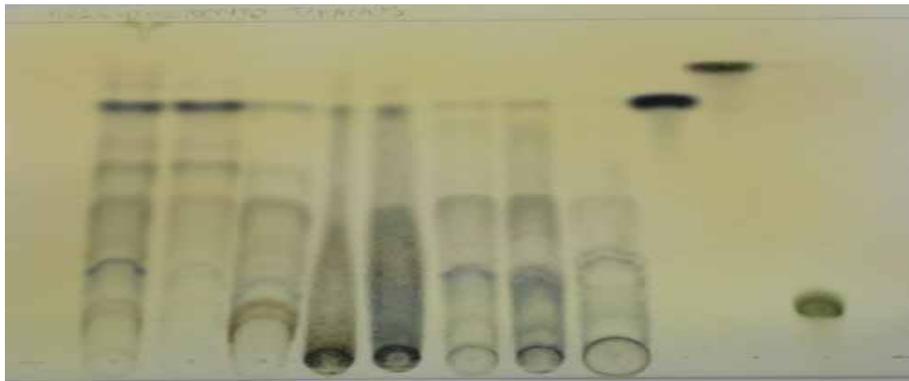


Figura 45 Cromatoplasma referente às frações EFS1 a EFS8, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para direita. Revelador cloreto férrico 3%.

Para lignanas, não foram encontradas diferenças no perfil químico entre as frações as frações EFS1 a EFS8 sob luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm (cromatoplasmas não apresentadas).

No entanto, após revelação com anisaldeído sulfúrico e observação sob luz visível (Figura 46) foi possível visualizar a existência de três manchas com R_f de 0,37, 0,51 e 0,90, respectivamente, na fração EFS1, uma mancha bem delimitada com R_f de 0,90 na fração EFS2, e uma mancha com R_f de 0,13 na fração EFS6. Nas demais frações não apareceu nenhuma mancha.

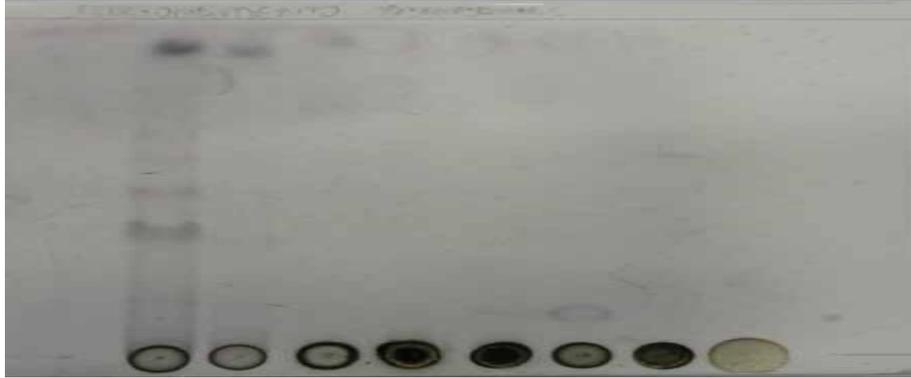


Figura 46 Cromatoplaça referente às frações EFS1 a EFS8, da esquerda para direita. Revelador anisaldeído sulfúrico.

Kassuya et al. (2003) obtiveram frações ricas em lignanas através do fracionamento por EFS com sílica gel 60 de extrato hexânico de *P. amarus*.

Para a classe de flavonoides, foram observadas diferenças no perfil em CCD entre as frações EFS1 a EFS8 sob luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm (cromatoplaças não apresentadas) e após revelação com NP/PEG em observação sob luz visível (Figura 47).

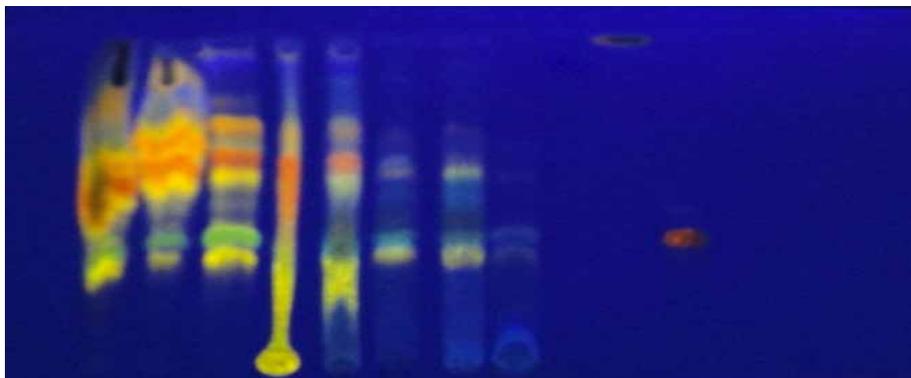


Figura 47 Cromatoplaça referente às frações EFS1 a EFS8, ácido gálico, quercetina e rutina, da esquerda para direita. Fase móvel: acetato de etila: acetona: ácido acético: água 6:2:1:1 v/v. Revelador NP/PEG sob luz UV 365 nm.

Na figura 47 é possível visualizar a presença de mancha com R_f próximo ao do padrão rutina ($R_f = 0,43$) em todas as frações (EFS1 a EFS8), no entanto com coloração diferente da coloração alaranjada da rutina.

As frações EFS1 e EFS2 apresentam manchas com coloração características de flavonoides, no entanto não apresentam boa resolução provavelmente devido a alta concentração deste nestas frações e/ou devido à quantidade aplicada. Já na fração EFS3 as manchas estão melhor resolvidas, sendo possível observar a

presença de oito manchas com R_f variando de 0,31 a 0,93. Ácido gálico e quercetina não foram observados em nenhuma das frações.

Nas cromatoplasas segundo condição cromatográfica para terpenos, não foram encontradas diferenças no perfil químico entre as frações EFS2 a EFS8 sob luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm (cromatoplasas não apresentadas), pois todas as manchas apresentam-se no ponto de aplicação. No entanto, na fração EFS1 é possível observar a presença de manchas já sob luz visível, luz UV 365 nm e 254 nm.

No entanto, após revelação com anisaldeído sulfúrico em observação sob luz visível (Figura 48) foi possível visualizar a existência de quatro manchas bem delimitadas com R_f de 0,25, 0,29, 0,72 e 0,96, respectivamente, na fração EFS1. Na fração EFS6 observa-se uma mancha com R_f de 0,25. Nas demais frações não há presença de manchas.



Figura 48 Cromatoplasa referente às frações EFS1 a EFS8, da esquerda para a direita. Revelador anisaldeído sulfúrico.

Os perfis cromatográficos por CLUE-DAD das frações EFS1 a EFS8 obtidas na extração em fase sólida, processados em 267 nm, está representado pela figura 49. É possível observar que existem diferenças qualitativas significativas entre as frações.

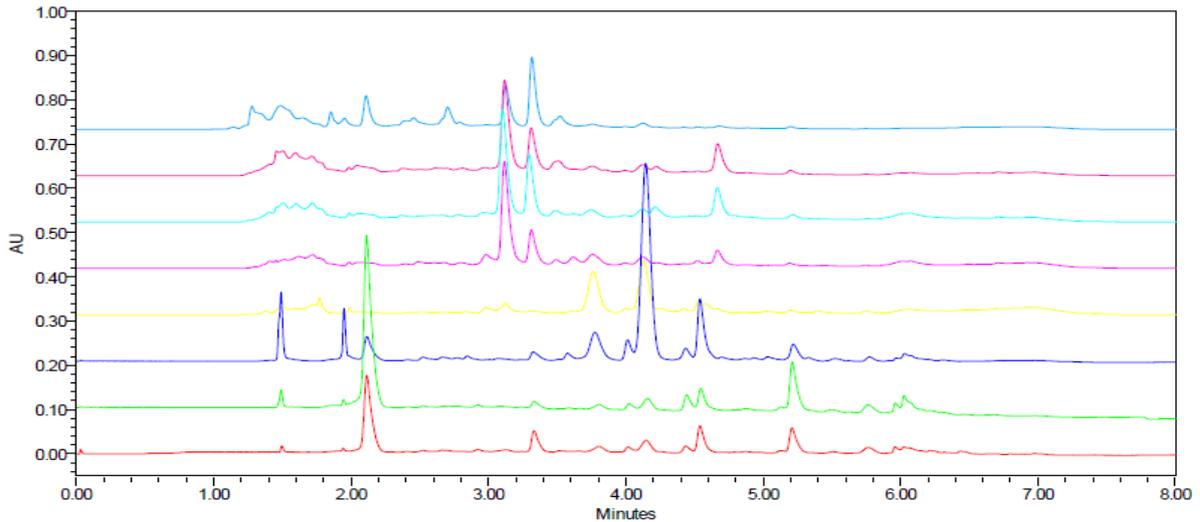


Figura 49 Cromatogramas das frações EFS1 a EFS8, sobrepostos, de baixo para cima (t_R ácido gálico = 2,2 min; t_R corilagina = 3,3 min; t_R ácido elágico = 4,7).

Na tabela 19, estão relacionados os teores médios em porcentagem (m/m) de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC (soma de ácido elágico, ácido gálico e corilagina) nas frações obtidas por extração em fase sólida.

Tabela 19 Teor de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e AEGC em amostras de fracionamento por extração em fase sólida.

Amostra	Ácido gálico (%, m/m)	Corilagina (%, m/m)	Ácido elágico (%, m/m)	AEGC (%, m/m)
EFS 1	9,36±0,05	4,23±0,03	< LQ	13,59±0,04
EFS 2	18,62±0,21	1,35±0,03	< LQ	19,97±0,21
EFS 3	0,74±0,00	0,61±0,00	1,04±0,01	1,34±0,00
EFS 4	< LQ	0,11±0,00	< LQ	0,11±0,00
EFS 5	< LQ	1,45±0,01	< LQ	1,45±0,01
EFS 6	< LQ	2,04±0,01	0,12±0,00	2,17±0,01
EFS 7	< LD	0,69±0,00	0,08±0,00	0,77±0,00
EFS 8	0,20±0,00	0,85±0,00	< LQ	1,04±0,00

< LQ – Menor que o limite de quantificação.

< LD – Menor que o limite de detecção

Foi possível a quantificação da corilagina em todas as frações, sendo que a fração EFS1 apresenta a maior quantidade deste marcador. A fração EFS2 apresentou o maior teor de ácido gálico, aproximadamente 19%.

O ácido elágico foi quantificado apenas nas frações EFS3, EFS6 e EFS7, sendo que nas demais frações não pode ser quantificado por estar em concentração

menor que 0,007 mg/mL. O ácido gálico não foi detectado na EFS7, e não pode ser quantificado nas frações EFS4 a EFS6, por estar em concentração menor que 0,004 mg/mL nesta amostras.

Vários autores descrevem o uso de EFS para identificação e isolamento de composto fenólicos (DIAS et al., 2010; FISCHER et al., 2011; MARÇO et al., 2008; GINJOM et al., 2011; DE VASCONCELOS et al., 2010) para separar estes de interferentes como açúcares, proteínas ácidos (GINJOM et al., 2011; MARÇO et al., 2008).

Ginjom et al. (2011) e De Vasconcelos et al. (2010) quantificaram ácido gálico e ácido elágico em vinho tinto e pericarpo de castanha-da-índia, respectivamente, após EFS.

