NATÁLIA COELHO DA SILVA

COMPARAÇÃO DO PERFIL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM DIFERENTES ÓRGÃOS DE *Phyllanthus niruri* L. (EUPHORBIACEAE)

Araraquara
2013

NATÁLIA COELHO DA SILVA

COMPARAÇÃO DO PERFIL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM DIFERENTES ÓRGÃOS DE *Phyllanthus niruri* L. (EUPHORBIACEAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Araraquara
2013

Dedico este trabalho aos meus pais, João e Nice, pelo apoio, compreensão e incentivo sempre prestados. Obrigada pelo carinho e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me iluminar nos momentos de dúvidas.

Aos meus pais, João e Nice, pelo amor, atenção, exemplo de dedicação e superação.

À Juventina Lopes, minha avó por consideração, pelo incentivo.

Ao meu namorado Édren Augusto, pelo apoio e palavras de motivação.

Ao meu irmão André, pelo exemplo de perseverança.

À todos os amigos de Araraquara com quem vivi momentos maravilhosos, e com quem também muito aprendi.

À minha grande e adimirada amiga Adriana Midori.

À todas as amizades que conquistei até aqui, que de alguma forma contribuíram para a pessoa que eu sou hoje.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP pela adequada estrutura oferecida e os ótimos profissionais com quem tive contato.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, pelos ensinamentos, paciência e atenção a mim dedicada.

Aos estagiários, pós-graduandos e ao técnico do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO 16
1.1. Urolitíase..... 18
1.2. *Phyllanthus niruri* L.....19
1.3 Aspectos químicos sobre *Phyllanthus niruri* L.....21
1.4 Aspectos farmacológicos sobre *Phyllanthus niruri* L.....24
1.5 Métodos de análise de *Phyllanthus niruri* L. por CLAE.....25

2. OBJETIVO.....40
2.1. Objetivo geral.....40
2.2. Objetivos específicos.....40

3. MÉTODOS.....40
3.1. Equipamentos, materiais e reagentes.....40
3.2. Coleta e preparo do material vegetal.....42
3.3. Obtenção dos extratos.....42
3.4. Análise dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)....43
3.5. Ensaios de identificação de alcaloides..... 45
3.6. Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....45
3.7. Determinação do teor de flavonoides totais.....46
3.8. Preparo dos extratos (*clean up*) para análise por CLUE.....47
3.9. Análise dos extratos por CLUE.....49

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....51
4.1. Rendimento das extrações..... 51
4.2. Fitoquímica.....53
4.2.1. Alcaloides.....54
4.2.2. Flavonoides.....57
4.2.3. Lignanas.....68
4.2.4. Taninos.....71
4.2.5. Terpenos.....78
4.3. Ensaio de identificação de alcaloides.....84
4.4. Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....84
4.5. Determinação do teor de flavonoides totais..... 88
4.6. Preparo dos extraos (*clean up*) para análise por CLUE.....92
4.7. Análise dos extratos por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.....93

5. CONCLUSÃO.....103

6. REFERÊNCIAS.....105

RESUMO

Phyllanthus niruri L. (Euphorbiaceae) destaca-se dentre as espécies medicinais importantes da flora brasileira. Seu uso no tratamento de cálculos renais aliado aos resultados de ensaios farmacológicos demonstram sua ação na prevenção da formação de cálculos e antiespasmódica. A urolitíase é uma patologia bastante comum, não havendo nenhum medicamento adequado para seu tratamento. A ANVISA inclui a espécie na Farmacopeia Brasileira 5ª ed. e no Formulário Nacional de Fitoterápicos. Trabalhos realizados com *P. niruri* utilizaram a planta inteira na produção de extratos aquosos e nenhum deles verificou diferenças químicas entre partes da planta. A informação sobre o perfil químico de diferentes partes pode conduzir ao uso daquelas que contenham as substâncias ativas em maior concentração, proporcionando facilidades tecnológicas. Contribui também para o conhecimento sobre o metabolismo da espécie. Neste trabalho propomos comparar o perfil de metabólitos secundários em diferentes partes de *P. niruri* L. O material vegetal foi seco, moído e submetido a extração com água, etanol e acetato de etila: hexano 1:1 (v/v). Análises cromatográficas e espectrofotométricas foram realizadas com os extratos de cada parte da planta com ênfase em alcaloides, flavonoides, lignanas, taninos, terpenos e compostos fenólicos do tipo C6-C1 (ácidos gálico e elágico), bem como foram avaliados os teores de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, ácido gálico, ácido elágico e corilagina. De forma geral, concluímos que o perfil químico de raízes é o que mais se distingue das demais partes da planta. Além disso, dentre os extratos aquosos obtidos, o extrato de raízes foi o que apresentou menor rendimento. Considerando-se também as dificuldades relacionadas ao uso de raízes, desde o manejo do cultivo até a produção da droga vegetal, como por exemplo, a contaminação por solo e micro-organismos, nossos dados sugerem o uso apenas de partes aéreas ou de folhas de *P. niruri* L. na produção de fitoterápicos ou medicamentos fitoterápicos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes aéreas de *P. niruri* L.; (Alonso, M. A; Amaral, M. C. E.).....20

Figura 2. Cromatograma CLAE-DAD de extrato fluido commercial de P. *niruri.* Colombo et al., 2009.....33

Figura 3: Estruturas químicas do ácido elágico (a), ácido gálico (b) e corilagina (c); (Markom et al., 2007).....51

Figura 4. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz visível.....54

Figura 5. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz UV 365 nm.....55

Figura 6. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA, aplicados nesta ordem da esquerda para a direita. Luz UV 254 nm.....55

Figura 7. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA, aplicados nesta ordem da esquerda para a direita. Revelação: reagente de Dragendorff.....56

Figura 8. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz UV 365nm.....59

Figura 9. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA, aplicados nesta ordem da esquerda para a direita. Revelação: ácido sulfúrico 10 %.....59

Figura 10. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz UV 254 nm.....61

Figura 11. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Revelação com cloreto férrico 3%.....62

Figura 12. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz UV 365nm após revelação com NP/PEG.....62

Figura 13. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz visível.....64

Figura 14. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz UV 365 nm.....64

Figura 15. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz UV 254nm.....65

Figura 16. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz UV 365 nm após revelação com NP/PEG...65

Figura 17. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, rutina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Revelação com cloreto férrico 3%.....67

Figura 18. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz visível.....68

Figura 19. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz UV 365 nm.....69

Figura 20. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz UV 254 nm.....69

Figura 21. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA, aplicados nesta ordem da esquerda para a direita. Revelação com anisaldeído sulfúrico....70

Figura 22. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz UV 365 nm.....72

Figura 23. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz UV 254 nm.....73

Figura 24. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Revelação com cloreto férrico 3 %.....73

Figura 25. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, ácido gálico, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz visível.....75

Figura 26. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, ácido gálico, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz UV 365 nm.....75

Figura 27. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, ácido gálico, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz UV 254 nm.....76

Figura 28. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, ácido gálico, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Revelação com cloreto férrico 3 %.....76

Figura 29. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz visível.....79

Figura 30. Observação sob luz UV 365nm da cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita.observada em UV 365nm.....79

Figura 31. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz UV 254 nm.....80

Figura 32. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Revelação com ácido sulfúrico 10 %....80

Figura 33. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Revelação com anisaldeído sulfúrico...81

Figura 34. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Luz visível.....82

Figura 35. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. Revelação com anisaldeído.....83

Figura 36. Curva analítica obtida para o ácido gálico para determinação do teor de fenólicos totais utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu.....85

Figura 37. Possíveis complexos cromogênicos gerados por íons de alumínio com substituintes funcionais de flavonóis e flavonas.....88

Figura 38. Curva analítica obtida para a quercetina para determinação do teor de flavonoides totais utilizando o reagente complexante cloreto de alumínio.....89

Figura 39. Curva analítica do ácido elágico.....94

Figura 40. Curva analítica do ácido gálico.....94

Figura 41. Curva analítica da corilagina.....94

Figura 42. Cromatograma do ácido elágico na concentração de 37,96 µg/mL, referente à curva analítica.....94

Figura 43. Cromatograma do ácido gálico na concentração de 41,15 µg/mL, referente à curva analítica.....95

Figura 44. Cromatograma da corilagina na concentração de 68,48 µg/mL, referente à curva analítica.....95

Figura 45. Cromatograma da amostra 1CAq.....97

Figura 46. Cromatograma da amostra 2CAq.....97

Figura 47. Cromatograma da amostra 2FFAq.....98

Figura 48. Cromatograma da amostra 1FAq.....98

Figura 49. Cromatograma da amostra 2FAq.....98

Figura 50. Cromatograma da amostra 1RAq.....99

Figura 51. Cromatograma da amostra 1CEt.....99

Figura 52. Cromatograma da amostra 2CEt.....99

Figura 53. Cromatograma da amostra 2FFEt.....100

Figura 54. Cromatograma da amostra 1FEt.....100

Figura 55. Cromatograma da amostra 2FEt.....100

Figura 56. Sobreposição dos cromatogramas referentes à análise dos extratos 1CAq, 2CAq, 2FFAq, 1FAq, 2FAq e 1RAq, da frente para trás.....101

Figura 57. Teor em porcentagem de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e fenólicos (soma dos três anteriores) nos extratos aquosos de diferentes partes de *P. niruri*.....101

Figura 58. Sobreposição dos cromatogramas referentes à análise dos extratos 1CEt, 2CEt, 2FFEt, 1FEt e 2FEt, da frente para trás.....101

Figura 59. Teor em porcentagem de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e fenólicos (soma dos três anteriores) nos extratos etanólicos de diferentes partes de *P. niruri*.....102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metabólitos secundários de *Phyllanthus niruri* L.....23

Tabela 2. Comparação dos métodos de CLAE apresentados para análise de *Phyllanthus niruri* L.....38

Tabela 3. Códigos para identificação dos extratos de diferentes partes de *P. niruri* L., produzidos com diferentes solventes em extração sequencial.....43

Tabela 4. Método analítico transferido de CLAE-DAD para CLUE-DAD.....50

Tabela 5. Rendimento das extrações sequenciais com água, etanol e acetato de etila:hexano 1:1 de diferentes partes de *P. niruri* L.....52

Tabela 6. Resultados das análises por CCD para identificação de alcaloides e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 2 a 4).....56

Tabela 7. Resultados das análises por CCD para identificação de flavonoides e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 5 a 7).....60

Tabela 8. Resultados das análises por CCD para identificação de flavonoides e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 8 a 10).....63

Tabela 9. Resultados das análises por CCD para identificação de flavonoides e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 11 a 14).....66

Tabela 10. Resultados das análises por CCD para identificação de flavonoides e rutina e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figura 15).....67

Tabela 11. Resultados das análises por CCD para identificação de lignanas e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 16 a 19).....70

Tabela 12. Resultados das análises por CCD para identificação de taninos e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 20 a 22).....74

Tabela 13. Resultados das análises por CCD para identificação de taninos e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 23 a 26).....77

Tabela 14. Resultados das análises por CCD para identificação de corilagina e comparação dos R_f.....78

Tabela 15. Resultados das análises por CCD para identificação de terpenos e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 28 a 32).....81

Tabela 16. Resultados das análises por CCD para identificação de terpenos e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 33 e 34).....83

Tabela 17. Dados de absorbância relativos às soluções de ácido gálico de diferentes concentrações.....85

Tabela 18. Dados de absorbância relativos às soluções dos extratos.....86

Tabela 19. Teor de fenólicos totais nos extratos de *P. niruri* L.....87

Tabela 20. Dados de absorbância relativos às soluções de quercetina de diferentes concentrações.....89

Tabela 21. Dados de absorbância relativos às soluções dos extratos.....90

Tabela 22. Teor de flavonoides totais expressos como quercetina nos extratos de *P. niruri* L.....91

Tabela 23. Massa e rendimento obtido no pré-tratamento das amostras para análise por CLUE.....93

Tabela 24. Dados relativos às curvas analíticas de ácido elágico, ácido gálico e corilagina.....93

Tabela 25. Concentração de ácido elágico nos extratos aquosos e etanólicos. t_R = 4,7 min. 96

Tabela 26. Concentração de ácido gálico nos extratos aquosos e etanólicos. t_R = 2,1 min. 96

Tabela 27. Concentração de corilagina nos extratos aquosos e etanólicos. t_R = 3,4 min.....97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência associada à Espectroscopia UV
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CLUE-EM	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
EFS	Extração em Fase Sólida
BAR-EM	Bombardeamento Atómico Rápido - Espectrometria de Massa
FM	Fase Móvel
VIH	Virus da Imunodeficiência Humana
CLAE-EM-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos
LDD	Limite de detecção
LDQ	Limite de quantificação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
t_R	Tempo de Retenção
UV/Vis	Ultravioleta/visível

1. INTRODUÇÃO

Há muito tempo substâncias derivadas de produtos naturais são opções para o tratamento de diversas moléstias. Grande parte dos medicamentos comercializados atualmente é derivada de vertebrados e invertebrados terrestres, micro-organismos e vegetais, sendo que os compostos químicos de origem vegetal apresentam grande diversidade estrutural, o que os caracterizam como importantes fontes para a busca de substâncias com potencial terapêutico, menor toxicidade e maior eficácia. Essas moléculas de origem vegetal servem também como modelo para a obtenção de novos fármacos (BRANDÃO et al., 2010; NEWMAN et al., 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 a cerca 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 desenvolvidos 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).

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* L. 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 foi realizada a comparação do perfil de metabólitos secundários dos extratos aquosos, etanólicos e hexano: acetato de etila de caules, flores/frutos, folhas e raízes de *P. niruri* L., fornecendo informações para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico ou para seu uso como fitoterápico

(infuso), uma vez que a análise dos resultados demonstrou as diferenças químicas qualitativas e quantitativas entre as diferentes partes.

1.1. UROLITÍASE

A litíase urinária ou urolitíase é uma patologia que atinge o homem desde a antiguidade, visto que já no ano 4800 a.C. foram encontradas em El Amrah múmias egípcias com litíase urinária. Também Hipócrates, no século IV a.C., faz referência à litíase urinária, discursando sobre a necessidade dos portadores desta patologia serem observados por especialistas da área. A partir de meados da década de 1980, com o advento dos procedimentos de litotrícia extracorpórea e endoscopia urológica, o número de casos de litíase reportados diminuiu, tendo em vista que os novos procedimentos tornaram a abordagem terapêutica - que antes era apenas cirúrgica - menos agressiva e com morbidade e mortalidade menores. Porém, o desenvolvimento tecnológico acarretou um menor interesse em relação à profilaxia da litíase urinária. Assim, apesar de progressos substanciais na fisiopatologia e tratamento da doença, não há nenhum medicamento adequado para uso na terapia clínica (BARROS et al., 2003; GOMES et al., 2001).