Colombo e colaboradores (2009) isolaram corilagina, rutina e etil-3,4,5-trihidroxibenzoato de extrato líquido comercial de *P. niruri* após EFS em sílica C₁₈, seguido de purificação em sistema cromatográfico preparativo.

De forma geral, pode-se concluir que o perfil químico das frações obtidas por EFS apresentou grande diversidade de compostos fenólicos, sendo eles flavonoides e taninos. Enquanto o ácido gálico ficou concentrado em EFS1 e EFS2, a corilagina mostrou-se presente em todas as frações em quantidades aproximadamente iguais, com exceção de EFS1 onde há um teor um pouco maior. O perfil cromatográfico em CLUE-DAD de EFS1 a EFS4 e entre EFS7 e EFS8 são praticamente idênticos. As análises por CCD também demonstraram em muitos casos a semelhança no perfil cromatográfico das amostras (ex. EFS1 a EFS3 na Figura 47; análise de flavonoides).

Desta forma, as frações obtidas por partição líquido-líquido foram consideradas mais adequadas para o estudo através do Fracionamento Biomonitorado, por apresentarem perfis químicos mais distintos. Possivelmente, a realização de uma EFS em fase reversa (ex. C18) seria mais eficiente na separação das substâncias polares presentes no extrato aquoso.

6.6 Determinação de Filantina na Droga Vegetal e Extrato Bruto Seco

Para a análise de filantina na droga vegetal (DV) e no extrato bruto seco (EBS) de *P. niruri* foi construída uma curva analítica, com padrão filantina, com cinco concentrações, sendo quantificadas através do *software* Empower[®] 3.

A solução estoque de filantina a 0,237 mg/mL foi diluída para as seguintes concentrações: 0,00125 mg/mL, 0,0125 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,050 mg/mL, 0,100 mg/mL e cada solução de diferente concentração foi injetada em triplicata.

Abaixo (Figura 50) está representado o cromatograma do padrão filantina na concentração de 0,050 mg/L.

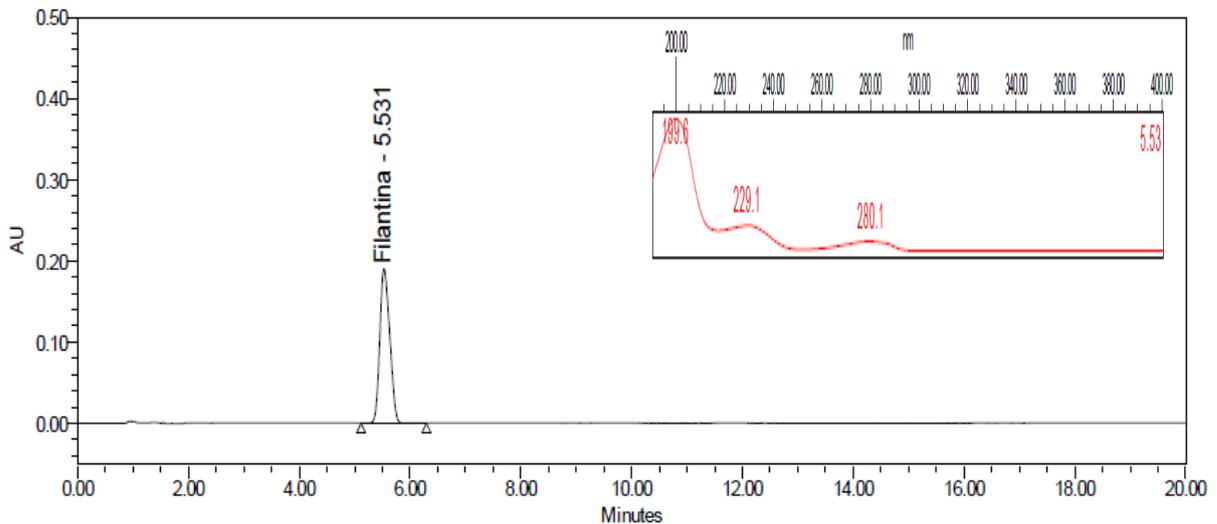


Figura 50 Cromatograma e espectro de absorção no UV: filantina a 0,050 mg/L.

Na figura 51 está representada a curva analítica da filantina como uma relação entre a média da área do pico e a respectiva concentração (*Amount*; mg/L) de cada ponto da curva, sendo $y = 4,73 \cdot 10^4 x + 9,44 \cdot 10^3$ a equação da reta e o $R^2 = 0,9999$.

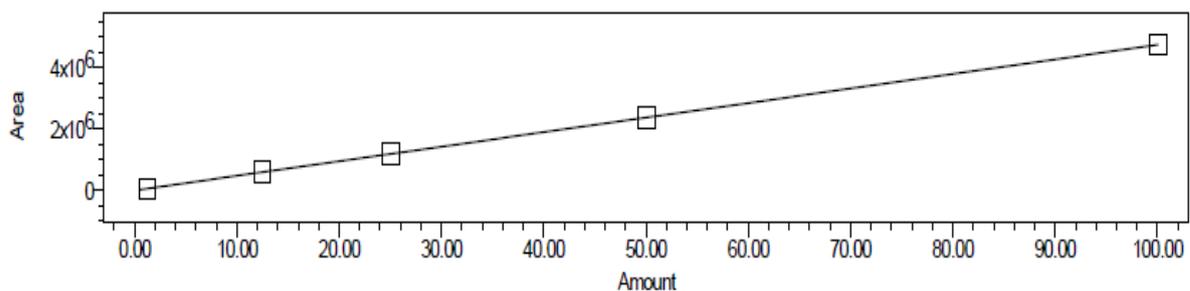


Figura 51 Curva analítica padrão externo: filantina.

Por meio da curva analítica foram determinados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) teóricos através das equações abaixo:

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC}$$

Onde:

DP = desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas analíticas

IC = inclinação da curva analítica (BRASIL, 2003).

Os resultados teóricos encontrados para o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram: 0,079 mg/L e 0,265 mg/L, respectivamente.

Abaixo (Tabela 20) estão representados os resultados de teor de filantina na droga vegetal e no extrato bruto seco, considerando as perdas por dessecação na droga vegetal e extrato.

Tabela 20 Determinação de Filantina em droga vegetal e extrato bruto seco de *P. niruri*.

Amostra	Filantina (% m/m)
Droga vegetal (DV)	0,045±0,00
Extrato bruto seco (EBS)	0,0002±0,00

O teor de filantina na droga vegetal (0,045% m/m), cujo preparo da amostra envolve extração com metanol foi maior que no extrato bruto seco, proveniente de extração aquosa, o qual apresentou apenas traços de filantina.

Vários autores quantificaram e/ou isolaram diversas lignanas, dentre eles a filantina, em extratos etanólico, metanólico, hexânico ou benzênico de espécies de *Phyllanthus* (KASSUYA et al., 2003; 2005; CHANG et al., 2003; MURUGAIYAH; CHAN, 2006; 2007; SRIVASTAVA et al, 2008, MAIA-ALMEIDA et al, 2011; PRASHANTH et al., 2012; KIRAN; RAO, 2013).

Kassuya e colaboradores (2003; 2005), isolaram nirtetralina, nirantina, hipofilantina, filtetralina e filantina de extrato hexânico produzido a partir de folhas de *P. amarus*. Kiran e Rao (2013) isolaram filantina e hipofilantina de extratos de partes aéreas de *P. amarus* produzidos por meio de extração sequencial com hexano, acetato de etila e metanol. Srivastava et al. (2008) quantificaram filantina e outras lignanas por método densitométrico em cromatografia em camada delgada quiral em extrato etanólico de partes aéreas de *P. amarus*, *P. maderaspatensis*, *P. urinaria* e *P. virgatus*, sendo que *P. amarus* apresentou maior teor de filantina, variando de 0,52% m/m a 0,22% m/m, em relação a outra espécies estudadas.

Maia-Almeida et al. (2011) ao avaliarem o cultivo e a colheita de *P. amarus* encontraram o maior teor de filantina em função da época da colheita e

independente da densidade do plantio foi atingida aos 105 dias com 1,15% m/m deste marcador.

Prashanth et al. (2012) encontraram teores de filantina variando de 0,15% m/m a 0,81% m/m em estudo realizado com extrato benzênico em cultura de calos de *P. niruri* de diferentes idades e suplementados com diferentes hormônios.

Murugaiyah e Chan (2006) encontraram 3,97% m/m, 0,98 % m/m e 0,30% m/m de filantina, hipofilantina e filtetralina, respectivamente em extrato metanólico de folhas de *P. niruri*. O fracionamento deste extrato metanólico por resina cromatográfica polimérica (Diaion[®] HP-20) eluído com metanol 80% e 100% originou uma fração semipurificada com teor 16,79% m/m de filantina, a qual seguida de posterior fracionamento por partição líquido-líquido com hexano, clorofórmio e n-butanol gerou frações com 50,19% m/m, 1,80% m/m e 0,57% m/m de filantina, respectivamente.

Dessa forma pode-se afirmar que as lignanas, dentre elas a filantina apresenta afinidade por solventes de média a baixa polaridade, sendo que em extratos aquosos os teores de filantina estão presentes apenas como traços.

6.7 Determinação do Teor de Flavonoides Totais no Extrato Bruto Seco e nas Frações Avaliadas *in vitro*

Para determinar a concentração de flavonoides totais no extrato bruto seco (EBS) e nas frações (FA, FE e FNB) avaliadas *in vitro* foi utilizada uma curva analítica obtida a partir da leitura em triplicata da absorvância de soluções de quercetina de diferentes concentrações. A concentração final da quercetina (na cubeta com reagentes) variou de 0,3125 a 5,00 mg/L. A tabela 21 apresenta os dados obtidos para a curva analítica (Figura 52).

Tabela 21 Dados de absorvância relativos às soluções de quercetina de diferentes concentrações.

Quercetina (mg/L)	Média da Absorvância (UA)
0,3125	0,0177
0,6250	0,0389
1,2500	0,0771
2,500	0,1568
5,00	0,3208

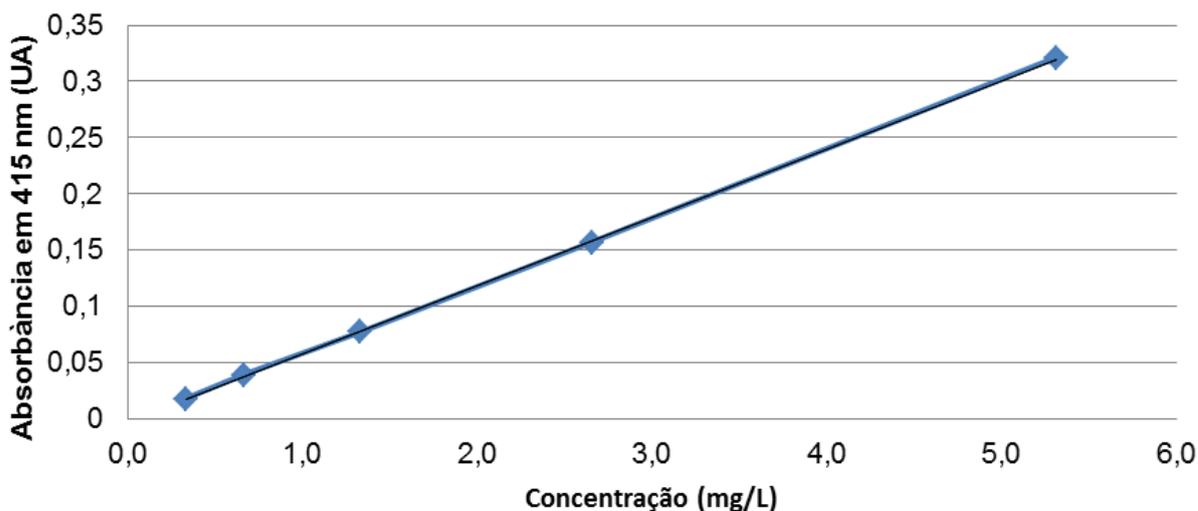


Figura 52 Curva analítica de quercetina para determinação do teor de flavonoides totais utilizando o reagente complexante cloreto de alumínio.