A urolitíase é uma patologia bastante comum, apresentando alta taxa de recorrência. Sua presença é estimada em 3% da população geral, 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).

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. 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).

1.2. *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. anisolobus*, *P. orbiculatus*, *P. emblica*, *P. oxyphyllus*, *P. flexuosus*, *P. raticulatus*, *P. fraternes*, *P. simplex*, *P. mullernus*, *P. urinaria*, *P. mytrifolis*, *P. virgatus*, *P. niruri* e *P. watsonii* foram investigadas em estudos fitoquímicos e farmacológicos (BAGALKOTKAR et al., 2006; EMBRAPA, 2006).

No Brasil, algumas espécies do gênero *Phyllanthus* são conhecidas popularmente como quebra-pedra, erva-pombinha, arrebenta-pedra, dentre outros nomes (CALIXTO et al., 1998). Ocorrem em quase todo território nacional, porém, existem predominâncias regionais de espécies, subespécies ou formas (UNANDER et al., 1990). A semelhança existente entre *P. niruri* L. e *P. tenellus* Roxb. – as duas únicas espécies de *Phyllanthus* reconhecidas pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição - dificulta a identificação dessas espécies, podendo explicar em parte o uso de ambas na medicina popular para os mesmos fins (BRASIL, 2010b; UNANDER et al., 1990).

Dentre as espécies de *Phyllanthus*, *P. niruri* L. (Figura1) 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* L. 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, 2010b).

Figura 1. Partes aéreas de *P. niruri* L.; (Alonso, M. A; Amaral, M. C. E.).

Na medicina tradicional e popular brasileira, a 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 herbal, 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 agronômicos (CALIXTO et al., 1998; COUTO et al., 2013b; BAGALKOTKAR et al., 2006; BARROS et al., 2006; MOREIRA et al., 2013).

1.3. ASPECTOS QUÍMICOS SOBRE *Phyllanthus niruri* L.

Metabólitos secundários isolados de *P. niruri* L. incluem lignanas, taninos hidrolisáveis, cumarinas, terpenos (monoterpenos e triterpenos), flavonoides (diversas classes) e alcaloides do tipo da securinina, que foram encontrados nas folhas, caules e raízes desta planta (BAGALKOTKAR et al., 2006; CALIXTO et al., 1998; HASSARAJANI; MULCHANDANI, 1990; ZHOU et al., 2012). A Tabela 1 relaciona os metabólitos secundários isolados/identificados de/em *P. niruri* L.

Tanto no emprego na medicina popular quando em estudos a cerca 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, 2010b). Com base nisso, Couto et al. (2013a) procuraram avaliar as atividades anti-inflamatória e antialodínica, bem como a composição química, dos extratos aquosos secos (*spray dryer*) 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. Esse fato é devido provavelmente a presença de outros componentes relevantes para a função fisiológica específica das 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, iniciado em fevereiro de 2012. 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.

Tabela 1. Metabólitos secundários de *Phyllanthus niruri* L.

CLASSE	METABÓLITO SECUNDÁRIO
ALCALOIDES	4-hidroxisecurinina 4-metoxidiidronorsecurinina 4-metoxitetraidrosecurinina alosecurinina diidrosecurinina epibubbialina nirurina norsecurinina securinina securinol A, securinol B tetraidrosecurinina
MONOTERPENOS	*p*-cimeno limoneno
TRITERPENOS	3,7,11,15,19,23-hexametil-2*Z*,6*Z*,10*Z*,14*E*,18*E*,22*E*-tetracosenen-1-ol acetato de lupeol filanteol filantenol filantenona lupeol
FLAVONOIDES	astragalina canferol-4´-ramnopiranosideo eridioctiol-7-ramnopiranosideo fisetina-4-o-glicosideo flavanona-5-o-rutinosídeo galocatequina isoquercitrina niruriflavona nirurina quercetina quercetol quercitrina rutina
LIGNANAS	2,3-demetoxisecoisolintetralina 3,4-dimetilenodioxibenzil-3´,4´-dimetoxibezilbutirolactona diacetato de 2,3-demetoxisecoisolintetralina filantina filnirurina filtetralina hidroxinirantina hinoquinona hipofilantina isolintetralina nirantina nirfilina nirtetralina, nirtetralina A e nirtetralina B seco-4-hidroxilintetralina trimetil éter de secoisolariciresinol
TANINOS HIDROLISÁVEIS (e substâncias relacionadas)	1-O-galoil-6-O-luteoil-α-D-glicose ácido gálico ácido repandusínico corilagina geraniina nirurisideo β-glicogalina
CUMARINAS	ácido elágico metilbrevifolincarboxilato

1.4. ASPECTOS FARMACOLÓGICOS SOBRE *Phyllanthus niruri* L.

Phyllanthus niruri L. contém lignanas, alcaloides, terpenoides e taninos, que se destacam por terem os seguintes efeitos: hepatoproteção, ação antiinflamatória, antagonismo da endotelina-1, inibição da transcriptase reversa e replicação do VIH, ação anti-hepatite e aumento da citotoxicidade da vimblastina contra células cancerosas multirresistentes (MURUGAIYAH; CHAN, 2007).

Estudos conduzidos por Campos e Schor (1999) demonstraram que o extrato aquoso de *P. niruri* L. produziu a inibição da internalização de cristais de oxalato de cálcio (CaOx) por células renais de cão, 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* L. 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.

Em estudo clínico, o chá de *P. niruri* L. 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 hipercalciúricos (NISHIURA et al., 2004). Portanto, esses efeitos estão relacionados com o potencial preventivo da formação de cálculos renais de *P. niruri* L. (BARROS et al., 2006).

Murugaiyah e Chan (2007) investigaram os potenciais efeitos antihiperuricêmicos de *P. niruri* L. 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).

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* L., uma vez que também está presente nas raízes desta planta. Outras atividades apresentadas por *P. niruri* L. incluem ação antinoniceptiva (CALIXTO et al., 1998), anti-viral e antiplasmótica (TONA et al., 2001, 2004).

1.5. MÉTODOS DE ANÁLISE DE *Phyllanthus niruri* L. POR CLAE

Em levantamento bibliográfico feito em julho/2013 foram encontrados 16 artigos utilizando métodos de CLAE para análise (ou purificação de substâncias) de *P. niruri* L.. Esse número não reflete porém, o número de métodos desenvolvidos descritos para a espécie, uma vez que muitos autores não desenvolveram novos métodos de CLAE para análises de *P. niruri* L., mas apenas utilizaram e citaram em seus artigos métodos já descritos. A seguir são apresentadas peculiaridades sobre cada método encontrado, sendo que a Tabela 2 ao final deste item traz um resumo das principais características de cada um. Métodos de CLAE preparativa para purificação de substâncias a partir de *P. niruri* L. também foram incluídos. As informações encontradas serão apresentadas em ordem cronológica.

Ogata et al. (1992) publicaram o artigo “HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor from *Phyllanthus niruri*”, no qual utilizaram CLAE semipreparativa na etapa final de purificação do ácido repandusínico A, composto originalmente isolado de *Mallotus*

repandus, que foi identificado por Resonância Magnética Nuclear (RMN). As condições cromatográficas na purificação foram: coluna C18 YMC-AM 312 (6,0 X 150 mm), gradiente de fase móvel de 3-43% de acetonitrila em água com 10 mM de NaH_2PO_4, tempo de corrida de 20 min, vazão de 1 mL/min, detecção em 280 nm, volume de injeção de 40 μL. Dos picos apresentados, os principais (picos 1 e 2) foram isolados e suas estruturas foram examinadas. O pico 2 não era um inibidor muito forte e foi identificado como sendo brevifolina por comparação com RMN e BAR-EM. O pico 1 exibiu uma atividade inibitória muito forte de transcriptase reversa do VIH e foi identificado como ácido repandusínico A.

Cutrone et al. (1996) isolaram um novo composto (nirurisídeo) do extrato de folhas de *P. niruri* L. utilizando partição líquido-líquido, cromatografia em coluna e cromatograffia em camada delgada. O composto foi tido como um novo inibidor da ligação da regulação da expressão do vírion do VIH e do elemento responsável pela ligação da regulação da expressão do vírion do VIH. No mesmo trabalho, uma das frações obtidas (300 mg) foi submetida à purificação por CLAE utilizando uma coluna semipreparativa C18 YMC (20 x 250 mm; 7 μm) eluída com acetonitrila: água 40:60 (v/v). Foram purificados os compostos rutina (t_R: 16,5 min; 33 mg) e canferol-3-*O*-rutinosídeo (t_R: 25,5 min; 10 mg).

De Souza et al. (2002) validaram um método de cromatografia líquida para análise de compostos fenólicos no extrato aquoso de partes aéreas de *P. niruri* L. As análises foram conduzidas com coluna C18 LiChrospher® (4 x 250 mm; 5 μm) acoplada a uma pré-coluna C18 Shimadzu® (4 x 10 mm). Um detector de arranjo de diodo Waters® foi utilizado para checar a pureza do pico de cada composto. Fase móvel: solução aquosa de ácido fosfórico 1% (p/p) e acetonitrila: sol. aquosa ácido fosfórico 1% (p/p) 50:50 (v/v). A vazão foi de 0,6 mL/min e o programa de gradiente

foi o seguinte: 22-24% de B (7min), 24-40% de B (10 min), 40-100% de B (8 min), 100-22% de B (15 min). O volume injetado foi de 20 μL. Os picos foram detectados em 275 nm. O pico chamado de 1, que apresentou t_R de 6,6 min, foi identificado por comparação do tempo de retenção com o padrão ácido gálico, através de comparação com o espectro no UV/Vis e co-cromatografia com ácido gálico. O espectro no UV/Vis do pico 2, com t_R de 20,2 min pode ser atribuído a uma flavona e o pico 3, com t_R de 21,5 min como um derivado do ácido gálico. O método de CLAE desenvolvido para analisar os compostos fenólicos de extratos aquosos de *P. niruri* L.foi linear e reprodutível para todos os picos selecionados.

Murugaiyah e Chan (2006) publicaram um artigo a cerca da atividade anti-hiperuricêmica de lignanas de folhas de *P. niruri* L., no qual as análises foram conduzidas utilizando as partes aéreas da planta. A concentração de filantina, hipofilantina e filtetralina no extrato metanólico, nas frações e sub-frações foi determinada usando um sistema de CLAE *Agilent 1100 Series* equipado com um detector de fluorescência e o *software* ChemStation A.08.03. Uma coluna Inertsil ODS-3 (4,6 x 250 mm) foi utilizada com a seguinte condição analítica: fase móvel de acetonitrila: água (55:45), vazão de 1,0 mL/min, comprimento de onda de excitação de 280 nm e de emissão de 344 nm. A atividade anti-hiperuricêmica de *P. niruri* foi atribuída as lignanas constituintes, filantina, hipofilantina e filtetralina. No entanto, os mecanismos de seus efeitos antihiperuricêmicos não foram determinados.

Já em 2007 (a), Murugaiyah e Chan determinaram quatro lignanas em *P. niruri* L. por um novo e simples método analítico usando CLAE com detecção por fluorescência. O método já utilizado em 2006 para análise de 3 lignanas teve agora sua validação descrita para análise de 4 lignanas - filantina, hipofilantina, filtetralina e nirantina. A quantificação das lignanas foi realizada em duas partes. A primeira parte envolveu a quantificação de lignanas em extratos metanólicos de partes aéreas de

P. niruri L. coletadas de seis diferentes localizações geográficas de Penang (Malásia), enquanto que a segunda parte envolveu a quantificação das lignanas em extratos metanólicos das diferentes partes (folhas, frutos, ramos, caule e raízes) de *P. niruri* L. coletadas de Bukit Mertajam em Penang (Malásia). O sistema utilizado neste método empregou um detector de fluorescência operando com comprimento de onda de excitação em 280 nm e de emissão em 344 nm. Uma coluna Inertsil ODS-3 foi utilizada. Os autores obtiveram uma separação ótima (melhor resolução e forma de pico) com o uso da fase móvel (FM) isocrática constituída por acetonitrila:água (55:45 v/v), comparada com a FM metanol:água e com outras proporções de acetonitrila:água, uma vez que o teor de acetonitrila quando inferior a 50% na FM resultou em picos largos de lignanas, além de tempo de análise muito longo, enquanto o aumento para mais de 60% de acetonitrila resultou na co-eluição de picos (1 e 2). A vazão foi de 1,0 mL/min, e o experimento foi realizado à temperatura ambiente (25°C). O volume de amostra injetado foi 20 μL e o tempo de corrida total foi de 37 min. O método foi comparado com um método por CLAE com detecção por UV comumente usado. Para a detecção pelo método CLAE-UV (230 nm), foram geradas curvas de calibração dos quatro compostos padrão. O método de CLAE com detecção por fluorescência registrou limites de detecção de 0,61 ng/mL para filantina (equivalente a 1,46 nM), 0,61 ng/mL para filtetralia (equivalente a 1,47 nM), 6,10 ng/mL para hipofilantina (equivalente a 14,2 nM) e 1,22 ng/mL para nirantina (equivalente a 2,84 nM), sendo de 80, 80, 8 e 40 vezes, respectivamente, mais baixos quando em comparação com método por CLAE-UV. Os limites de quantificação foram 4,88 ng/mL (equivalente a 11,7 e 11,7 nM, respectivamente) para filantina e piltetralina, 9,76 ng/mL (equivalente a 22,7 nM) para nirantina e 24,4 ng/mL (equivalente a 56,8 nM) para hipofilantina, exibindo 40, 8 e 20 vezes, respectivamente, menores que de método de detecção UV.

Para o método de detecção por CLAE-UV, as curvas de calibração de todos os quatro padrões de lignanas foram lineares em toda a faixa de concentração investigada. As curvas de calibração de **1**, **3** e **4** obtidos com o método de detecção por CLAE de fluorescência foram lineares durante os intervalos de concentração investigada, em contraste, **2** foi linear em 24,4-2500 ng/mL. Assim, o método por CLAE com detecção por fluorescência aplicado na análise de lignanas de *P. niruri* L. ofereceu melhor sensibilidade do que o método de detecção por CLAE-UV. Além disso, este último em um comprimento de onda inferior a 230 nm pode ser afetado por interferentes da matriz a partir do extrato metanólico bruto, sendo o método com detecção por fluorescência também mais seletivo. O presente método permitiu a quantificação de uma baixa quantidade de lignanas (especialmente o composto **3**). Foi a primeira vez que um método de detecção por CLAE-fluorescência simples e sensível para a determinação simultânea de quatro lignanas em *P. niruri* L. foi desenvolvido. O método foi considerado exato e preciso, sendo aplicado com sucesso para a determinação quantitativa das lignanas em amostras de *P. niruri* L. recolhidas a partir de várias localizações.

Ainda em 2007 (b), Murugaiyah e Chan publicaram um artigo no qual utilizaram o método de CLAE descrito acima em um estudo de farmacocinética e na análise de lignanas de *P. niruri* L. em plasma. O método foi aplicado com sucesso no estudo da farmacocinética das lignanas de *P. niruri* L. em ratos.

Markom et al. (2007) analisaram os efeitos de solventes e métodos para extração de taninos hidrolisáveis de *P. niruri* L. As análises dos taninos nos extratos foram conduzidas utilizando um CLAE equipado com um autoamostrador e um detector UV/Vis Agilent Technologies. Foi utilizada coluna de fase reversa C18 Genesis (4,6 x 250 mm; 4 μm). A separação cromatográfica foi desenvolvida utilizando como fase móvel 0,1% de ácido fosfórico em água (solvente A) e

acetonitrila (solvente B) com gradiente de solvente B: 8–22% (35 min), 22–8% (10 min), a uma vazão de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 20 μL e a detecção em 270 nm. Amostras secas e trituradas de caules e partes aéreas de *P. niruri* L. foram obtidas a partir de Nova Laboratories Sdn. Bhd (Malásia), sendo estas as mesmas utilizadas para fabricação do produto comercial à base de *P. niruri* L.: HEPAR-P™ (cápsula desenvolvida pela Nova Laboratories Sdn. Bhd que contém 250 mg de *P. niruri* padronizada em 4% de corilagina e 18% de flavonoides totais). Como padrões de referência foram utilizados o ácido gálico e o ácido elágico, ambos de pureza 98%; a geranina isolada (pureza desconhecida) e a corilagina (pureza de 98%). Soluções padrão de ácido gálico foram preparadas em água, com concentrações entre 0,75-1,2 mg/mL; enquanto que soluções de ácido elágico foram preparadas em etanol 50%, com concentrações variando de 2,5-1 mg/mL. Solução de corilagina foi preparada pela Nova Laboratories Sdn. Bhd (Malásia) em solventes de diluição apropriados em concentração de 0,5 mg/mL. Hepar-P™ e os extratos foram dissolvidos em etanol 50% em concentrações de 1-5 mg/mL. Todos os padrões e soluções de extratos foram sonicados durante 30 min a 60° C a fim de remover bolhas de ar e garantir que todos os sólidos fossem completamente dissolvidos antes da análise por CLAE. Antes de serem injetadas, todas as soluções de amostra foram pré-filtradas em membranas (*Nylon;* 0,45 μm). Picos cromatográficos foram identificados através da comparação com os t_R dos padrões ácido elágico, ácido gálico e corilagina, sendo o conteúdo destes nos extratos calculado com base nas áreas dos picos e correspondentes concentrações injetadas. A presença de quatro picos de componentes principais foi consistentemente detectada nos cromatogramas de HEPAR-P™ e em alguns dos extratos de *P. niruri* L.. No cromatograma do extrato padronizado Hepar-P™ foram identificados o ácido gálico, o ácido elágico e a

corilagina por comparação com os padrões externos, que apresentam t_R de 5,4, 18,9 e 31,2 min, respectivamente. A presença de geranina não pôde ser verificada neste estudo com base no método desenvolvido; os autores sugeriram que o método por CLAE usado não seja adequado para a detecção de geranina ou que esta substância possa ter sido hidrolisada, resultando assim, em menor pureza e produção de vários artefatos. A hidrólise e a alcoólise culminando na formação de componentes mais simples, tais como corilagina, brevifolina ácido carboxílico, ácido gálico e ácido elágico pode ter ocorrido na presença de água e de álcoois em altas temperaturas. A presença de geranina foi previamente confirmada pelo método de RMN depois de multietapas de fracionamento e processos de isolamento.

O método por CLAE desenvolvido por De Souza et al. (2002) foi aplicado em dois outros trabalhos envolvendo tecnologia de fitoterápicos (De Souza et al., 2007; 2009) na avaliação do teor de ácido gálico em extratos secos obtidos por *spray dryer*, granulados e comprimidos.

Colombo et al. (2009) desenvolveram e validaram um método por CLAE para quantificação de corilagina tanto nas folhas quanto em extratos comerciais de *P. niruri* L. A Anidro do Brasil Extrações Ltda. (Grupo Centroflora), Botucatu-SP, forneceu 3 extratos industriais obtidos das folhas maceradas da planta (pó seco, pó seco solúvel em água, extrato fluido) e o material vegetal referente às folhas de *P. niruri* L., que foi seco sob fluxo de à 40° C e armazenado à temperatura ambiente por 6 meses. Com base em dados fornecidos por estudos preliminares realizados pelo próprio grupo, os parâmetros cromatográficos (coluna, fase móvel, taxa de fluxo e programa de eluição) foram otimizados, a fim de proporcionar uma melhor separação dos componentes e um tempo de análise mais curto. A validação do método otimizado foi conduzida utilizando-se um cromatógrafo líquido Alliance® modelo 2795 equipado com um DAD modelo 996 e uma coluna Phenomenex® Luna

fenil-hexil (4,6 x 250 mm; 5 μm, 100Å) protegida por uma coluna de guarda fenil-hexil (4,0 x 3,0 mm; 5 μm; 100 Å). A fase móvel foi composta por uma mistura de solventes A (solução aquosa de ácido acético 1%) e B (acetonitrila), a vazão foi de 1,0 mL/min, o volume de injeção foi de 20 μL e a coluna foi mantida à temperatura ambiente durante a análise. O gradiente definido para ser empregado no método analítico desenvolvido foi: 0-12 min, 13-37% B; 12-13 min, 37-100% B; 13-15 min, 100% B; 15-16 min, 100-13% B; e 16-30 min isocrática a 13% B. O cromatograma foi monitorado em 267 nm e os espectros no UV dos picos obtidos foram registrados na faixa de 200-400 nm. Um método de padrão externo foi utilizado para construir a curva analítica para corilagina (pureza 97%). Os valores de LDD e LDQ foram iguais a 0,987 e 3,29 mg/L, respectivamente. Vários estudos têm indicado que corilagina (Figura 2, pico 1) é um dos principais compostos responsáveis pela atividade farmacológica de *P. niruri*, assim, neste estudo foi desenvolvido um método simples e eficiente para seu isolamento. Por meio deste método, outros dois compostos característicos de *P. niruri* também foram isolados: rutina (Figura 2, pico 2) e 3,4,5-triidroxibenzoato de etila (Figura 2, pico 3). Resumidamente, após o fracionamento do extrato metanólico por meio de cromatografia em coluna em fase reversa (C18), algumas das frações obtidas foram submetidas a CLAE semipreparativa utilizando coluna Phenomenex Luna® C18 (21,2 x 250; 10 μm; 100 Å) eluída em modo isocrático com sol. aquosa 0,1% de ácido acético: acetonitrila 80:20 (v/v) com vazão de 17,0 mL*min^{-1} e leitura de absorbância em 254 nm.

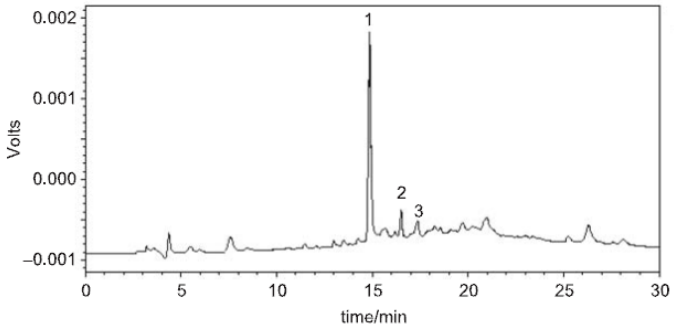

Figura 2. Cromatograma CLAE-DAD de extrato fluido commercial de P. *niruri.* Colombo et al., 2009.

As estruturas dos três compostos, isolados sob a forma de pó amorfo castanho escuro, foram identificadas por análise de RMN e confirmadas por comparação com os dados espectrais disponíveis na literatura. É possível que estes componentes possam também ser aplicados como marcadores fitoquímicos.

Markom et al. (2010) estudaram método de extração de taninos hidrolisáveis de *P. niruri* L. por água pressurizada. A análise dos componentes químicos foi conduzida usando uma técnica de CLAE-UV/Vis. O método de análise foi modificado de um método de identificação da catequina em chá verde. A coluna utilizada para a análise foi de fase reversa C18 Genesis (4,6 x 250 mm; 4 μm). A separação cromatográfica foi conduzida usando uma fase móvel com sol. aquosa 0,1 % de ácido fosfórico (solvente A) e acetonitrila (solvente B) com um gradiente de solvente B: 8-22 % (35 min), 22-8% (10 min) a uma vazão de 1 mL/min. O volume injetado foi de 20 μL e a detecção realizada em 270 nm. Os picos cromatográficos do ácido gálico, ácido elágico e corilagina foram identificados por comparação com o t_R de padrões.

Já em 2011, Markom et al. realizaram um trabalho de obtenção de perfis químicos e quantificação de taninos em extratos de *P. niruri* L. obtidos por Extração com Fluido Supercrítico (EFS). Os perfis químicos ou as impressões digitais de compostos polifenólicos (taninos condensados e hidrolisáveis) em várias frações de

P. niruri L. extraídas utilizando dióxido de carbono supercrítico e vários co-solventes polares, como água, metanol e etanol foram apresentados. A análise química das frações extraídas foi realizada por CLAE, tendo sido utilizado o método de análise descrito por Markom et al. (2007). Amostras de caule e partes aéreas de *P. niruri* L. secas e trituradas foram obtidas a partir de Nova Laboratories Sdn. Bhd (Malásia). Os padrões de referência utilizados foram: ácido gálico e ácido elágico (ambos com 98% de pureza); padrões de flavonoides como quercetina, catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, todos também com 98% de pureza; rutina (97% de pureza) e padrão comercial geranina. A identificação de corilagina foi conduzida pela Nova Laboratories Sdn. Bhd. (Sepang – Malásia) usando seu padrão isolado (pureza de 98%). Picos cromatográficos de ácido gálico, ácido elágico e flavonoides foram identificados por comparação dos t_R com padrões. A quantificação do ácido gálico, do ácido elágico e da corilagina foram feitas a partir de calibrações lineares como citado por Markom et al. em 2007.

O cromatograma do extrato padronizado Hepar-P^{TM} apresentou os taninos hidrolisáveis ácido gálico, corilagina, ácido elágico e o pico A (desconhecido). Na análise por CLAE, o ácido elágico foi também detectado quando o intervalo de UV foi variado entre 210-360 nm. O pico do ácido elágico deu absorção significativa em 270 nm. Esta é a primeira constatação que mostrou a presença deste componente em *P. niruri* usando o método de CLAE, tendo sido o composto anteriormente apenas determinado por um método de RMN para esta planta. Nos frutos framboesa, ácido elágico foi detectado utilizando um gradiente de 8-21% de acetonitrila:água (com 1% de ácido fórmico) em CLAE-EM-DAD (365 nm). Neste estudo, um maior comprimento de onda UV foi necessário porque o ácido utilizado (ácido fórmico) tem uma absorbância de base superior em comparação com a do ácido fosfórico. Vários flavonoides foram detectados nos extratos, sendo eles do

grupo flavonol (quercetina e rutina) e flavon-3-ol ((+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina, e (-)-epigalocatequina). Notou-se também que os tempos de retenção dos picos do ácido elágico (elagitanino) e da rutina (flavonoides) eram muito semelhantes e de difícil diferenciação. O limite de detecção para a análise de CLAE foi determinado como sendo de 0,75 μg/ mL para o ácido gálico e de 2,5 μg/ mL para o ácido elágico.

Prashanth et al. (2012) avaliaram a produção do metabólito secundário filantina em *Phyllanthus niruri* L. por cultura de tecido de folhas. As folhas jovens e o caule foram processados até serem transferidos para um meio solidificado (tubos de cultura) para o estabelecimento de culturas estáticas. Os calos formados foram extraídos com solvente adequado por maceração. O extrato de calo sofreu análises por CCD, onde se confirmou a presença de filantina, passando então para análises em CLAE. As soluções das amostras e padrão (filantina) foram injetadas em equipamento de CLAE (volume de injeção 20 μL) com coluna de fase reservada C18 Phenomenex . A fase móvel foi constituída por metanol: água 66:34. A vazão foi de 1,5 mL/min. O cromatograma foi verificado até 30 min em detecção a 230 nm. (TRIPATHI, A. K. et al., 2006). A curva analítica da filantina foi obtida a partir da área do pico do cromatograma *versus* a concentração de filantina. A quantidade de filantina na amostra teste foi determinada a partir da equação de regressão linear da curva analítica. A quantidade de filantina produzida em diferentes grupos etários de cultura de calos foi estimado. O t_R da filantina foi de cerca de 13,4 min.

Couto et al. (2013b) realizaram uma avaliação química e tecnológica de partes aéreas de *P. niruri* L. em função de suas condições de cultivo e colheita, a partir da coleta de partes aéreas da planta no campo experimental da UNICAMP em Paulínia-SP (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas-

CPQBA). Entre as análises realizadas, estava a análise por CLAE, tendo o grupo escolhido utilizar o método já descrito por De Souza et al. (2002).

Em outro artigo publicado por Couto et al., também em 2013 (a), os pesquisadores avaliaram os efeitos antialodínico e anti-inflamatório do ácido gálico e fizeram uma análise quantitativa do mesmo em pós secos por pulverização de folhas, caules, raízes e da planta toda de *P. niruri* L. Para quantificar o ácido gálico (marcador químico) nas drogas vegetais, foi utilizado novamente o método de CLAE descrito por De Souza et al. (2002). Foram considerados 3 picos preponderantes com t_R de 6,58 (ácido gálico), 19,73 e 21,16 min. Os autores verificaram diferenças quali e quantitativas nas diferentes partes analisadas da espécie.