A leitura das absorbâncias de cada extrato foi realizada em triplicata e a média dos valores foi calculada, como pode ser observado na tabela 22. A equação da reta $y = 0,0607x - 0,0028$ e o valor de $R^2 = 0,9999$ demonstram adequada linearidade da curva.

Os teores de flavonoides totais foram calculados utilizando a curva analítica da quercetina e as respectivas absorbâncias do extrato e frações analisadas descontando-se a absorbância do branco.

Na tabela abaixo (Tabela 22) estão apresentados os teores de flavonoides expressos como quercetina no extrato bruto seco e nas frações biomonitoradas.

Tabela 22 Teor de flavonoides totais expressos como quercetina no extrato bruto seco e frações biomonitoradas de *P. niruri*

Amostra	Média da Absorbância (UA)	Teor de Flavonoides Totais (%)
EBS	0,1215	3,14±0,09 ⁽¹⁾
FA	0,0480	1,18±0,04
FE	0,1345	3,12±0,22
FNB	0,2050	5,21±0,22

(1) Resultado descontando – se perda por dessecação.

Considerando os dados da tabela acima, pode-se concluir que o maior conteúdo de flavonoides totais foi encontrado na fração n-butanol (FNB), seguido do extrato bruto aquoso (EBS). O menor teor observado foi na fração aquosa (FA), pois de modo geral, o etanol, bem como n-butanol possui maior seletividade na extração

de flavonoides (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). É importante destacar que ao contrário do que a nomenclatura indica, esse método não é capaz de fornecer o teor de flavonoides totais, uma vez que traz restrições de detecção de certas classes de flavonoides (YU et al., 2012).

O teor de flavonoides (3,14% m/m) encontrado no extrato bruto seco (EBS) é maior que o descrito por Sabir e Rocha (2008), os quais obtiveram 0,21% m/m e 0,19% m/m, respectivamente para extratos aquosos 10% p/v de dois lotes de *P. niruri* adquiridos em mercados locais de Santa Maria/RS. Soares e colaboradores (2003) reportaram teor de 0,80% m/m de flavonoides totais quantificados como quercetina em solução extrativa aquosa de partes aéreas de *P. niruri*.

Com relação à análise das frações, o resultado é coerente com a análise por CCD, já que o maior teor foi encontrado em FNB, fração que apresentou maior número de manchas e com maior intensidade na condição de análise de flavonoides.

6.8 Avaliação da Ação do Extrato Bruto Seco e das Frações de *P. niruri* Sobre a Cristalização de Oxalato de Cálcio *in vitro*

De acordo com Filho e Yunes (1998), ao se realizar análises biológicas com extratos, frações semi-purificadas e/ou princípios ativos de plantas, usualmente são feitas triagens com modelos experimentais de menor complexidade e, posteriormente, em ensaios de maior especificidade, seguido de análises do mecanismo de ação biológica, devido ao grande número de amostras a serem analisadas.

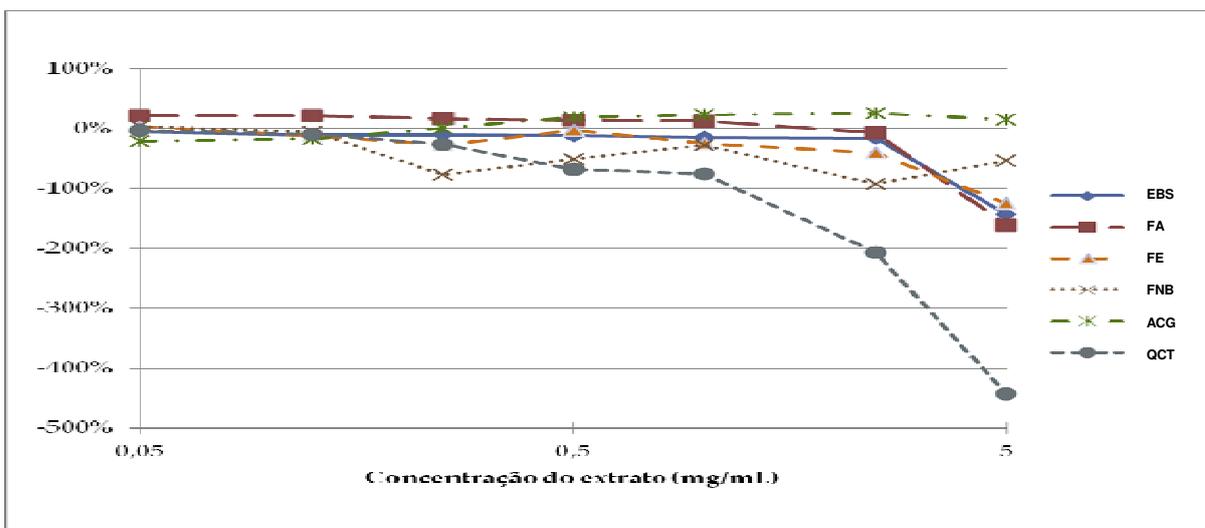
Neste contexto, o modelo *in vitro* de avaliação da cristalização de oxalato de cálcio foi escolhido como modelo biológico.

Os cristais obtidos foram analisados imediatamente e 24 h após a cristalização. A análise semiquantitativa dos cristais foi estimada pela turbidez da solução e o número e tamanho dos cristais estimados por microscopia.

O extrato bruto seco, as frações (FA, FE e FNB) e os padrões ácido gálico e quercetina foram testados nas concentrações de 0,05 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 1,0 mg/mL, 2,5 mg/mL e 5,0 mg/mL.

O gráfico 14 representa a porcentagem de alteração do número de cristais em relação ao controle.

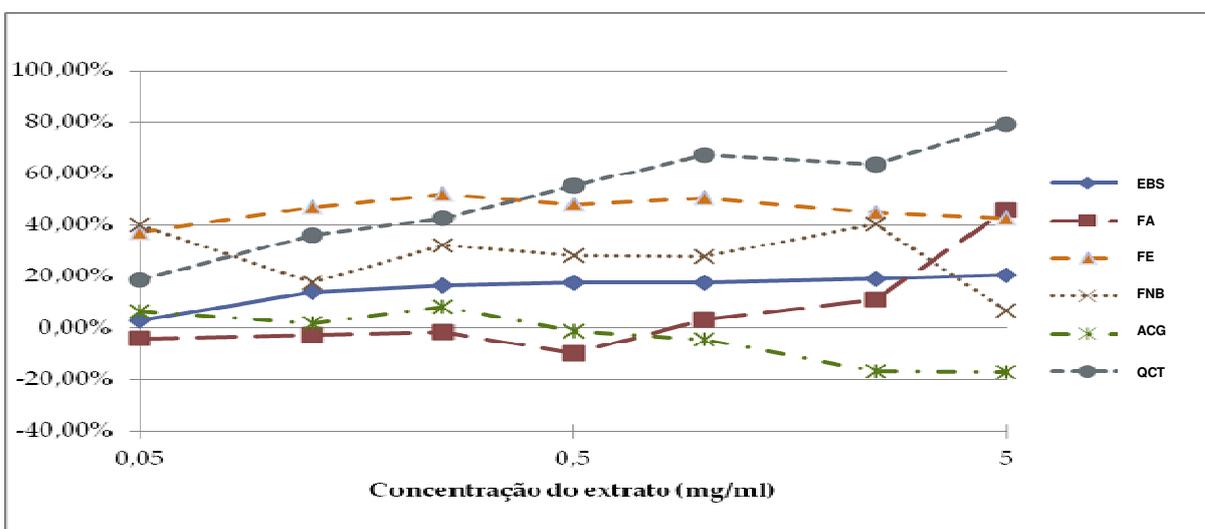
Gráfico 14 Porcentagem de alteração do número de cristais em relação ao controle.



O extrato bruto seco (EBS) e a fração aquosa (FA) apresentaram aumento com significância estatística no número de cristais na concentração de 5,0 mg/mL. Já a fração emulsão (FE) apresentou aumento no número de cristais na concentração de 2,5 mg/mL e a fração n-butanol (FNB) na concentração de 0,25 mg/mL, sendo que este resultado se manteve oscilando para as concentrações de seguintes. A quercetina (QCT) apresentou o melhor resultado, aumentando o número de cristais com significância estatística a partir da concentração inicial de 0,5 mg/mL. O ácido gálico (ACG) não produziu aumento significativo no número de cristais.

No gráfico 15 está representada a porcentagem de diminuição da área dos cristais em relação ao controle.

Gráfico 15 Porcentagem de alteração da área dos cristais em relação ao controle.



Houve diminuição estatisticamente significativa na área dos cristais de oxalato de cálcio (CaOx) em presença de 0,5 mg/mL do extrato bruto seco (EBS), 5,0 mg/mL da fração aquosa (FA), 0,05 mg/mL da fração emulsão (FE) e da fração n-butanol (FNB). Para o padrão ácido gálico não houve redução significativa na área dos cristais de CaOx para as concentrações testadas; já o padrão quercetina diminuiu a área dos cristais a partir da concentração de 0,05 mg/mL.

Em Barros et al. (2003) o extrato aquoso 5% p/v de *P. niruri* testado na concentração de 0,25 mg/mL aumentou o número de cristais pequenos (5,0-7,5 μm) e diminuiu o número de cristais grandes (10-30 μm) comparando-se com a urina sem o extrato.

Também foi verificado que todas as amostras testadas, com exceção do padrão ácido gálico, aumentaram o índice de turbidez, bem como diminuíram a agregação dos cristais de CaOx após 24 h de cristalização. O índice de turbidez é diretamente influenciado pela redução da área dos cristais (Barros et al., 2003).

Freitas et al. (2002), avaliou o efeito da administração oral crônica do extrato aquoso 5% p/v de *P. niruri* na dose de 1,25 mg/mL/dia em ratos por meio do modelo de urolitíase induzida por sementes de CaOx e constatou que o extrato apresenta uma ação inibitória no crescimento do cristal relacionado a alta incorporação de glucosaminoglicanas (GAGs) no interior do cálculo.

De acordo com Boim et al. (2010), os possíveis mecanismos de ação do extrato de *P. niruri* envolvidos na ação antiurolitíase são: I – neutralização de cargas negativas das glucosaminoglicanas reduzindo o polo negativo para a progressiva deposição de cátions; II – compostos ativos da planta poderiam quelar e/ou competir com o cálcio por sítios de ligação na superfície do cristal; III – efeito de *P. niruri* sobre proteínas, incluindo proteína Tamm-Horsfall, nefrocalcina, osteopontina, protrombina fragmento 1, entre outros, modulando a cristalização, agregação e crescimento do cálculo e IV – *P. niruri* poderia reduzir a adesão do cristal no epitélio tubular.