Nakweti et al. (2013) analisaram quimicamente extratos de *P. niruri* L. coletados em quatro áreas geográficas da República Democrática do Congo. As amostras foram analisadas por CCD e CLAE para caracterização de metabólitos secundários, tais como flavonoides, saponinas, sapogeninas esteroides e outros compostos fenólicos. A análise por CLAE foi realizada em um equipamento Waters 2695 Alliance equipado com uma coluna C18 Alltech Altima (4,6 x 250 mm; 5 μm) e um detector de arranjo de diodos (Waters 29996). Foram injetados 18 μL de cada amostra (extratos puros ou hidrolisados). A vazão foi de 1 mL/min e os picos foram detectados em 275 nm. A separação cromatográfica foi conduzida usando na fase móvel como solvente A acetonitrila, e água contendo 1% de ácido clorídrico como solvente B. O programa de gradiente foi o seguinte: 22-24% de A (7 min), 24-40% de A (10 min), 40-100% de A (8 min), 100% de A (5 min), 100-22% de A (5 min), 22% de A (5 min).

Por comparação dos cromatogramas de extratos hidrolisados de *P. niruri* obtidos por CLAE, foi revelado que o número de picos principais difere dependendo da localização geográfica.

Até o presente momento nenhum trabalho relativo à análise de extratos de *P. niruri* L. por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE ou UPLC) foi publicado, tendo sido esta técnica utilizada (Amin et al., 2013) apenas na análise de frações obtidas a partir do extrato etanol 95% de *P. niruri* L., com o objetivo de identificar substâncias por espectrometria de massas (CLUE-EM) nestas frações.

Tabela 2. Comparação dos métodos de CLAE apresentados para análise de *Phyllanthus niruri* L.

Referência	Parte usada	Fase estacionária	Fase móvel	Detecção	Vazão ml/min	Substâncias Identificadas	LDD
Ogata et al. (1992)	-	C18 YMC-AM 312 (6,0 X 150 mm) *prep*[1]	3-43% ACN em água com 10 mM de NaH_2PO_4	UV 280 nm	1,0	ácido carboxílico da brevifolina[2] ácido respandusínico A[2]	-
Cutrone et al. (1996)	Folhas	C18 (20 x 250 mm; 7 µm) *prep*[1]	ACN: água 40:60	-	-	nirurisídeo[2] filantina[2] rutina[2] canferol 3-*O*-rutinosídeo[2]	-
De Souza et al. (2002)	Partes aéreas	C18 LiChrospher® (4 x 250 mm; 5 µm); pré-coluna C18 Shimadzu® (4 x 10 mm)	A = 1% AcF em água B = ACN: 1% AcF em água 50:50 (v/v) Gradiente: 22-24% B (7min), 24-40% B (10min), 40-100% B (8min), 100-22% B (15 min)	UV 275 nm	0,6	ácido gálico flavona derivado do ácido gálico	-
Murugaiyah e Chan (2006)	Folhas	C18 Inertsil (4,6 x 250 mm)	ACN:água 55:45	FL. 280 nm 344 nm	1,0	filantina, hipofilantina, filtetralina	-
Murugaiyah e Chan (2007a)	Partes aéreas, folhas, frutos, ramos, caule e raízes	C18 Inertsil	ACN: água 55:45	FL. 280 nm 344 nm	1,0	filantina hipofilantina filtetralina nirantina	0,61 6,10 0,61 1,22 ng/mL
Murugaiyah e Chan (2007b)	Folhas	C18 Inertsil (4,6 × 250 mm)	ACN: água 55:45	FL. 280 nm 344 nm	1,0	filantina hipofilantina filtetralina nirantina	0,61 6,10 0,61 1,22 ng/mL
Markom et al. (2007)	Caule, partes aéreas	C18 Genesis® (4,6 x 250 mm; 4 µm)	A = 0,1% AcF em água B = ACN Gradiente: 8–22% B (35min), 22–8% B (10min)	UV 270 nm	1,0	ácido gálico corilagina ácido elágico	-
De Souza et al. (2007)	Extratos secos por pulverização, Grânulos	C18 LiChrospher® (4,0 x 250 mm; 5 µm)	A = 1% AcF em água B = ACN: 1% AcF em água 50:50 (v/v) Gradiente: 22-24% B (7min), 24-40% B (10min), 40-100% B (8min), 100-22% B (15min)	UV 275 nm	0,6	ácido gálico	0,13 µg/mL
De Souza et al. (2009)	Partes aéreas	C18 LiChrospher® (250 x 4 mm; 5 µm)	A = 1% AcF em água B = ACN: 1% AcF em água 50:50 (v/v) Gradiente: 22-24% B (7min), 24-40% B (10min), 40-100% B (8min), 100-22% B (15 min)	UV 275 nm	0,6	ácido gálico	0,13 µg/mL

Colombo et al. (2009)	Folhas, extratos	Phenomenex® Luna fenil-hexil (4,6 x 250 mm; 5 µm)	A = 1% ÁcAcético B = ACN Gradiente: 0-12 min, 13-37% B; 12-13 min, 37-100% B; 13-15 min, 100% B; 15-16 min, 100-13% B; e 16-30 min isocrática a 13% B	DAD 267 nm,	1,0	corilagina[2], rutina[2], 3,4,5-trihidroxibenzoato de etial[2]	0,987 mg/mL
Markom et al. (2010)	-	C18 Genesis® (4,6 x 250 mm; 4 µm)	A = 0,1% AcF em água B = ACN Gradiente: 8–22% B (35 min), 22–8% B (10 min)	UV 270 nm	1,0	ácido gálico corilagina ácido elágico	-
Markom et al. (2011)	Partes aéreas, caule	C18 Genesis® (4,6 x 250 mm; 4 µm)	A = 0,1% AcF em água B = ACN Gradiente: 8–22% B (35 min), 22–8% B (10 min)	UV 270 nm	1,0	ác. gálico ác. elágico quercetina catequina epicatequina galocatequina epigalocatequina corilagina rutina	[1]0,75 µg/mL [2]2,5 µg/mL
Prashanth et al. (2012)	Calos (Caule e folhas)	C18 Phenomenex®	metanol: água 66:34	UV 230 nm	1,5	filantina	-
Couto et al. (2013b)	partes aéreas	C18 LiChrospher (250 x 4 mm; 5 µm); Shimadzu® (10 x 4 mm i.d.)	A = 1% AcF em água B = ACN: 1% AcF em água 50:50 (v/v) Gradiente: 22-24% B (7min), 24-40% B (10min), 40-100% B (8min), 100-22% B (15 min)	UV 275 nm	0,6	ácido gálico	0,13 µg/mL
Couto et al. (2013a)	folhas, caules, raízes, planta toda	C18 LiChrospher (250 x 4 mm; 5 µm); pré-coluna Shimadzu® (10 x 4 mm)	A = 1% AcF em água B = ACN: 1% AcF em água 50:50 (v/v) Gradiente: 22-24% B (7min), 24-40% B (10min), 40-100% B (8min), 100-22% B (15 min)	UV 275 nm	0,6	ácido gálico, flavona, derivado do ácido gálico	0,13 µg/mL
Nakweti et al. (2013)	Partes aéreas e calos	C18 Alltech Altima (4,6 x 250 mm; 5 µm)	A = ACN B = 1% de AcC em água Gradiente: Tabela 2	DAD 275 nm	1,0	quercetina, ácido clorogênico, catequina	-

[1] modo preparativo
[2] substâncias isoladas
AcF = ácido fosfórico
ACN = acetonitrila
AcC = ácido clorídrico

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Comparar o perfil de metabólitos secundários em diferentes órgãos de *P. niruri* L.

2.2. Objetivos específicos

a. Avaliar o perfil químico qualitativo de folhas, flores+frutos, caules e raízes de *P. niruri* L. através de reações químicas de identificação, Cromatografia em Camada Delgada e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com ênfase nos seguintes metabólitos secundários: alcaloides, flavonoides, taninos, terpenos, lignanas e compostos fenólicos do tipo C6-C1 (ácidos gálico e elágico).

b. Avaliar o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais através de espectrofotometria no UV/Vis nas diferentes partes de *P. niruri* L.

c. Avaliar o teor de ácido gálico, ácido elágico e de corilagina por CLUE-UV nas diferentes partes de *P. niruri* L.

d. Avaliar o perfil químico qualitativo e quantitativo de folhas e caules de *P. niruri* L. colhidos em diferentes locais e períodos, através das técnicas descritas nos itens anteriores (a-c).

3. MÉTODOS

3.1. EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES

Balança analítica**:** Marte® modelo AY220 (máx. 220g; min. 0,01g; d = 0,0001g).

Balança semianalítica: Gehaka® modelo BG 200 (máx. 200 g; min. 0,025 g; d = 0,001g).

Cartucho para extração em fase sólida (*clean-up*): Phenomenex® modelo Strata™ C18-E (15 x 10 mm; 55 µm).

Placas para CCD: placas em alumínio cobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich®) (20 x 20 cm) com indicador de fluorescência em 254 nm.

Espectrofotômetro UV-1800: Shimadzu® UV Spectrophotometer UVProbe 2.42)

Lâmpada UV: MineraLight® modelo UVSL-25.

UV/Vis: Beckman DV 530, Life Science.

Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (Waters Modelo Acquity H-Class): equipado com Bomba quaternária (*Quaternary Solvent Manger*) modelo QSM, amostrador automático (*Sample Manager*) modelo FTN, forno para coluna cromatográfica, detector de arranjo de diodos Modelo UPL, detector de espectrometria de massas *single* quadrupolo Modelo SQD, bomba de vácuo Sogevac Modelo SV40 BI, gerador de N_2 Peak Scientific Modelo NM321A, e software do controle e aquisição de dados Empower 3, software de transferência de método analítico Acquity UPLC Columns Calculator.

Estufa de secagem e esterilização: modelo 320 SE - Fanem®.

Solventes:

a) CCD: solventes grau P.A. marcas Qhemis® e Synth®;

b) CLUE (incluindo *clean up*): solventes grau cromatográfico (J. T. Baker®; Merck);

Padrões: Corilagina e Ácido gálico Chromadex; Ácido elágico Sigma Aldrich; Quercetina e Rutina USP.

Água ultrapura: obtida a partir de purificador Milli Q Synergy®;

Ultrassom: Unique®, modelo USC – 2800, frequência 40KHz.

Liofilizador: MicroModulyo, acoplado a bomba de vácuo Edwards.

Cuba cromatográfica de vidro: 21 x 21 x 9 cm (altura x comprimento x largura)

3.2. COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

Indivíduos de *P. niruri* L. foram coletados em 28/02/2012 no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP e em 20/08/2012 nas dependências da empresa do ramo farmoquímico Centroflora em Botucatu-SP. As mudas cultivadas na empresa Centroflora foram obtidas do CPQBA-UNICAMP. Ambas as amostras foram secas em estufa com circulação de ar à 40º C. O período de secagem foi de 3 dias para o material vegetal coletado em fevereiro e 5 dias para o coletado em agosto. Os materiais foram enviados para o Campus da UNESP de Araraquara, sendo que o 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 triturado em liquidificador, até a obtenção de 5,0 g.

3.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O material vegetal de cada parte foi extraído com água, etanol e acetato de etila:hexano 1:1 (v/v), sequencialmente. O preparo dos extratos aquosos foi realizado em banho-maria a 65ºC 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 de cada uma das 3 etapas de extração de cada

parte da planta 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 a mesma metodologia descrita para a produção dos extratos etanólicos.

Para facilitar a identificação dos extratos ao longo do texto deste relatório, foram adotadas as siglas mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Códigos para identificação dos extratos de diferentes partes de *P. niruri* L., produzidos com diferentes solventes em extração sequencial.

ORIGEM DO MATERIAL VEGETAL	PARTE DA PLANTA	EXTRATO		
		aquoso	**etanólico**	**acetato de etila: hexano 1:1**
CENTROFLORA/ agosto	caule	1CAq	1CEt	1CHA
	folha	1FAq	1FEt	1FHA
	raiz	1RAq	1REt	1RHA
CPQBA-UNICAMP/ fevereiro	caule	2CAq	2CEt	2CHA
	flor/fruto	2FFAq	2FFEt	2FFHA
	folha	2FAq	2FEt	2FHA

3.4. ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

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 utilizando uma série de eluentes e reveladores seletivos, incluindo solução metanólica de cloreto férrico 3 % (compostos fenólicos: flavonoides, taninos, etc), anisaldeído sulfúrico (terpenos/ lignanas), NP/PEG (flavonoides) e reagente de

Dragendorff (alcaloides), além de ácido sulfúrico 10 % como revelador universal. Os eluentes selecionados foram os que proporcionaram melhor seletividade nas separações cromatográficas, dentre as diversas condições avaliadas para cada classe de metabólitos secundários/padrão. 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. No caso das amostras extraídas com hexano:acetato de etila, foi aplicado sempre o número dobrado de capilares, visando igualar a quantidade de massa aplicada.

Condições cromatográficas gerais: cromatoplacas de alumínio recobertas por sílica gel 60G (20 x 20 cm x 0,25 mm) (Sigma-Aldrich®); ativação: 110ºC por 30 min. As respectivas fases móveis e reveladores utilizados são apresentados no item Resultados e Discussão.

O preparo das soluções reveladoras segue o descrito abaixo:

a) 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 manter a cromatoplaca 5 –10 min em estufa a 110°C.

b) reagente de Dragendorff: solução A – 0,85 g de nitrato de bismuto básico foi dissolvido em 10,0 mL de ácido acético glacial e 40,0 mL de água, sob aquecimento. Solução B - 8,00 g de iodeto de potássio foram dissolvidos em 30,0 mL de água. As soluções A e B são misturadas na proporção 1:1 (v/v).

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 são misturadas na proporção 1:1 (v/v).

d) cloreto férrico 3%: 3,0 g de cloreto férrico foram pesados e dissolvidas em 100 mL de metanol.

e) ácido sulfúrico 10%: 10,0 mL de ácido sulfúrico foram adicionados a 90 mL de água.

3.5. ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES

Devido às análises em CCD não terem detectado alcaloides e aos relatos da literatura confirmando a presença destes metabólitos na espécie, optamos por outro tipo de teste para confirmar a ausência ou presença de traços dessa classe de metabólitos secundários nos extratos. O teste realizado foi baseado na propriedade dos alcaloides de formarem precipitados quando em contato com o reagente de Dragendorff (complexo alcaloide-metal). Em tubos de ensaio foram pesados 10 mg de cada amostra dos extratos aquosos e etanólicos secos de cada parte da planta. Adicionou-se 2 mL de clorofórmio e 2 mL de ácido clorídrico 2%. Os tubos foram vedados, agitados por 1 min e deixados em repouso até se observar a nítida separação das fases (clorofórmio/água). Para cada amostra, 2 gotas da fase aquosa (contendo possivelmente alcaloides na forma de sais) foram colocadas em uma extremidade de uma lâmina e 2 gotas do reagente de Dragendorff foram colocadas na outra extremidade. As gotas foram misturadas. Foi utilizado como controle positivo do teste quinina.

3.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A determinação do teor de compostos fenólicos totais nos extratos aquosos e etanólicos por espectrofotometria no UV/Vis foi realizada utilizando a metodologia de

Singleton et al. (1999) baseada na metodologia original de Otton Folin e Vintila Ciocalteu (FOLIN; CIOCALTEU, 1927). As análises foram realizadas em triplicata. Foram pesados 5,0 mg de cada extrato e diluídos em 1,0 mL de água:etanol 1:1 (v/v). Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,1 mL da amostra, 6,0 mL de água e 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteau. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 8 min. Então, em cada tubo foram adicionados 1,5 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20% em água e 1,9 mL de água. Após 2 h foram realizadas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro em 760 nm, utilizando cubetas de 1 cm. A concentração final de cada extrato foi 50 μg/mL, com exceção dos extratos 1FAq, 2FFAq e 2FAq, que tiveram sua concentração reduzida para 25 μg/mL. O branco foi preparado seguindo a mesma metodologia das amostras, porém, ao invés de adicionar inicialmente 0,1 mL de amostra, foi adicionado 0,1 mL de água:etanol 1:1 (v/v). A curva analítica foi obtida a partir das leituras de absorbância de soluções de ácido gálico (etanol:água 1:1; v/v) com concentrações finais de 1,25, 2,50, 4,00, 5,00, 7,50, 9,00, 10,00, 10,50 e 20,00 μg/mL, preparadas segundo o procedimento descrito para os extratos, ou seja, adicionando-se 0,1 mL da respectiva solução padrão ao invés da solução do extrato.

3.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

A determinação do teor de flavonoides totais nos extratos aquosos e etanólicos por espectrofotometria no UV/Vis 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 original 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 divergência foi ter completado o volume para 5,0 mL com etanol 95%, ao invés de água destilada, como cita o artigo. As leituras foram realizadas em triplicata. Foram pesados 5,0 mg de cada extrato e diluídos em 1,0 mL de etanol 95%. Deste volume foi tomado 0,5 mL e homogeneizado com 1,5 mL de etanol 95%. Posteriormente, foram adicionados 0,1 mL de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) 10% em água e 0,1 mL de solução aquosa de acetato de sódio 1 M. O volume foi completado com etanol 95% para 5,0 mL. As soluções resultantes foram agitadas e mantidas a temperatura ambiente e protegidos 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 500 µg/mL, com exceção dos extratos 1CEt, 1FEt, 2FFEt e 2FEt, que tiveram a concentração reduzida para 250 µg/mL, pois quando em concentração de 500 µg/mL a absorbância desses extratos ultrapassou a absorbância máxima apresentada na curva analítica construída a partir de concentrações de padrão pré-determinadas (não se sabe até que concentração a linha de tendência permanece linear). O branco foi preparado seguindo a mesma metodologia das amostras, porém, ao invés de adicionar inicialmente 0,5 mL de amostra, foi adicionado 0,5 mL de etanol 95%. A curva analítica foi obtida a partir das leituras de absorbância de soluções de quercetina (etanol 95%) com concentrações finais de 0,3125, 0,625, 1,25, 2,50, 5,00 e 10,00 µg/mL, preparadas segundo o procedimento descrito para os extratos, ou seja, adicionando-se 0,5 mL da respectiva solução padrão ao invés da solução do extrato.

3.8. PREPARO DOS EXTRATOS (*CLEAN UP*) PARA ANÁLISE POR CLUE

Visando remover substâncias que poderiam interagir fortemente com a coluna cromatográfica e danificá-la, os extratos a serem analisados por CLUE foram

submetidos à pré-tratamento por extração em fase sólida. Foi utilizado cartucho de C18 com 500 mg de fase estacionária e volume de 6,0 mL da marca Perkin Elmer®.

O procedimento adotado em relação aos extratos aquosos foi o seguinte:

eluente 1 = metanol:água 1:1, v/v.

eluente 2 = metanol:água 95:05, v/v.

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

2º Condicionamento da fase estacionária: 8,0 mL do eluente 1.

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: 4,0 mL, recolhendo no frasco 1.

5° Eluição com eluente 2: 5,0 mL, recolhendo no frasco 1.

O procedimento adotado em relação aos extratos etanólicos foi o seguinte:

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.

3.9. ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE)

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

Com o intuito de tornar as análises cromatográficas da droga vegetal e dos extratos mais rápida, com menor consumo de solventes e, consequentemente, menor custo por análise e menor impacto ambiental, o método analítico foi transferido para cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a arranjo de diodos (CLUE-DAD). Este trabalho de transferência e desenvolvimento de método foi realizado pela aluna de mestrado Ingrid Albrecht, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, também sob orientação de André Gonzaga dos Santos. O trabalho de mestrado, ainda em andamento, intitula-se “Identificação de metabólitos secundários em extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* L. com ação no processo de formação de cristais de oxalato de cálcio”.

As análises por CLUE foram realizadas no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da empresa Centroflora onde Ingrid Albrecht desenvolve parte de seu projeto de mestrado.

Na Tabela 4 segue a descrição das condições cromatográficas transferidas de CLAE-DAD para CLUE-DAD.

Tabela 4. Método analítico transferido de CLAE-DAD para CLUE-DAD

Coluna	Acquity® HSS T3 C18 100 x 2,1 mm, 1,8 µm
Temperatura coluna	30 °C
Temperatura amostrador	25 °C
Fluxo	0,150 mL/min
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

Os extratos aquosos (1CAq, 2CAq, 2FFAq, 1FAq, 2FAq, 1RAq) e etanólicos (1CEt, 2CEt, 2FFEt, 1FEt e 2FEt), após o pré-tratamento, foram solubilizados, respectivamente, em 5,0 e 4,0 mL de água: metanol 1:1 (v/v) durante 30 min em ultrassom e filtrados através de filtro com membrana PVDF 0,22 µm. O extrato 1REt não foi empregado, pois seu rendimento foi muito baixo.

A obtenção de curvas analíticas dos padrões ácido elágico (Figura 3, a), ácido gálico (Figura 3, b) e corilagina (Figura 3, c) possibilitou a identificação (comparação do t_R) e quantificação (área do pico) dessas substâncias nas amostras analisadas por CLUE, sendo as leituras efetuadas em 267 nm. Foram aplicadas 5 concentrações de cada padrão, sendo que cada concentração foi aplicada em triplicata. Os padrões corilagina e ácido gálico foram solubilizados em metanol:água 40:60 v/v; e o ácido elágico foi solubilizado em hidróxido de sódio 0,1 M. Cerca de 3 mL de cada solução foi filtrada através de filtro com membrana PVDF 0,22 µm, descartando-se os 2 primeiros mL. As concentrações de ácido gálico injetadas variaram de 4,115 a 82,291mg/L, as de ácido elágico variaram de 7,560 a 68,141 mg/L e as de corilagina variaram de 13,696 a 136,965 mg/L.

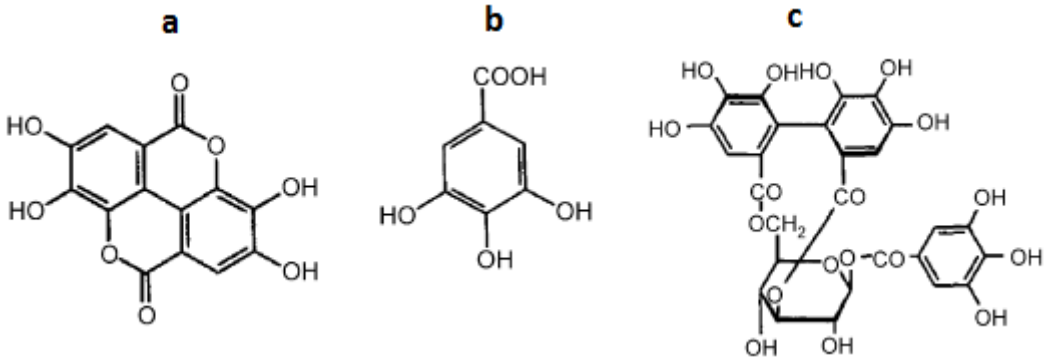

Figura 3. Estruturas químicas do ácido elágico (a), ácido gálico (b) e corilagina (c); (Markom et al., 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES

Os rendimentos das extrações (massa de extrato seco/massa de material vegetal, %) são expressos na Tabela 5. O objetivo de produzir diferentes amostras por extrações sequenciais do material vegetal é obter de forma mais completa o perfil químico de cada parte da planta, considerando que apenas um solvente não é capaz de extrair todas as classes de metabólitos secundários da planta, pois esta é uma fonte de grande diversidade química.

Tabela 5. Rendimento das extrações sequenciais com água, etanol e acetato de etila:hexano 1:1 de diferentes partes de *P. niruri* L.

EXTRATOS	RENDIMENTO (%)
1CAq	6,2
1CEt	3,9
1CHA	0,3
TOTAL*	**10,4**
1FAq	15,8
1FEt	4,7
1FHA	0,7
TOTAL*	**21,2**
1RAq	4,7
1REt	2,5
1RHA	0,2
TOTAL*	**7,4**
2CAq	15,5
2CEt	1,1
2CHA	0,2
TOTAL*	**16,8**
2FFAq	30,3
2FFEt	2,0
2FFHA	0,6
TOTAL*	**32,9**
2FAq	36,2
2FEt	3,8
2FHA	0,6
TOTAL*	**40,6**

*total referente às 3 extrações sucessivas

A partir da análise dos dados da Tabela 5, 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 cerca de duas vezes maior do que os rendimentos da extração aquosa e total de caules e folhas coletados em agosto (códigos iniciados por **1**). Porém, ao comparar 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* L. em água quente (65ºC), 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.

De forma geral, observou-se um baixo rendimento nas extrações das raízes comparando-se aos outros órgãos.

4.2. FITOQUÍMICA

A análise dos extratos por CCD demonstrou que os mesmos possuem perfis químicos distintos em diferentes graus. O número de manchas observadas para cada extrato está computado nas Tabelas 7 a 17, sendo que há fotos nas quais a presença de algumas manchas não está clara, quer seja pela dificuldade de fotografar a placa dentro da câmara de luz UV, quer seja pela resolução da foto. Porém, mesmo assim elas foram contabilizadas, pois ao observar as cromatoplacas elas estavam nítidas. Manchas na região da distância total de eluição (R_f ~1) não foram contabilizadas. Em nenhuma análise foram empregados os extratos 2CHA, 2FFHA, 2FHA, pois o rendimento destes foi pequeno.

4.2.1. ALCALOIDES

Para análise de alcaloides foi utilizada apenas uma condição cromatográfica, tendo por fase móvel acetato de etila:isopropanol: amônia 8:1,5:0,5 (v/v) (TONA et al., 2004). As amostras aplicadas foram: 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA. As condições de visualização/revelação foram: observação sob luz visível (Figura 4), luz UV 365 nm (Figura 5), luz UV 254 nm (Figura 4) e utilização do revelador reagente de Dragendorff (Figura 5).

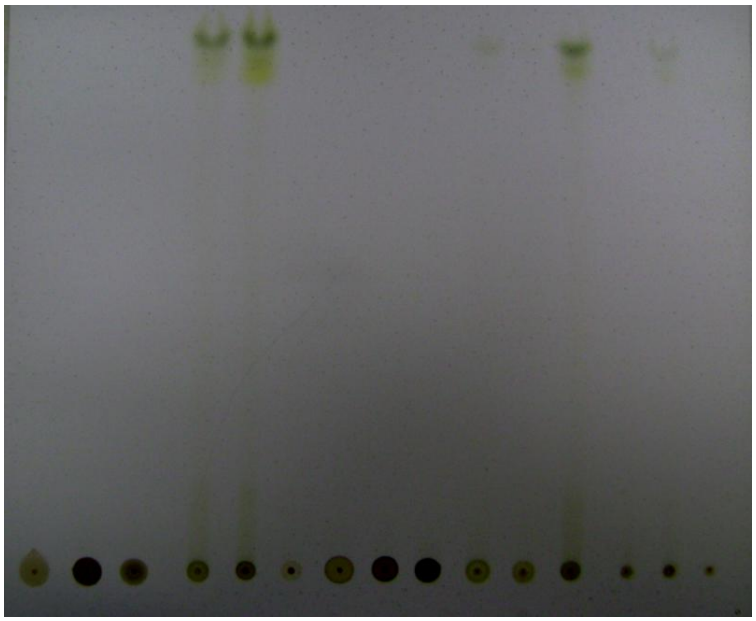

Figura 4. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: acetato de etila:isopropanol: amônia 8:1,5:0,5 (v/v/v). Luz visível.

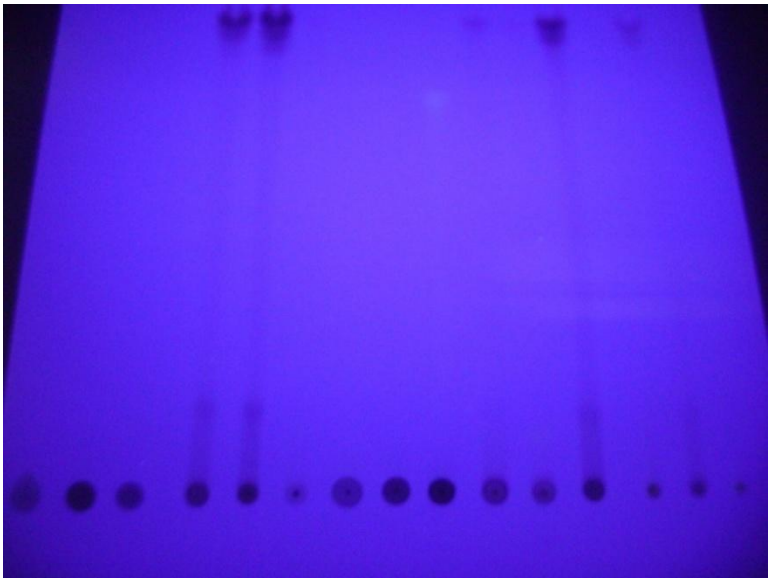

Figura 5. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: acetato de etila:isopropanol: amônia 8:1,5:0,5 (v/v/v). Luz UV 365 nm.