Estudos sugerem que *P. niruri* pode interferir em importantes etapas da formação do cálculo incluindo agregação do cristal e internalização pela células tubulares, composição e estrutura do cristal. Estas propriedades de *P. niruri* podem constituir uma importante vantagem na prevenção da litíase, inibição do crescimento do cálculo e manutenção dos cristais dispersos na urina, conseqüentemente facilitando sua eliminação (BOIM et al., 2010).

Na tabela 23 estão relacionados os resultados do teor de marcadores (ácido gálico, corilagina, ácido elágico) e teor de flavonoides com as menores concentrações com ação sobre o processo de formação de cristais de CaOx – aumento do número de cristais e diminuição na área dos cristais – do extrato e frações biomonitoradas.

Tabela 23 Teor de metabólitos secundários *versus* concentrações do extrato e frações biomonitoradas com ação no processo de formação de cristais de oxalato de cálcio.

Amostra	Ácido gálico (%, m/m)	Corilagina (%, m/m)	Ácido elágico (%, m/m)	Flavonoides Totais (%, m/m)	MCNC _{CaOx} (mg/mL)	MCAC _{CaOx} (mg/mL)
EBS	0,53±0,01	4,78±0,03	0,78±0,01	3,14±0,09	5,00	0,50
FE	< LQ	0,96±0,00	< LQ	3,12±0,22	2,5	0,05
FA	0,05±0,01	1,72±0,00	0,10±0,01	1,18±0,04	5,00	5,00
FNB	1,04±0,04	8,22±0,05	< LQ	5,21±0,22	0,25	0,05

< LQ – Menor que o limite de quantificação.

< LD – Menor que o limite de detecção

MCNC_{CaOx} – Menor concentração com ação sobre o aumento do número de cristais de CaOX

MCAC_{CaOx} – Menor concentração com ação sobre a diminuição da área de cristais de CaOX

Em suma, dentre as amostras avaliadas, a fração n-butanol (FNB), a qual apresenta maior teor de corilagina (8,22±0,05 %, m/m) e maior teor de flavonoides totais (5,21±0,22 %, m/m), demonstrou ser a mais ativa na ação de formação de cristais de CaOx pois, em concentrações menores, 0,25 mg/mL (MCNC_{CaOx}) e 0,05 mg/mL (MCAC_{CaOx}), conseguiu respectivamente, aumentar o número de cristais e diminuir a área destes, quando comparado com as demais amostras testadas. No entanto, a diminuição da área dos cristais manteve-se oscilando conforme a concentração estudada foi aumentando, isto é, não houve diminuição dos cristais proporcionalmente ao aumento da concentração da fração.

A comparação dos resultados das análises químicas com os resultados da ação sobre a formação de cristais de oxalato de cálcio sugerem que os flavonoides e/ou a corilagina podem ser responsáveis por esta atividade, pois estão presentes majoritariamente em FNB. Já os resultados obtidos com o ácido gálico e quercetina indicam que a ação sobre a formação de cristais de oxalato de cálcio dever estar relacionada aos flavonoides. De qualquer forma, os estudos de avaliação da ação sobre a cristalização de oxalato de cálcio, bem como de outros modelos *in vitro* e/ou

in vivo devem prosseguir para definição dos marcadores para o extrato aquoso de *P. niruri*

7 CONCLUSÃO

Por meio deste trabalho foi possível comparar o perfil de metabólitos secundários de diferentes extratos de *Phyllanthus niruri* L.

Foi realizada a transferência e otimização do método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) para cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE-DAD), bem como aplicação do mesmo na avaliação do perfil cromatográfico dos extratos obtidos com diferentes polaridades, buscando diferenças sazonais e entre os órgãos da espécie.

Por meio de técnicas cromatográficas (CCD e CLUE-DAD) foi possível concluir que o perfil cromatográfico de extratos de diferentes polaridades das coletas sazonais de *P. niruri*, apresentaram diferenças qualitativas quanto á constituição de metabólitos secundários estudados. Entretanto a mesma diferença qualitativa não foi observada na variação sazonal, quando os extratos de mesma polaridade e diferentes meses foram comparados entre si, havendo apenas variação sazonal quantitativa para compostos como ácido gálico, corilagina, ácido elágico.

Da mesma forma, os perfis químicos de extratos de diferentes polaridades dos órgãos como folhas, flores+frutos, caules e raízes de *P. niruri* apresentaram diferenças qualitativas quanto a composição de metabólitos secundários. Com relação as diferenças entre os órgãos, os perfis químicos de folhas, flores+frutos e caules mostraram-se mais complexos do que o perfil químico de raízes para todas as classes de metabólitos avaliadas, com maior teor de ácido gálico, corilagina e ácido elágico em folhas, flores+frutos e caule.

Foi possível também a obtenção de extrato aquoso (EBS), assim como o fracionamento deste por partição líquido-líquido e extração em fase sólida com sílica gel, sendo que a técnica de fracionamento por partição líquido-líquido demonstrou ser a mais adequada para avaliação por ensaios *in vitro* da ação na formação de cristais de oxalato de cálcio, considerando-se o menor número de frações obtidas e as maiores diferenças nos perfis químicos destas frações.

A quantificação por técnicas cromatográficas e colorimétricas na droga vegetal e no extrato aquoso demonstrou haver grande quantidade de fenólicos (taninos hidrolisáveis e taninos totais) na droga vegetal e no extrato aquoso, ao passo que o teor de lignanas expresso como filantina aparece em baixa concentração em ambos. Ácido gálico, corilagina e ácido elágico também foram quantificados nas frações obtidas. Flavonoides totais foram quantificados por método colorimétrico apenas no extrato aquoso e nas frações avaliadas *in vitro*.

Dessa forma o presente trabalho contribuiu para a padronização do extrato de *P. niruri* L, pois definiu que não há variação qualitativa no perfil de metabólitos secundários durante os meses. Os dados também apontam para o uso de partes aéreas ou de folhas como droga vegetal coletadas nos meses de novembro a janeiro, apresentando dessa forma maior quantidade de ácido gálico, corilagina e ácido elágico, sendo estas informações fundamentais para a qualidade do produto fitoterápico.

Alem disso, o extrato aquoso de *P. niruri*, que apresenta altas concentrações de compostos fenólicos, principalmente taninos, demonstrou interferir no processo de formação de cristais de oxalato de cálcio em modelo *in vitro*. O maior teor de flavonoides na fração n-butanol, que dentre as frações apresentou maior atividade nos ensaios *in vitro*, assim como a ação apresentada pela quercetina nos mesmos ensaios sugerem que os flavonoides podem estar relacionados com a ação sobre a formação dos cristais de oxalato de cálcio, bem como outras substâncias fenólicas como a corilagina. De outro lado, os dados indicam que ácido gálico não está envolvido na ação sobre a formação dos cristais de oxalato de cálcio.

8 REFERÊNCIAS

- AGYARE, C.; LECHTENBERG, M.; DETERS, A.; PETEREIT, F.; HENSEL, A. Ellagitannins from *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Excell.: Gerannin and furosin stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts. **Phytomedicine**, v. 18, p. 617-624, 2011.
- ALBERTON, J. R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L. V. S.; FRANCO, S. L.; LIMA, M. A. P. Caracterização farmacognóstica do jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 1, p. 37-50, 2001.
- AMIN, Z. A., ALSHAWSH, M. A., KASSIM, M., ALI, H. M., ABDULLA, M.A, Gene expressional profiling reveals underlying molecular mechanism of hepatoprotective effect of *Phyllanthus niruri* on thioacetamide-induced hepatotoxicity in Sprague Dawley rats. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, n. 130, p. 160–170, 2013.
- AMIN, Z. A.; ABDULLA, M. A.; ALI, H. M.; ALSHAWSH, M., A.; QADIR, S. W. Assessment of *in vitro* antioxidante, antibacterial and imune activation potentials of aqueous and etanol extracts of *Phyllanthus niruri*. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 92, p. 1874-1877, 2012.
- ANDERSEN, Ø.M., MARKHAM, K.R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC Taylor and Francis, 2006. p. 12.
- ANJANEYULU, A. S. R.; JAGANMOHAN RAO, K. L. R. R.; SUBRAHMANYAM, C. Crystalline constituents of euphorbiaceae – XII: Isolation and structural elucidation of three new lignans from the leaves of *Phyllanthus amarus* Linn. **Tetrahedron**, v. 29, n.10. p. 1291–1298,1973.
- BAGALKOTKAR, G.; SAGINEEDU, S. R.; SAAD M. S.; STANSLAS J. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 1559-1570, 2006.

- BARROS, M. E.; LIMA, R.; MERCURI, L. P.; MATOS, J. R.; SCHOR, N.; BOIM, M.A. Effect of extract of *Phyllanthus niruri* on crystal deposition in experimental urolithiasis. **Urological Research**, v.34, n. 6, p. 351-357, 2006.
- BARROS, M.E.; SCHOR, N.; BOIM, M.A.; Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization *in vitro*. **Urological Research**, v. 30, n. 6, p. 374–397, 2003.
- BASAVARAJ, D. R.; BIYANI, C. S.; BROWNING, A. J.; CARTLEDGE, J. J. The role of urinary kidney stone inhibitors and promoters in the pathogenesis of calcium containing renal stones. **EAU-EBU Update Series**, v. 5, p. I26-I36, 2007.
- BIKRAM, S.; PAWAN, K.; ARAGHUNATH, S. T. An acyclic triterpene from *Phyllanthus amarus*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 7, p. 1980–1981, 1989.
- BOIM, M. A.; HEILBER, I. P.; SCHOR, N. *Phyllanthus niruri* as a promising alternative treatment for nephrolithiasis. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 36, n. 6, p. 657-664, nov./dec., 2010.
- BORGES, D. B.; FARIAS, M. R.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n. 3, p. 229-236, jul./set, 2005.
- BRANDÃO, H. N.; DAVID, J.P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, vol. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. 5ª ed. Volume 1. Brasília: Anvisa, 2010c.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. 5ª ed. Volume 2. Brasília: Anvisa, 2010d.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução ANVISA RDC n. 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, 5 abr. 2010b.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução ANVISA RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p.179-189, 2000.
- CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Medicinal Corumbá**, 2006.
- CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Medicinal Research Reviews**, v.18, n. 4, p. 225-258, 1998.
- CAMPOS, A. H.; SCHOR, N. *Phyllanthus niruri* inhibits calcium oxalate endocytosis by renal tubular cells: its role in urolithiasis. **Nephron Journal**, v.81, n.4, p.393–397, 1999.
- CASTRO-CHAVES, C.; CUNHA, A. M. F.; CRUZ, G. M. C.; OLIVEIRA, D. V. O *Phyllanthus niruri* L. induz caliurese dissociada da diurese e da natriurese em ratos acordados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, suplemento, p. 2-4, 2002.
- CHANG, C. C.; YANG, M. H.; WEN, H. M.; CHERN, J. C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 178-182, 2002.
- CHANG, C.; LIEN, Y.; LIU, K. C. S. C.; LEE, S.; Lignans from *Phyllanthus urinaria*, **Phytochemistry**, v. 63, p. 825-833, 2003.
- CHAUHAM, J. S.; SULTAN, M.; SRIVASTAVA, S. K. Chemical investigation of the roots of *Phyllanthus niruri*. **Journal of Indian Chemical Society**, v.56, p. 326-332, 1976.
- CIMANGA, R. K.; TONA, L.; LUYINDULA, N.; MESIA, K.; LUSAKIBANZA, M.; MUSUAMBA, C. T.; APERS, S.; DE BRUYE, T.; VAN MIERT, S.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. In vitro antiplasmodial activity of callus culture extracts and fractions from fresh apical stems of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae): part 2. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 399-404, 2004.
- COLOMBO, R.; BATISTA, A. N. de L.; TELES, H. L.; SILVA, G. H.; BOMFIM, G. C. C.; BURGOS, R. C. R.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; PELÍCIA, C. R.; GUIMARÃES, F. M.; REIMBERG, M. C. H. Validated HPLC method for the standardization of *Phyllanthus niruri* (herb and commercial extracts) using corilagin as a phytochemical marker. **Biomedical Chromatography**, v. 23, n. 6, p. 573–80, 2009.

COUTINHO, I.D.; KATAOKA, V.F.; HONDA, N.K.; COELHO, R.G.; VIEIRA, M.C.; CARDOSO, C.A.L. Influência da variação sazonal nos teores de flavonoides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.3, p.322-327, jun./jul., 2010.

COUTO, A. G.; KASSUYA, C. A. L.; CALIXTO, J. B.; PETROVICK, P.R. Anti-inflammatory, antiallodynic effects and quantitative analysis of gallic acid in spray dried powders from *Phyllanthus niruri* leaves, stems, roots and whole plant. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 124-131, 2013a.

COUTO, A. G.; KUNZLER, M. L.; SPANIOL, B.; MAGALHÃES, P. M.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Chemical and technological evaluation of the *Phyllanthus niruri* aerial parts as a function of cultivation and harvesting conditions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 36-43, 2013b.

DE FREITAS, R. M. C.; SILVA, L. C.; SANTOS, J. L. S.; JÚNIOR, W. C. T. Avaliação dos métodos de imagem no diagnóstico da urolitíase: revisão da literatura. **Radiologia Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 291-24, 2004.

DE QUEIROZ, F. M.; MATIAS, K. W. O.; DA CUNHA, M. M. F., SCHWARZ, A. Evaluation of (anti)genotoxic activities of *Phyllanthus niruri* L. in rat bone marrow using the micronucleus test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 1, jan./mar., 2013.

DE SOUZA, T. P.; HOLZSCHUH, M. H.; LIONÇO, M. I.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Validation of a LC method for the analysis of phenolic compounds from aqueous extract of *Phyllanthus niruri* aerial parts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 30, p. 351-356, 2002.

DE VASCONCELOS, M. C. B. M.; BENNETT, R. N.; QUIDEAU, S.; JACQUET, R.; ROSA, E. A. S.; FERREIRA-CARDOSO, J. V. Evaluating the potential of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) fruit pericarp and integument as a source of tocopherols, pigments and polyphenols. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 301-311, 2010.

DIAS, A. L. S.; DE SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H. Enriquecimento de composto fenólicos de folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus composto majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 38-42, 2010.

ELFAHMI; BATTERMAN, S.; KOULMAN, A.; HACKL, T.; BOS, R.; KAYSER, O.; WOERDENBAG, H. J.; QUAX, W. J. Lignans from cell suspension cultures of

Phyllanthus niruri, an Indonesian medicinal plant. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 1, p. 55-58, 2006.

EMBRAPA - **Quebra-Pedra. Série Plantas Mediciniais, Condimentares e Aromáticas**. Corumbá, 2006.

EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY. Guidelines on urolithiasis. Disponível em: < <http://www.uroweb.org/guidelines/online-guidelines/>>. Acesso em: 15/12/2013.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In.: **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2004, p. 239.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In.: **Farmacognosia: da Planta ao medicamento** SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2004, p. 278.

FIGUEIRA, G.M.; SILVA, F.; MAGALHÃES, P.M.; PARK, K.J. Estudo da umidade de equilíbrio de duas espécies de plantas do gênero *Phyllanthus* após secagem para o armazenamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, s. 01, p. 22-24, 2004.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 9-105, 1998.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v. 127, p. 807-821, 2011.

FOX CHASE CANCER CENTER. Pinayur S. Venkateswaran; Irving Millman; Baruch S. Blumberg. **Composition, pharmaceutical preparation and method for treating viral hepatitis**. US 4673575, 26 Apr. 1985, 16 Jun. 1987.

FREITAS, A.M.; SCHOR, N.; BOIM, M.A. The effect of *Phyllanthus niruri* on urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and other factors associated with renal stone formation. **BJU International**, v.89, n.9, p.829-834, 2002.

- GINJOM, I.; D'ARCY, B.; CAFFIN, N.; GIDLEY, M. Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. **Food Chemistry**, v. 125, p. 823-834, 2011.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P.; Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GOMES, P. N.; CABRITA, M.; RODRIGUES, M.; VEJA, P.; COUTINHO, A.; ROSA, G.; NEVES, J. Profilaxia da litíase renal. **Acta Urológica**, v. 22, n. 3, p. 47-56, 2005.
- GUPTA, D. R.; AHMED, B. Nirurin: a new prenylated flavanone glycoside from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 6, p. 958–963, 1984.
- HARISH, R.; SHIVANANDAPPA, T. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. **Food Chemistry**, v. 95, p. 180-185, 2006.
- HASSARAJANI, S. A. e MULCHANDANI, N. B. Securinine type of alkaloids from *Phyllanthus niruri*. **Indian Journal of Chemistry Section B – Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 801–803, 1990.
- HOUSSAIN, R. A.; DICKEY, J. K.; ROSSER, M. P.; MATSON, J. A.; KOZZLOWSKY, M. R. A novel class of non-peptidic endothelin antagonists isolated from the medicinal herb *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 10, p. 1515–1520, 1995.
- HUANG, Y. L.; CHEN, C. C.; OU, J. C. Isolintetralin – a new lignan from *Phyllanthus niruri*. **Planta Medica**, v. 58, n. 5, p. 473–474, 1992.
- IFEOMA, O.; SAMUEL, O.; ITOHAN, A. M.; ADEOLA, S. O. Isolation, fractionation and evaluation of the antiplasmodial properties of *Phyllanthus niruri* residente in its chloroform fraction. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 169-175, 2013.
- IIZUKA, T.; NAGAI, M.; TANIGUCHI, A.; MORIYAMA, H. HOSHI, K. Inhibitory effects of methylbrevifolincarboxylate isolated from *Phyllanthus niruri* L. on platelet aggregation. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 2, p. 382–384, 2007.
- ISHIMARU, K.; YOSHIMATSU, K.; YAMAKAWA, T.; KAMADA, H.; SHIMOMURA, K.; Phenolic constituents in tissue cultures of *Phyllanthus niruri*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 2015-2018, 1992.
- JOSHI, B.S.; GAWAD, D. H.; PELLETIER, S. W.; KARTHA, G.; BHANDARY, K.. Isolation and Structure (X-Ray Analysis) of ent-norsecurinine, an alkaloid from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 4, p. 614-620, 1986.

- KANCHANA, K.; PARAMESWARI, C.S. Protective effect of *Phyllanthus niruri* against cyclosporine A-Induced nephrotoxicity in rats. **Comparative Clinical Pathology**, n. 22, p. 885-893, 2013.
- KASSUYA, C. A. L.; LEITE, D. F. P.; DE MELO, L. V.; REHDER, V. L. G.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*. **Planta Medica**, v 71, p. 721-726, 2005.
- KASSUYA, C. A. L.; SILVESTRE, A. A.; REHDER, V. L. G.; CALIXTO, J. B. Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from *Phyllanthus amarus* in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 478, p. 145-153, 2003.
- KHATOON, S.; RAI, VARTIKA; RAWAT, A. K. S.; MEHROTRA, S. Comparative pharmacognostic studies of three *Phyllanthus* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p.79-86, 2006.
- KIRAN, P. M.; RAO, B. G.; Evaluation of anti-inflammatory activity of different extracts and isolated lignanas of *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn. aerial parts. **International Jounal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 2, p. 803-808, 2013.
- KLAUS. Processos. Disponível em: < http://www.klaus-ti.com.ar/new/index.php?option=com_content&view=article&id=2&Itemid=3&processo_id=2&lang=pt> . Acesso em: 24/02/2014.
- LIMA, Z. P.; SANTOS, R. C.; TORRES, T. U.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M. SANTOS, L. C.; PELLIZZON, C. H.; ROCHA, L. R.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R.; CARDOSO, C. R.; VARANDA, E. A.; MORAES, H. P.; BAUAB, T. M.; CARLI, C.; CARLOS, I. Z.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima fagifolia*: an integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p. 149-160, 2008.
- LIONÇO, M. I.; DE SOUZA, T. P.; PETROVICK, P. R. Avaliação cromatográfica de polifenóis presentes nas partes morfológicas de *Phyllanthus niruri*. **Caderno de Farmácia**, v. 17, n. 2, p. 117-120, 2001.
- MAIA-ALMEIDA, C. I.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROZ, S. C. N.; SCRAMIM, S.; MISCHAN, M. M.; MONTANARI-JÚNIOR, I.; FERREIRA, M. I.; Densidade de plantio e idade de colheita de quebra-pedra [*Phyllanthus amarus* (Schumach & Thonning) genótipo Unicamp-CPQBA 14] na produtividade de filtanina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, p. 633-641, 2011.

- MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMNIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocioninas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.
- MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R. W.; ANUAR, N.; HASSAN, O.; SINGH, H. Chemical profiling and quantification of tannins in *Phyllanthus niruri* Linn. fractionated by SFE method. **Separation Science and Technology**, n. 46 p. 71–78, 2011.
- MARKOM, M.; HASAN, M.; DUAD, W. R. W.; SINGH, H.; JAHIM, J. M. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, n. 52, p. 487–496, 2007.
- MARQUES, L. C. *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra) no tratamento de urolitíase: proposta de documentação para registro simplificado como fitoterápico. **Revista Fitos**, v. 5, n. 3, p. 20-33, 2010.
- MARTINS, L. R. R., PEREIRA-FILHO, E. R., CASS, Q. B., Chromatographic profiles of *Phyllanthus* aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models. **Analytical and bioanalytical chemistry**, n. 400, p. 469 - 481, 2011.
- MARTINS, L.R.R. Perfil cromatográfico e análise multivariada para o controle de qualidade de amostras comerciais do gênero *Phyllanthus* (quebra-pedra). 2008. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências – Química Orgânica) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- MAZZUCCHI, E.; SROUGI, M. O que há de novo no diagnóstico e tratamento da litíase urinária? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 6, p. 723-728, 2009.
- MELLINGER, C. G.; CARBONERO, E. R.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Xylans from the medicinal herb *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 1, p. 129–132, 2005.
- MICALI, S.; SIGHINOLFI, M. C.; CELIA, A.; DE STEFANI, S.; GRANDE, M.; CICERO, A. F.; BIANCHI, G. Can *Phyllanthus niruri* affect the efficacy of extracorporeal shock wave lithotripsy for renal stones? A randomized, prospective, long-term study. **The Journal of Urology**, v. 176, p. 1020-1022, sep., 2006.
- MICHAEL OTT, MICHAEL P. MANNS. **Use of *Phyllanthus* constituents for treating or preventing infections caused by hepatitis**. US2004/0197426 A1, 26 Apr. 2002, 7 Oct. 2004.