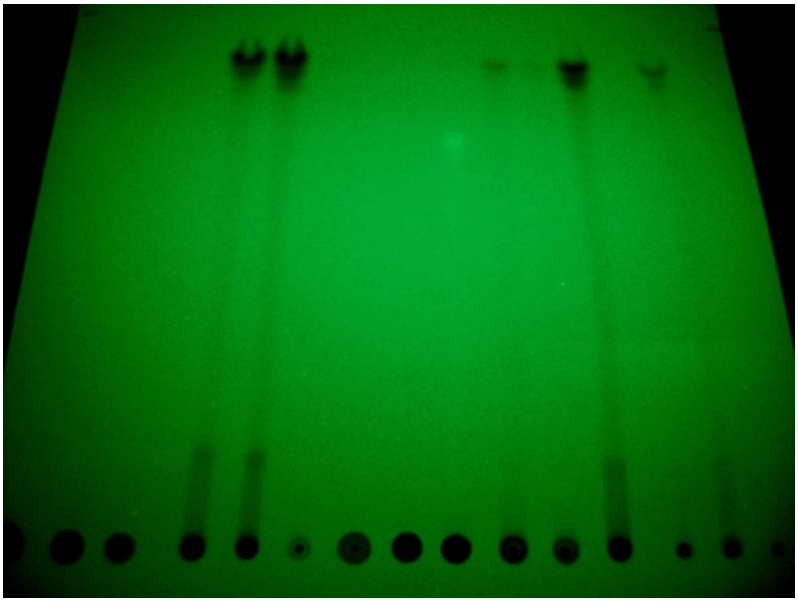

Figura 6. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA, aplicados nesta ordem da esquerda para a direita. FM: acetato de etila:isopropanol: amônia 8:1,5:0,5 (v/v/v). Luz UV 254 nm.

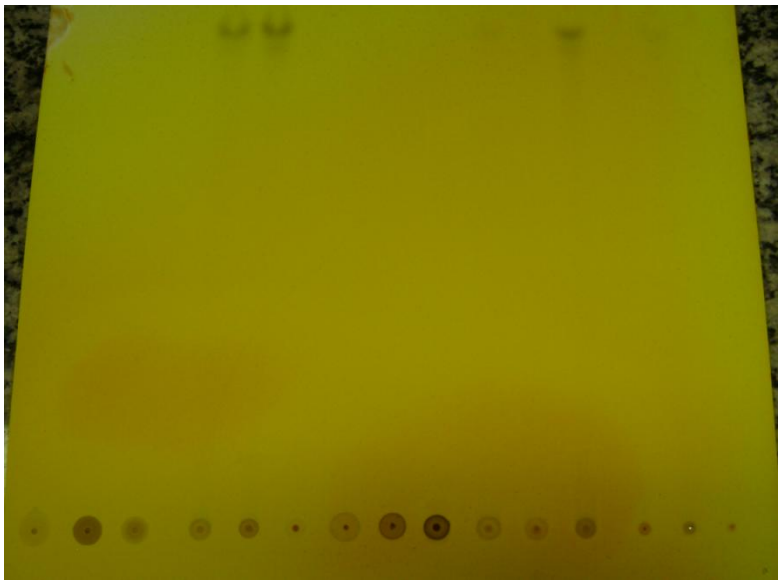

Figura 7. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA, aplicados nesta ordem da esquerda para a direita. FM: acetato de etila:isopropanol: amônia 8:1,5:0,5 (v/v/v). Revelação: reagente de Dragendorff.

A partir da observação das placas e de suas das imagens tem-se os dados da Tabela 6.

Tabela 6. Resultados das análises por CCD para identificação de alcaloides e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figura 4 a 7).

	NÚMERO DE MANCHAS														
extrato	1CAq	1FAq	1RAq	1CEt	1FEt	1REt	2Caq	2FFAq	2FAq	2CEt	2FFEt	2FEt	1CHA	1FHA	1RHA
luz visível	-	-	-	3	3	-	-	-	-	2	-	2	-	2	-
UV 254nm	-	-	-	3	3	-	-	-	1	2	-	2	-	2	-
UV 365nm	-	-	-	3	3	-	-	-	1	2	-	2	-	2	-
Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Analisando os resultados da Tabela 6 podemos constatar que os extratos aquosos, independentemente da condição de observação, não apresentaram nenhuma mancha, com exceção de 2FAq que apresentou uma mancha fluorescente ao ser observado sob luz UV. 1FAq e 2FAq são extratos aquosos de folhas, diferindo apenas quanto à origem do material vegetal: coletas em distintos períodos e a partir de diferentes indivíduos.

Por meio da observação sob luz visível e UV, pode-se perceber que 1CEt e 1FEt apresentaram cada um 3 manchas, com mesmo R_f, e 1REt não apresentou manchas. Já 2CEt e 2FEt apresentaram cada um 2 manchas, com o mesmo R_f, sendo que 2FFEt não apresentou manchas.

As diferenças no número de manchas de extratos da mesma parte da planta de diferentes procedências do material vegetal sugerem variabilidade no metabolismo secundário da espécie.

Dos extratos acetato de etila: hexano, apenas o extrato 1FHA apresentou manchas por meio da visualização e observação sob luz UV: 2 manchas correspondentes a 2 das 3 manchas apresentadas por 1FEt e 1CEt. A semelhança no perfil entre os extratos orgânicos era esperada em algumas condições cromatográficas, já que compostos de baixa a média polaridade não extraídos pela água podem ser extraídos pelos solventes orgânicos utilizados.

De forma geral, o perfil químico mais simples e que mais difere dos demais é o das raízes.

Após a pulverização do reagente de Dragendorff sobre a placa, nenhuma mancha foi visualizada, inclusive na origem. Assim, podemos concluir que os extratos não contêm alcaloides ou possuem estes metabólitos em baixa concentração. Como a literatura científica descreve a presença de alcaloides na espécie (ver Tabela 1), realizamos um teste adicional (ensaio de complexação e precipitação com metais) para confirmar a ausência dessa classe de metabólitos secundários nos extratos (Ítem 3.5.).

4.2.2. FLAVONOIDES

Para os flavonoides foram definidas 4 condições de análise. Na primeira utilizou-se como fase móvel acetato de etila:acetona: ácido acético:água 6:2:1:1 (v/v)

(LIONÇO et al., 2001). As amostras aplicadas foram: 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA. As imagens apresentadas são referentes à observação sob luz UV 365 nm (Figura 8) e utilização do revelador ácido sulfúrico 10 % (Figura 9). A segunda condição teve a mesma fase móvel e amostras aplicadas que a primeira, porém foi aplicado também o padrão quercetina (3,0 mg/mL). As imagens apresentadas são referentes à observação sob luz UV 254 nm (Figura 10), após revelação com solução metanólica de cloreto férrico 3% (Figura 11) e revelação com NP/PEG seguida de observação sob luz UV 365 nm (Figura 12). A terceira condição teve como fase móvel tolueno: acetato de etila:metanol:ácido acético 5,3:4,0:0,5:0,2 (v/v), sendo esta uma adaptação da fase móvel utilizada por Andersen e Markham (2006), utilizando também quercetina (10,0 mg/mL) como padrão. As amostras aplicadas foram: 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt. As imagens apresentadas são referentes à observação sob luz visível (Figura 13), luz UV 365 nm (Figura 14) e 254 nm (Figura 15) e observação sob luz UV 365 nm (Figura 16) após revelação com NP/PEG. A quarta condição teve como fase móvel acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água 100:11:11:27 (v/v) (WAGNER; BLADT, 1996). As amostras aplicadas foram as mesmas da terceira condição acrescido da rutina (3,0 mg/mL). A imagem apresentada é referente à observação após revelação com solução metanólica de cloreto de férrico 3% (Figura 17).

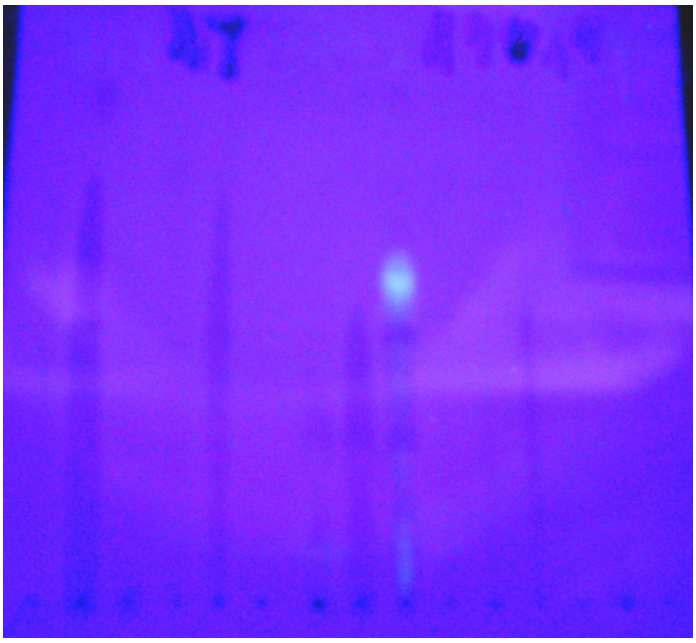

Figura 8. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: acetato de etila:acetona:ácido acético: água 6:2:1:1 (v/v). Luz UV 365nm.

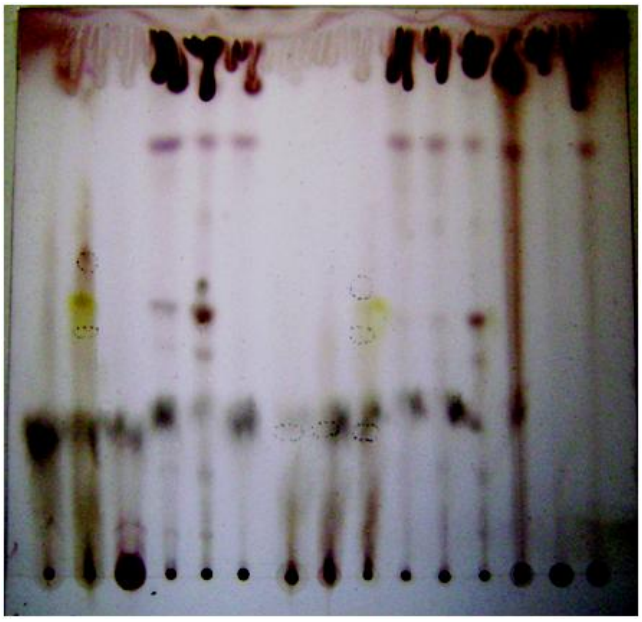

Figura 9: Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA, aplicados nesta ordem da esquerda para a direita. FM: acetato de etila:acetona:ácido acético: água 6:2:1:1 (v/v). Revelação: ácido sulfúrico 10 %.

A partir da observação das placas e das imagens tem-se os dados da Tabela 7.

Tabela 7. Resultados das análises por CCD para identificação de flavonoides e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 8 e 9).

	NÚMERO DE MANCHAS														
extrato	1CAq	1FAq	1RAq	1CEt	1FEt	1REt	2Caq	2FFAq	2FAq	2CEt	2FFEt	2FEt	1CHA	1FHA	1RHA
Luz visível	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UV 365nm	4	6	-	-	5	-	4	4	6	-	-	5	-	-	-
H_2SO_4 10%	4	4	1	8	9	2	1	2	3	8	8	8	2	1	1

A observação sob luz visível mostrou 1 mancha na cromatoplaca para alguns extratos apenas na região da distância total de eluição (R_f~1); por apresentar coloração verde e estar presente somente nos extratos orgânicos de partes aéreas, supomos tratar-se de clorofila ou de clorofila juntamente com outra(s) substância(s). Por meio da observação sob luz UV 365 nm, pode-se perceber que 1FAq (6 manchas) e 1CAq (4 manchas) apresentam 4 manchas com mesmo valor de Rf, o mesmo ocorrendo para o grupo 2FAq (6 manchas), 2CAq e 2FFAq (4 manchas). O extrato 1RAq não apresentou manchas. Os extratos aquosos de folhas possuem 5 manchas em comum, sendo que apenas 2FAq apresentou uma mancha fluorescente. Os extratos etanólicos de folhas apresentaram perfil correspondente ao de 1FAq, porém com ausência da última mancha.

Após a placa ser revelada com ácido sulfúrico (Figura 7), pode-se observar a diferença no perfil químico das diferentes partes dos extratos aquosos, sendo que os perfis de caule e folhas (1CAq e 1FAq) ou de folhas e flores/frutos (2FAq e 2FFAq) são mais parecidos entre si comparando-se às raízes; nota-se uma mancha majoritária com mesmo Rf nos extratos aquosos. Ao comparar os extratos aquosos de folhas, produzidos com material vegetal de diferente origem, 1FAq apresenta uma mancha que não é apresentada por 2FAq. Em relação aos extratos etanólicos, os perfis são semelhantes para todos os extratos, com exceção das raízes.

É interessante atentar para as diferenças de tamanho e intensidade das manchas apresentadas pelos diferentes órgãos, sendo que ora uma substância mostra-se mais abundante no extrato de caule, ora outra substância mostra-se mais abundante no extrato de folhas ou raízes.

Estes dados apontam novamente para diferenças químicas mais relevantes entre partes aéreas e raízes, bem como para a constatação de variabilidade química na espécie.

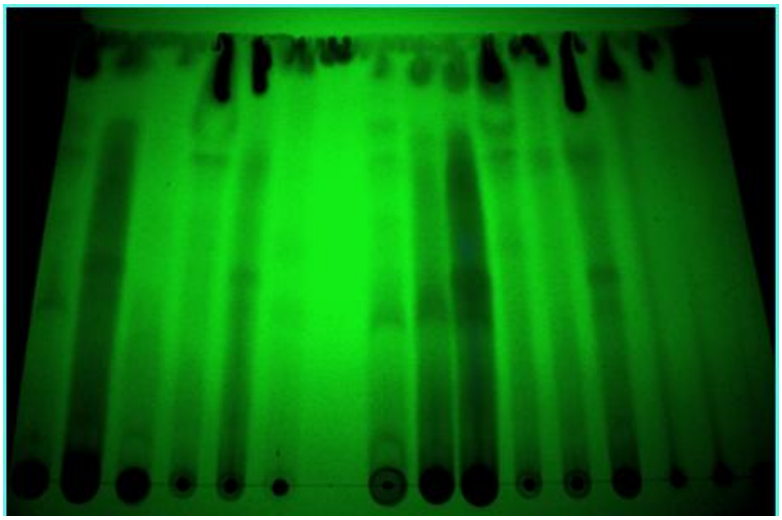

Figura 10. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: acetato de etila:acetona:ácido acético: água 6:2:1:1 (v/v). Luz UV 254 nm.