- MICHELE GARAY; SIMARNA KAUR; MICHAEL SOUTHHALL; PING WEN. **Extract of *Phyllanthus niruri***. US20110081304 A1, 9 oct. 2009, 7 apr. 2011.
- MICHELIN, D. C.; FINATI, S. C. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., Convolvulaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 18-22, Jan./Mar., 2010.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: um abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; NETO, E. M. F. L.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, M. M.; AMORIM, E. L. C. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannins levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. And *Anadenanthera colubrine* (Vell.) Brenan. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 3, p. 338-344, Jul./Set., 2006.
- MORAES, L.D.; DE SOUSA, O. V. Avaliações qualitativas e quantitativas da variação de metabólitos secundários em *Tournefortia paniculata* Cham (Boraginaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, s. 2, p. 1032-1034, jul., 2007.
- MOREIRA, J.; KLEIN-JÚNIOR, L.; CHECHINEL FILHO, V.; BUZZI, F. C. Anti-hyperalgesic activity of corilagin, a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.146, p. 318–323, 2013.
- MULCHANDANI, N. B. e HASSARAJANI, S. A. 4-methoxy-nor-securinine, a new alkaloid from *Phyllanthus niruri*. **Planta Medica**, v. 1, p. 104–105, 1984.
- MURUGAIYAH, V.; CHAN, K. L. Antihyperuricemic lignans from the leaves of *Phyllanthus niruri*. **Planta Medica**, v. 72, p. 1262-1267, 2006.
- MURUGAIYAH, V.; CHAN, K.L. Determination of four lignans in *Phyllanthus niruri* L. by a simple high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 198-204, 2007.
- NASCIMENTO, J. E.; MELO, A. F. M.; LIMA E SILVA, T. C.; FILHO, J. V.; SANTOS, E. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E; L. C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 145-150, 2008.

NATURALBRADEL. Disponível em: <<http://www.naturalbradel.com/uriston.html>>. Acesso em: 15/12/2013.

NEWMAN, M. B.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, n.3, p. 461-477, 2007.

NISHIURA, J. L.; CAMPOS, A. H.; BOIM, M. A.; HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. *Phyllanthus niruri* normalizes elevated urinary calcium levels in calcium stone forming (CSF) patients. **Urological Research**, v.32, n.5, p. 362-366, 2004.

NJOROGE, A. D.; ANYANGO, B.; DOSSAJI, S. F. Screening of *Phyllanthus* Species for Antimicrobial Properties. **Chemical Sciences Journal**, 2012.

NOVA LABORATORIES SDN. BHD. Disponível em: <<http://www.nova.com.my/images/stories/E-Catalogue/Monograph.pdf>>. Acesso em: 15/12/2013.

OKOLI, C.O.; OBIDIKE, I.C.; EZIKE, A.C.; AKAH, P.A.; SALAWU, O.A. Studies on the possible mechanisms of antidiabetic activity of extract of aerial parts of *Phyllanthus niruri*. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 3, p. 248-255, 2011.

PANCHAGNULA, S. e SOMEPALLI, V. Isolation, structure and synthesis of new diarylbutane lignans from *Phyllanthus amarus*: Synthesis of 5'-desmethoxy niranthin and an antitumor extractive. **Tetrahedron**, v. 47, n. 42, p. 8931–8940, 1991.

PETROIANU, A.; OLIVEIRA NETO, J. E.; ALBERTI, L. R. Dados epidemiológicos da litíase renal, em hospital de referência, em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Medicina**, v. 34, p. 85-88, 2001.

Phyllanthus (Euphorbiaceae). I. Subgenera Isocladus, Kirganelia, Cicca and Emblica. **Journal Research Reviews**, v.18, n. 4, p. 225-258, 1998.

PORTO, C. R. C.; SOARES, L. A. L.; SOUZA, T. P.; PETROVICK, P. R.; LYRA, I. L.; JÚNIOR, R. F. A.; LANGASSNER, S.M.Z.; FERREIRA, A. A. A.; GUERRA, G. C. B, Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Phyllanthus niruri* spray-dried standardized extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 138-144, jan./fev., 2013.

PRASHANTH, K. S.; MANDAHASAN, A.; VIJAYA, K. S.; DHIRENDRA, B. S.; SHREEDHARA, C. S.; MANJUNATH, S. M. Product of secondary plant metabolite phyllanthin in *Phyllanthus niruri* Linn. by leaf tissue culture. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 752-761, 2012.

QUIAN-CUTRONE, J.; HUANG, S.; TRIMBLE, J.; LI, H.; LIN, P. F.; ALAM, M.; KLOHR, S. E.; KADOW, K. F. Niruriside, a new HIV REV/RRE binding inhibitor from *Phyllanthus amarus*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 196–199, 1996.

RAJESHWAR, Y.; AHMAD, R.; SUNDER, A. S.; DEVILAL, J.; GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K. *In vitro* lipid peroxidation inhibitory and antimicrobial activity of *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae) extract. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v. 7, n. 1, p. 67-70, jan, 2013.

RDC n. 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 mar. 2010a.

RDC n. 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 mar. 2010a.

RDC n. 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, 5 abr. 2010b.

SABIR, S. M.; ROCHA, J.B.T. Water-extractable phytochemicals from *Phyllanthus niruri* exhibit distinct *in vitro* antioxidante an *in vivo* hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice. **Food Chemistry**, v. 111, p. 845-851, 2008.

SAMALI, A., FLORENCE, D. T., ODENIRAN, O. A. CORDELIA O.N. Evaluation of chemical constituents of *Phyllanthus niruri*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, p. 125-128, 2012.

SANTOS S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In.: **Farmacognosia: da Planta ao medicamento** SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2004, p. 635.

SANTOS, A. R.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 26, n. 7, p. 1499–1506, 1995.

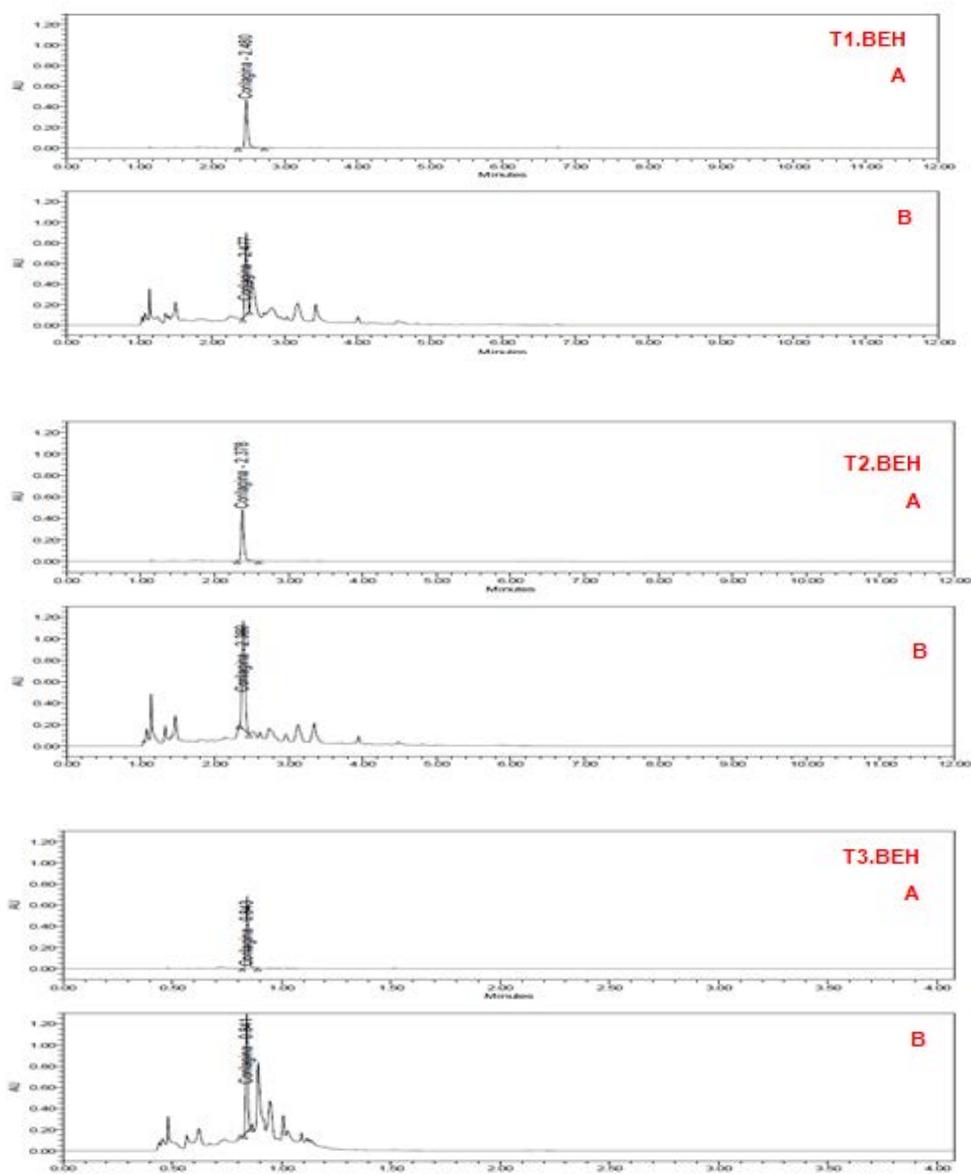
- SANTOS, R. M.; OLIVEIRA, M.S.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Seasonal variation in the phenol content of *Eugenis uniflora* L. leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 85-89, 2011.
- SANTOS, S. C.; COSTA, W. F.; BATISTA, f.; SANTOS, L. R.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. C. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 4, p. 552-556, Oct./Dec., 2006.
- SATYANARAYANA, P.; VENKATESWARLU, S. Isolation, structure and synthesis of new diarylbutane lignans from *Phyllanthus niruri*: synthesis of 5'-desmethoxy niranthin and an antitumor extractive. **Tetrahedron**, v. 47, n. 42, p. 8931-8940, 1991.
- SATYANARAYANA, P.; VENKATESWARLU, S. New seco and hydroxyl-lignans from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v.1, n. 1, p. 44-99, 1988.
- SHANKIL, N. A.; PANKAJ; KUMAR, J.; PANDEY, R. K.; SAXENA, D. B.; Nematicidal prenylated flavones from *Phyllanthus niruri*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 3, p. 759–764, 2008.
- SHARMA, M.; SINGH, T. Antimicrobial potency of *Phyllanthus niruri* L. on some clinical isolates. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.4, n. 1, s. B, p. 875-880, jan, 2013.
- SHIMIZU, M. HORIE, S.; TERASHIMA, S.; UENO, H.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; SUZUKI, S.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N. Studies on aldose reductase inhibitors from natural products. II. Active components of a Paraguayan crude drug “Para-parai mi” *Phyllanthus amarus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 9, p. 2531–2532, 1989.
- SIGMA ALDRICH Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 26/10/2013.
- SIMARNA KAUR; KHALID MAHMOOD; MICHAEL D. SOUTHHALL. **Extract of *Phyllanthus niruri***. US20110081308 A1, 1 Oct. 2010, 7 Apr. 2011.
- SINGH, B.; AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S. An acyclic triterpene from *Phyllanthus niruri*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 7, p. 1980-1981, 1989.
- SOARES, L. A. L.; BASSANI, V. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Total flavonoid determination for the quality control of aqueous extractives from *Phyllanthus niruri* L. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, n. 3, p. 203-207, 2003.

- SRIVASTAVA, V.; SINGH, M.; MALASONI, R.; SHANKER, K.; VERMA, R. K.; GUPTA, A. K.; KHANUJA, S. P. S. Separation and quantification of lignans in *Phyllanthus* species by simple chiral densitometric method. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 1, p.47-55, 2008.
- SUBEKI, S.; MATSUURA, H.; TAKAHASHI, K.; YAMASAKY, M.; YAMATO, O.; MAEDE, Y.; KATAKURA, K.; KOBAYASHI, S.; TRIMURNINGSIH, T.; CHAIRUL, C.; YOSHIHARA, T. Anti-babesial and antiplasmodial compounds from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 4, p. 537–539, 2005.
- TONA, L.; CIMANGA, R. K.; MESIA, K.; MUSUAMBA, C. T.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HERNANS, N.; VAN MIERT, S.; PIETERS, L.; TOTTÉ, J.; VLIETINCK, A. J. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 27-32, 2004.
- TONA, L.; PIETERS, L.; MESIA, K.; VLIETINCK, A. J.; NQIMBI, N. P.; CHRIMWAMI, B.; OKOND´AHOKA, C.; CIMANGA, K.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HERMANS, N.; TOTTE, J. *In vivo* antimalarial activity of *Cassia occidentalis*, *Morinda morinoides* and *Phyllanthus niruri*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 95, n.1, p. 47-57, 2001.
- TURK, C.; KNOLL, T.; PETRIK, A.; SARICA, K.; SEITZ, C.; STRAUB, M. Guidelines on urolithiasis. European Association of Urology. Disponível em: <<http://www.uroweb.org/guidelines/online-guidelines/>>. Acesso em: 15/12/2013.
- UENO, H.; HORIE, S.; NISHI, Y.; SHOGAWA, H.; KAWASAKI, M.; SUZUK, S.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; SHIMIZU, M.; OSHIWKI, M.; ORITA N.; Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. Geraniin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor from "paraparai mi," *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 2, n. 51, p. 357-359, 1988.
- UNANDER, D. W.; WEBSTER, G. L.; BLUMBERG, B. S. Records of usage or assays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). I. Subgenera *Isocladus*, *Kirganelia*, *Cicca* and *Emblica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p. 233- 264, 1990.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Filtração. Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/muller/operacoes_unitarias_qm/filtracao1.pdf>. Acesso em: 24/02/2014.
- VRHOVSEK, U.; MASUERO, D.; GASPEROTTI, M.; FRANCESCHI, P.; CAPUTI, L.; VIOLA, R.; MATTIVI, F. A versatile targeted metabolomics method for the rapid

- quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 8831–8840, 2012.
- WANG, M.; CHENG, H.; LI, Y.; MENG, L.; ZHAO, G.; MAI, K. Herbs of the genus *Phyllanthus* in the treatment of chronic hepatitis B: observations with three preparations from different geographic sites. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 126, p. 350–352, 1995.
- WATERS CORPORATION - **Acquity UPLC H-Class system guide**, Revision B, Milford. United States of America, 2010.
- WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99–105, 1998.
- YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; CAPPELARO, E. A.; DE VASCONCELOS, E. C.; TIBERTI, L. A.; PEREIRA, A. M. S.; FRANCA, S. C. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonoides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2. P. 162-168, Abr./Jun., 2005.
- YASIR, F.; WAQAR, M. A. Effect of indigenous plant extracts on calcium oxalate crystallization having a role in urolithiasis. **Urology Reserch**, v. 39, p. 345-350, 2011.
- YU, C. H.; HUI, T. Y.; NAN, W. S. Re-examination of chromogenic quantitative assays for determining flavonoid content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 2674-2681, 2012.
- ZHOU, M.; ZHU, H.; WANG, K.; WEI, W.; ZHANG, E. Y. Isolation and X-ray crystal structure of a securinega-type alkaloid from *Phyllanthus niruri* Linn. **Natural Product Research**, v. 26, n. 8, p. 762-764, 2012.
- ZUANAZZI, J. A.; S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In.: **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2004, p. 596.