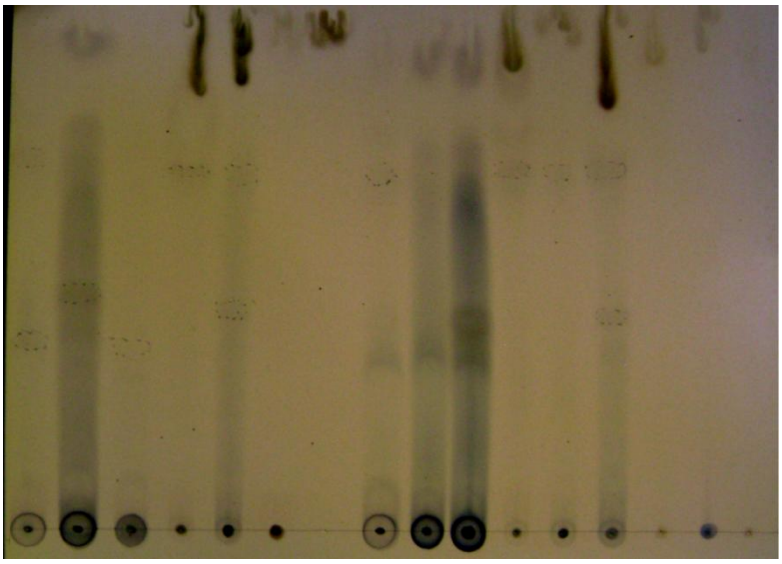

Figura 11. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: acetato de etila:acetona:ácido acético: água 6:2:1:1 (v/v). Revelação com cloreto férrico 3%.

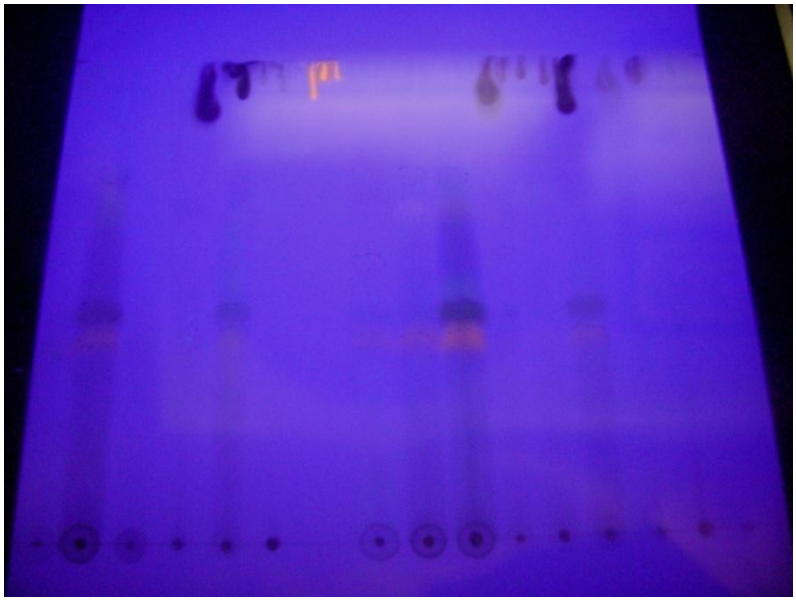

Figura 12. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: acetato de etila:acetona:ácido acético: água 6:2:1:1 (v/v). Luz UV 365nm após revelação com NP/PEG.

A partir da observação das placas no momento em que foram feitas e das imagens, tem-se os dados da Tabela 8 (Figuras 10 a 12).

Tabela 8. Resultados das análises por CCD para identificação de flavonoides e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 10 a 12).

	NÚMERO DE MANCHAS															
extrato	1Caq	1FAq	1RAq	1CEt	1FEt	1REt	querc	2CAq	2FFAq	2FAq	2CEt	2FFEt	2FEt	1CHA	1FHA	1RHA
UV 254nm	6	6	6	6	6	3	1	6	6	6	6	6	6	-	-	-
$FeCl_3$ 3%	5	5	2	5	5	-	1	5	5	5	5	5	5	-	-	-
NP/PEG 365nm	4	4	2	4	4	-	1	4	4	4	4	4	4	-	-	-

Cada extrato aquoso e etanólico observado sob luz UV 254 nm (Figura 8) evidenciou a presença de 6 manchas (com os mesmos valores de R_f), com exceção de 1REt que não apresentou nenhuma mancha. Os extratos acetato de etila: hexano não apresentaram nenhuma mancha. A condição de fase móvel não demonstrou ser satifatória para quercetina, pois a mesma apresentou valor de R_f~1. Quando a cromatoplaca foi revelada com cloreto férrico (Figura 9), as amostras que haviam apresentado 6 manchas por observação em UV 254 nm apresentaram 5 manchas (com exceção do extrato 1RAq), das quais, 4 correspondiam as manchas observadas sob luz UV 254 nm. Isto novamente mostra a menor variedade ou/e presença de metabólitos secundários em raízes. Os extratos hexano: acetato de etila não apresentaram nenhuma mancha.

Após revelação com NP/PEG e visualização sob luz UV 365 nm (Figura 10), 1RAq apresentou as mesmas 2 manchas evidenciadas pelo cloreto férrico. As outras amostras, de modo geral, apresentaram perfil cromatográfico semelhante ao descrito no parágrafo anterior.

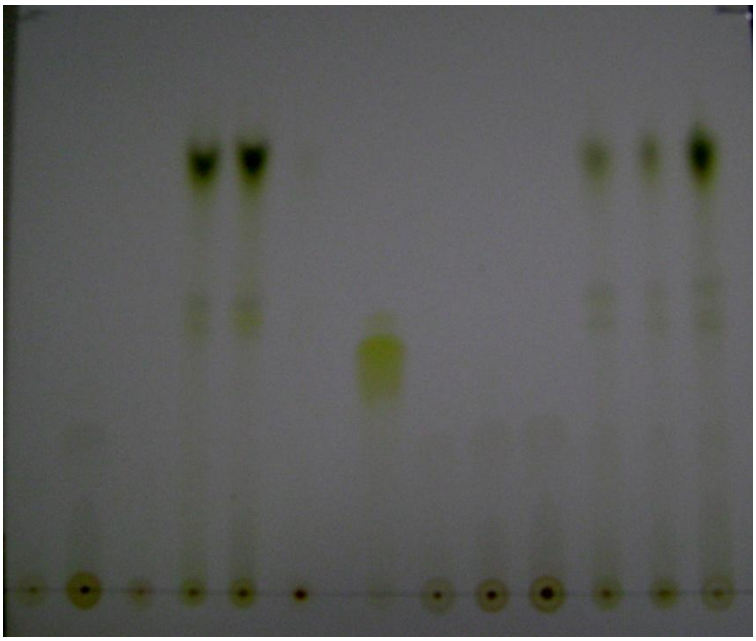

Figura 13. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetato de etila:metanol:ácido acético 5,3:4,0:0,5:0,2. Luz visível.

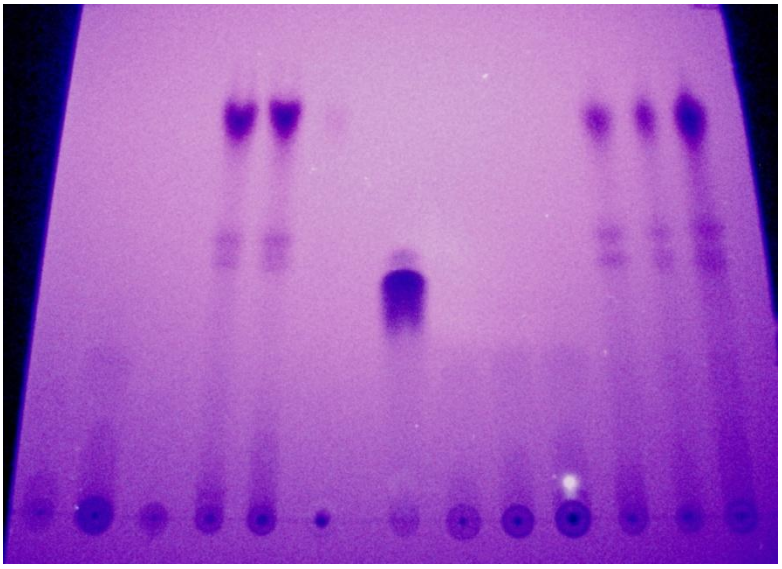

Figura 14. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetato de etila:metanol:ácido acético 5,3:4,0:0,5:0,2. Luz UV 365 nm.

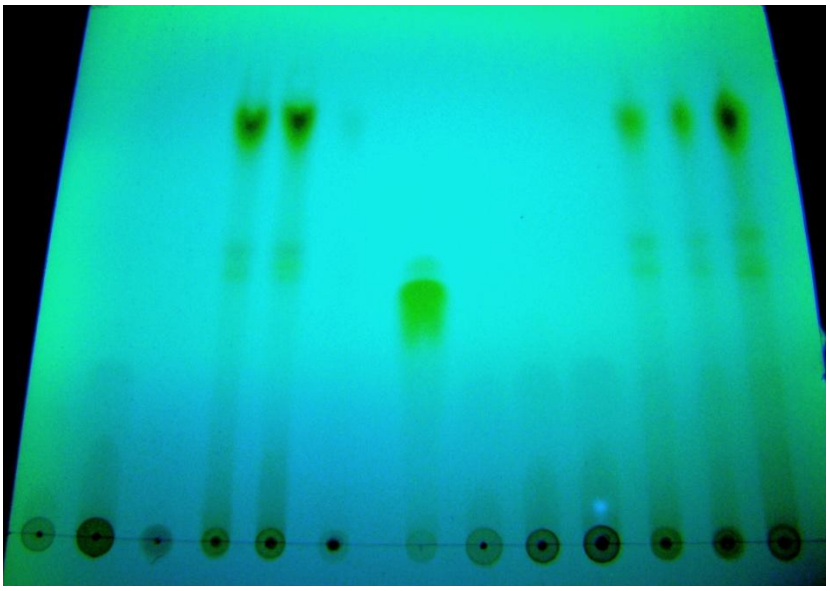

Figura 15. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetato de etila:metanol:ácido acético 5,3:4,0:0,5:0,2. Luz UV 254nm.

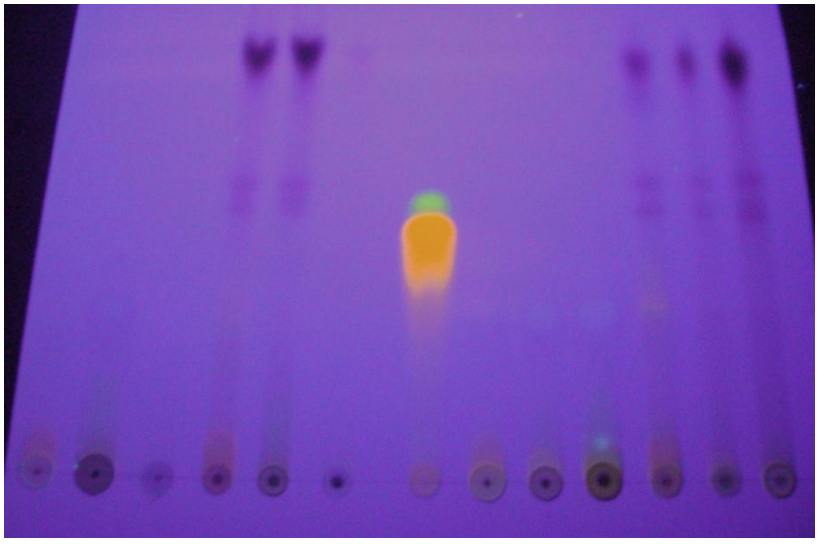

Figura 16. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetato de etila:metanol:ácido acético 5,3:4,0:0,5:0,2. Luz UV 365 nm após revelação com NP/PEG.

A partir da observação das placas no momento em que foram feitas e das imagens, tem-se os dados da Tabela 9 (Figuras 13 a 16).

Tabela 9. Resultados das análises por CCD para identificação de flavonoides e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 13 a 16).

	NÚMERO DE MANCHAS												
extrato	1CAq	1FAq	1RAq	1CEt	1FEt	1REt	querc.	2Caq	2FFAq	2FAq	2CEt	2FFEt	2FEt
luz visível	-	2	-	5	5	-	2	2	2	2	4	4	4
UV 365nm	-	2	-	5	5	-	2	2	2	3	4	4	4
UV 254nm	-	2	-	5	5	-	2	2	2	3	4	4	4
NP/PEG 365nm	-	2	-	5	5	-	2	2	2	3	4	4	4

O número e perfil das manchas observadas foi praticamente o mesmo com os diferentes tipos de visualização/revelação. Os extratos aquosos apresentaram 2 manchas com mesmo R_f, com exceção 2FAq com uma mancha fluorescente adicional (UV 254 e 365 nm; NP/PEG) e 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. Este flavonoide não foi identificado em nenhum dos extratos, apesar do relato na espécie pela literatura (CALIXTO et al., 2006).

Com relação às condições utilizadas, a FM tolueno: acetato de etila: metanol: ácido acético 6:2:1:1 (Figuras 11 a 14) mostrou-se adequada para identificação de quercetina que apresentou valor de R_f de cerca de 0,5, o que não ocorreu com a outra FM utilizada, que é mais polar. As cromatoplacas em que utilizou-se a outra FM (acetato de etila: acetona: ácido acético: água 5,3:4,0:0,5:0,2) apresentaram

maior número de manchas e, de modo geral, mais manchas com a revelação com NP/PEG e $FeCl_3$ sugerindo a presença de flavonoides ou fenólicos.

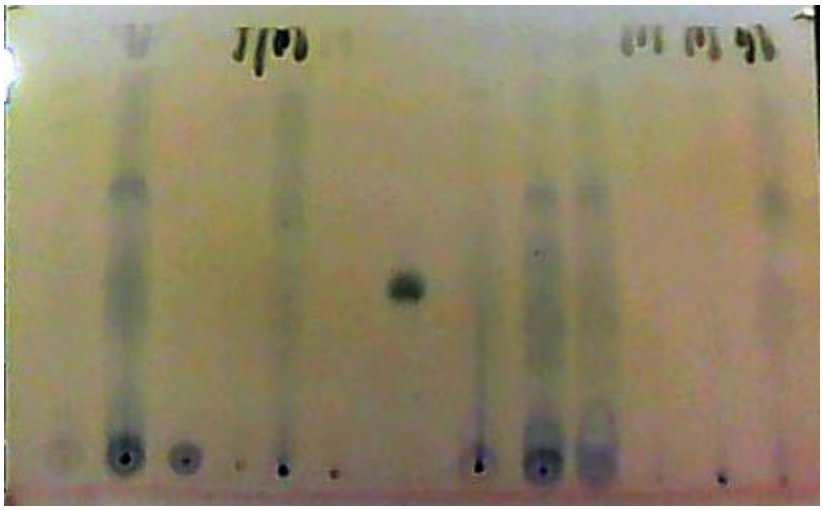

Figura 17. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, rutina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água 100:11:11:27 (v/v). Revelação com cloreto férrico 3%.