9 ANEXO

9.1 Cromatogramas



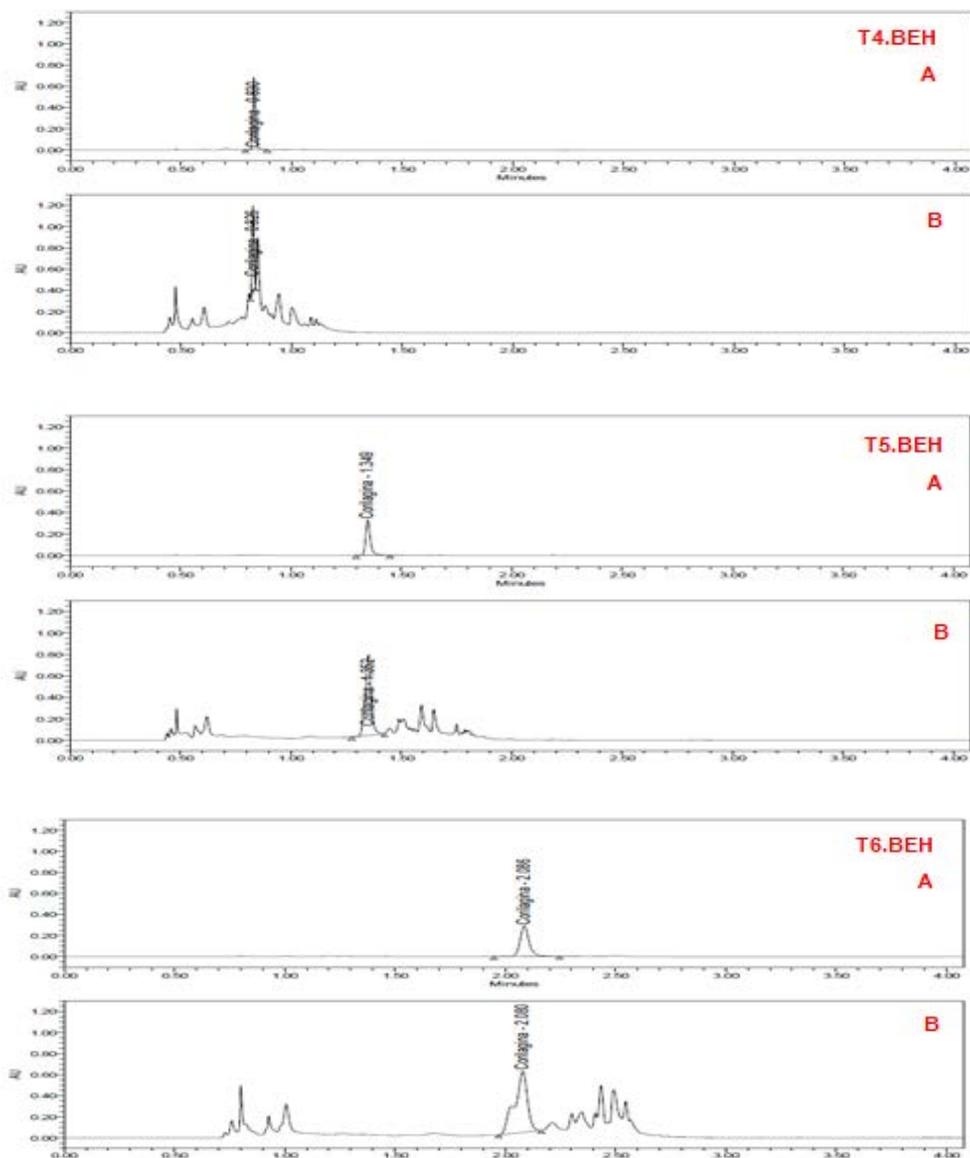
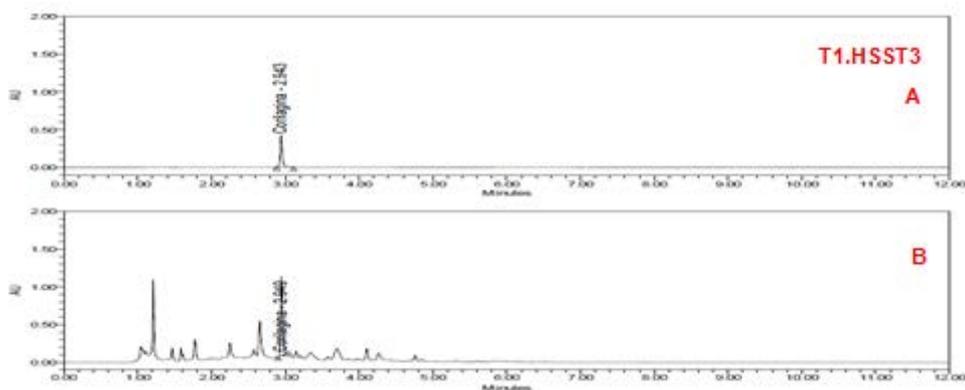
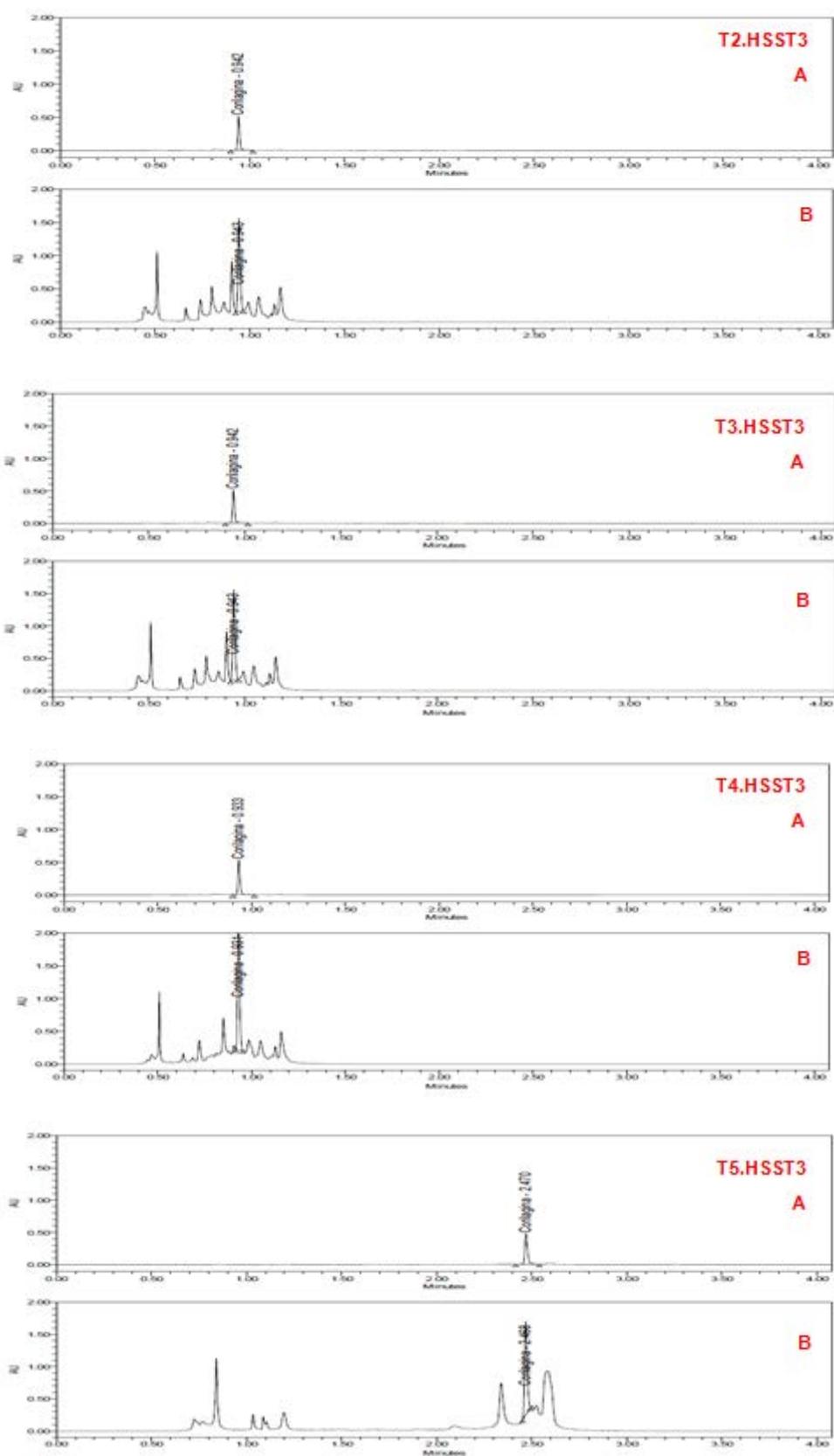
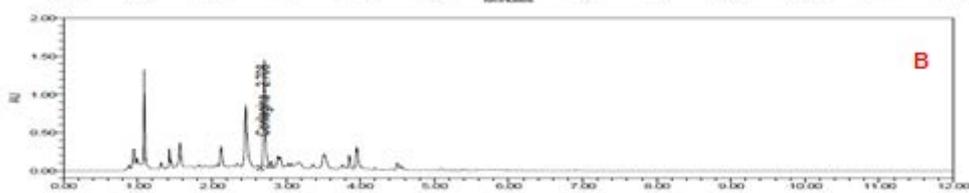
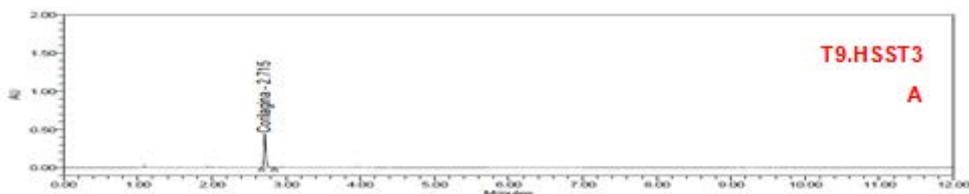
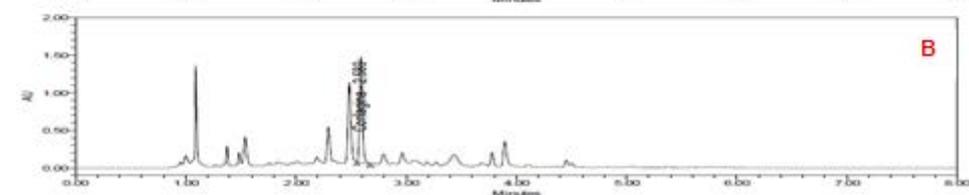
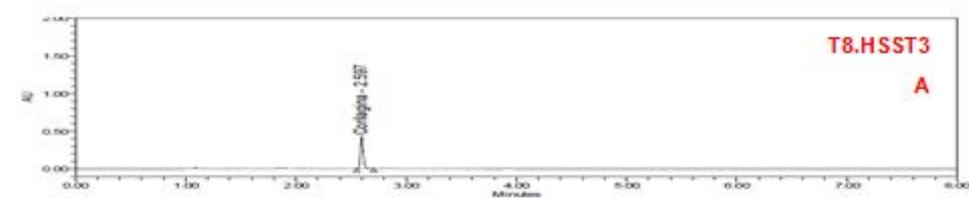
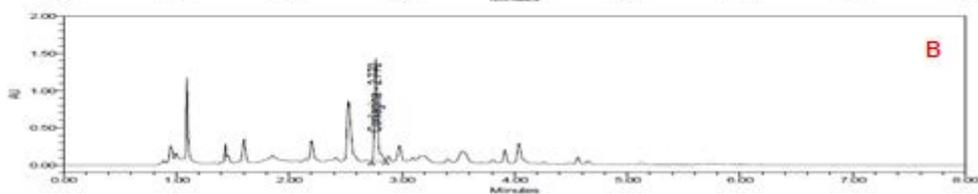
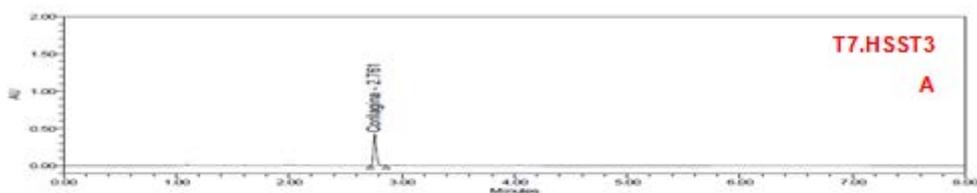
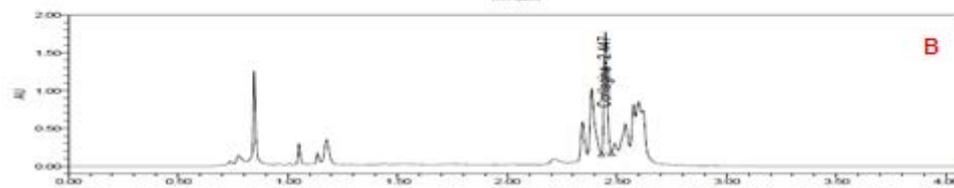
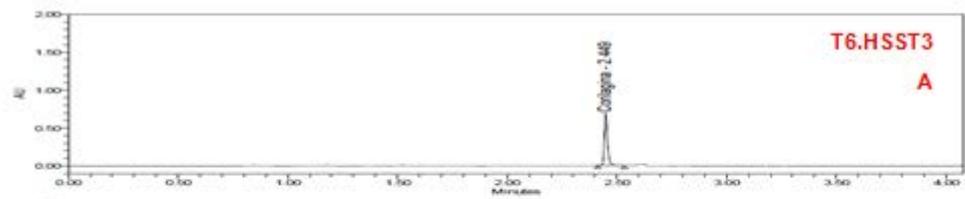


Figura 53 Cromatogramas corilagina (A) e EBS (B) dos testes T1 a T6 com coluna Fenil BEH







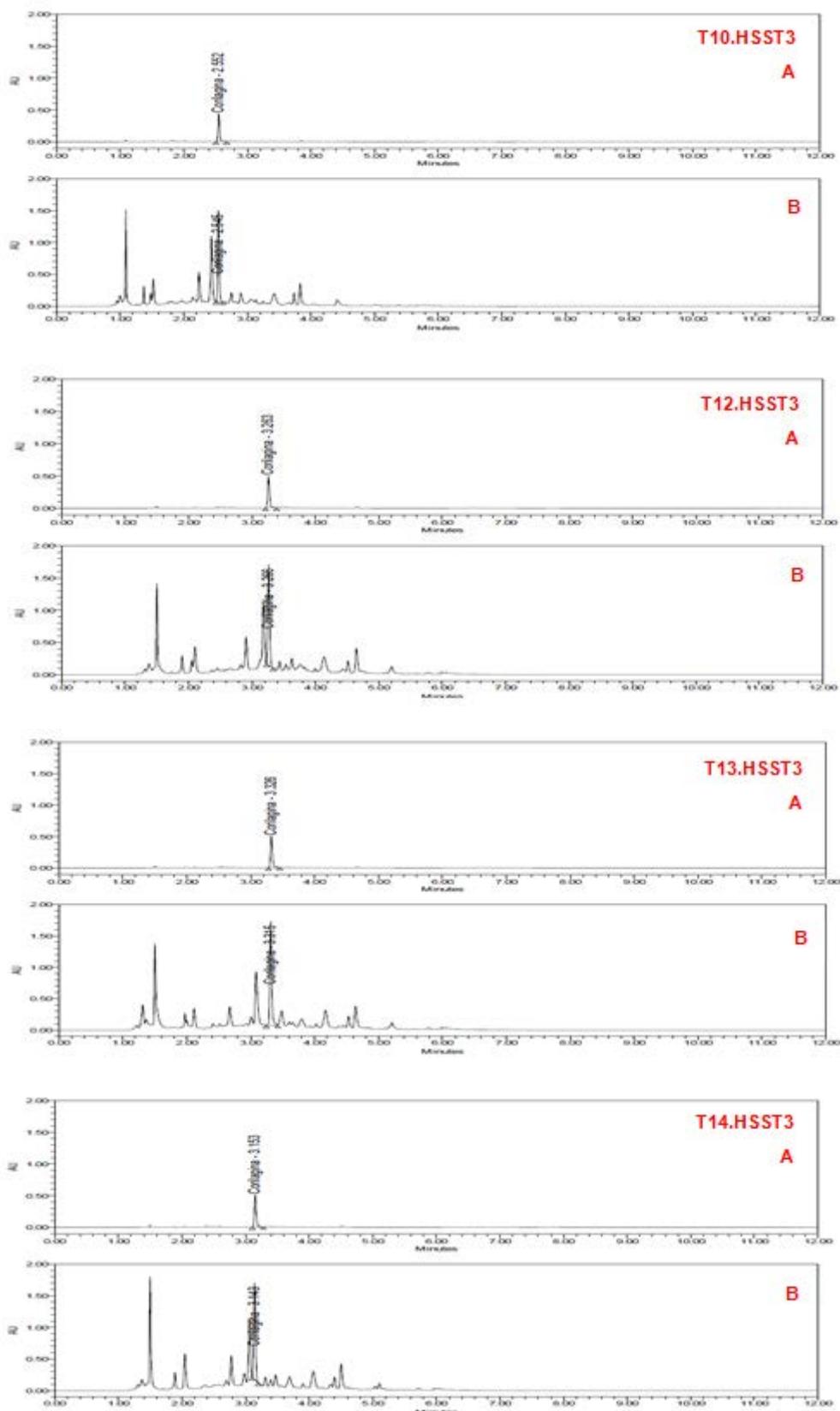


Figura 54 Cromatogramas corilagina (A) e EBS (B) dos testes T1 a T10, T12 a T14 com coluna HSS T3.