A partir da observação das placas no momento em que foram feitas e das imagens, tem-se os dados da Tabela 10 (Figura 17).

Tabela 10. Resultados das análises por CCD para identificação de flavonoides e rutina e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figura 17).

NUMERO DE MANCHAS E R_f													
Extrato	1CAq	1FAq	1RAq	1CEt	1FEt	1REt	rutina	2CAq	2FFAq	2FAq	2CEt	2FFEt	2FEt
[1]n. manchas	-	4	-	-	4	-	1	1	5	4	-	-	4
[2]R_f	-	0,40	-	0,39	0,40	-	0,40	0,40	0,40	0,39	-	-	0,40

[1]número total de manchas observadas após revelação com cloreto férrico; [2] valores de R_f para manchas observadas nos extratos com valor semelhante ao apresentado pela rutina.

Os resultados obtidos mostram que 1FAq, 1FEt, 2FAq e 2FEt apresentaram o mesmo número de manchas (4), com perfil cromatográfico praticamente idêntico (valores de R_f e coloração das manchas), tendo 2FFAq também apresentado 4

manchas com esse mesmo perfil além de uma quinta mancha apresentada com menor valor de R_f do que as outras 4. Os extratos de raízes não apresentaram manchas. Observa-se que 1CAq não apresentou manchas, ao contrário de 2CAq que apresentou 1 mancha, sendo esta ao que tudo indica correspondente a mancha apresentada pelo padrão rutina (coloração verde), que pode ser visualizada em todas as amostra que apresentaram ao menos 1 mancha.

4.2.3 LIGNANAS

Para análise de lignanas foi utilizada a fase móvel tolueno:acetona 50:1 (v/v) (ELFAHMI, 2005). As amostras aplicadas foram: 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA. As imagens apresentadas são referentes à visualização sob luz visível (Figura 18), luz UV 365 nm (Figura 19) e 254 nm (Figura 20) e utilização do revelador químico anisaldeído sulfúrico (Figura 21).

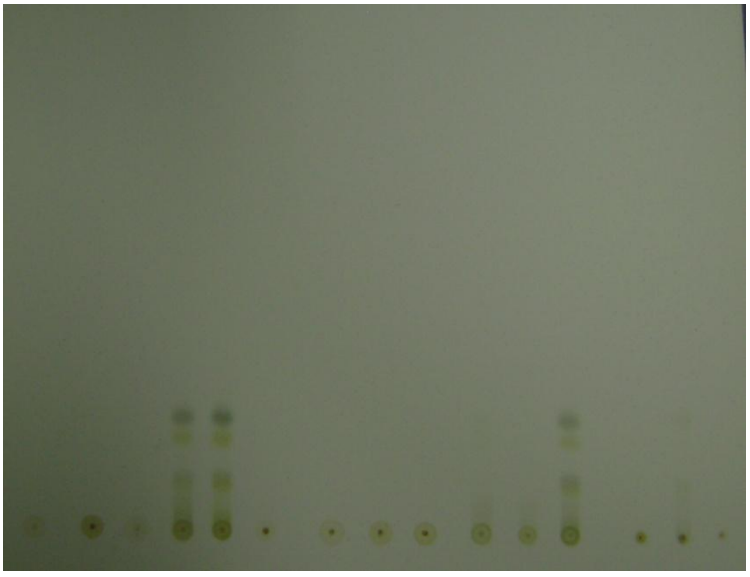

Figura 18. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetona 50:1. Luz visível.

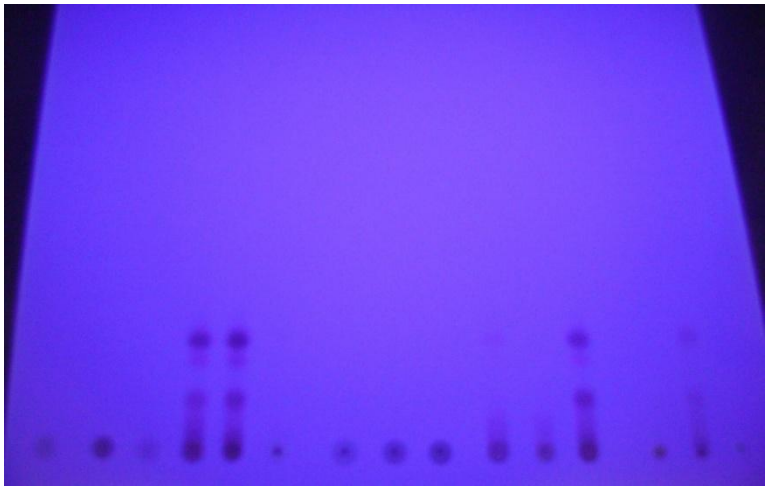

Figura 19. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetona 50:1. Luz UV 365 nm.

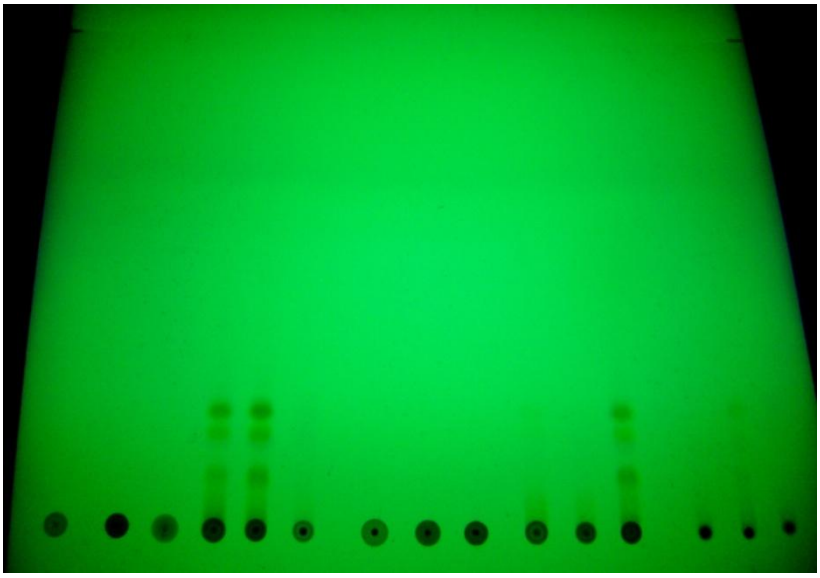

Figura 20. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetona 50:1. Luz UV 254 nm.

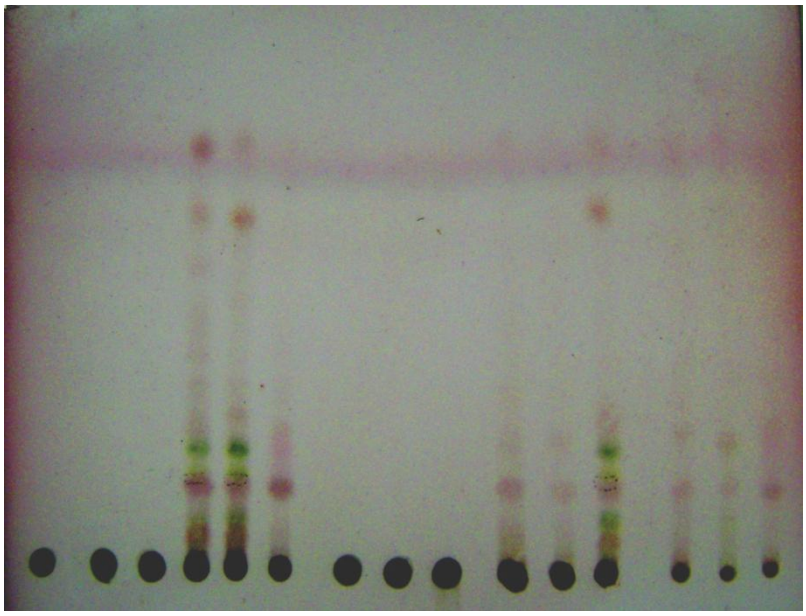

Figura 21. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA, aplicados nesta ordem da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetona 50:1. Revelação com anisaldeído sulfúrico.

A partir da observação das placas no momento em que foram finalizadas as análises e das imagens, tem-se os dados da Tabela 11 (Figuras 18 a 21).

Tabela 11. Resultados das análises por CCD para identificação de lignanas e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 18 a 21).

	NÚMERO DE MANCHAS														
Extrato	1CAq	1FAq	1RAq	1CEt	1FEt	1REt	2CAq	2FFAq	2FAq	2CEt	2FFEt	2FEt	1CHA	1FHA	1RHA
luz visível	-	-	-	3	3	-	-	-	-	3	-	3	-	3	-
UV 254nm	-	-	-	3	3	-	-	-	-	3	-	3	-	3	-
UV 365nm	-	-	-	3	3	-	-	-	-	3	-	3	-	3	-
anisaldeído sulfúrico	-	-	-	12	12	4	-	-	-	7	4	12	4	5	4

Os resultados obtidos com os diferentes métodos de visualização/revelação mostram que os extratos aquosos não apresentaram manchas - força de eluição da FM muito baixa. Com a visualização sob luz visível ou UV, 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.

Após revelação com anisaldeído sulfúrico, 1CEt, 1FEt e 2FEt apresentaram o mesmo número de manchas (12), com perfil cromatográfico praticamente idêntico (valores de Rf 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 hexano:acetato de etila apresentaram as mesmas 4-5 manchas.

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

4.2.4. TANINOS

As 3 condições de análises utilizadas para taninos foram baseadas em SIMÕES et al. (1999). Na primeira, a fase móvel utilizada foi tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 1:5:3. As amostras aplicadas foram: 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt. As imagens apresentadas são referentes à visualização sob luz UV 365 nm (Figura 22), 254 nm (Figura 23) e revelação com cloreto férrico (Figura 24). A segunda condição teve como fase móvel tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 2,43:5,57:2,0. As amostras aplicadas foram: 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, ácido gálico (3,0 mg/mL), 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt. As imagens apresentadas são referentes à visualização

sob luz visível (Figura 25), sob luz UV 365 nm (Figura 26) e 254 nm (Figura 27) e revelação com cloreto férrico (Figura 28). A terceira condição teve a mesma fase móvel que a segunda e foram aplicados os mesmo extratos, sendo a diferença entre elas, que na segunda condição foi utlizado o padrão ácido gálico, e nesta o padrão corilagina. Devido à impossibilidade de registro da imagem no momento em que a cromatoplaca foi feita e a má qualidade adquirida pela mesma após algum tempo, esta não é apresentada. A cromatoplaca foi utilizada na identificação da corilagina nos extratos por meio do cálculo do R_f.

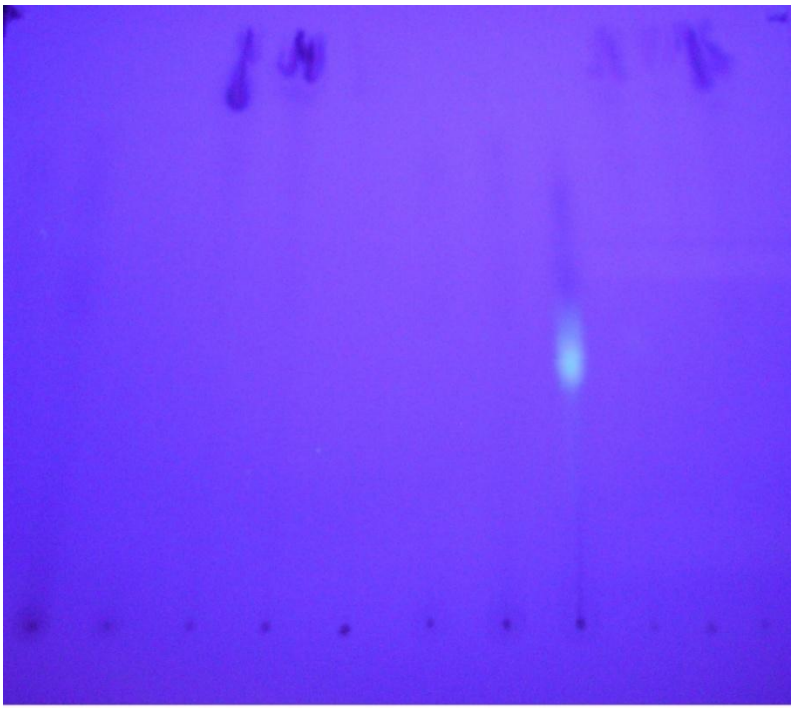

Figura 22. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 1:5:3. Luz UV 365 nm.

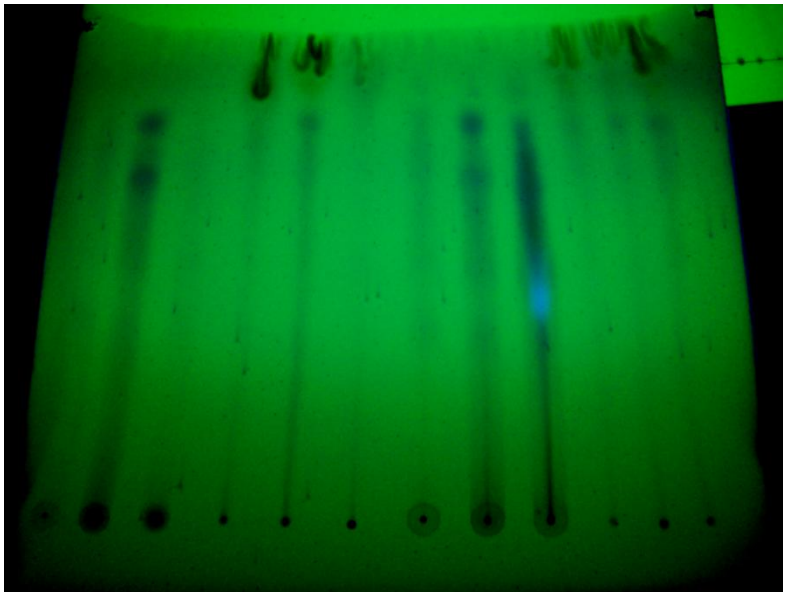

Figura 23. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 1:5:3. Luz UV 254 nm.

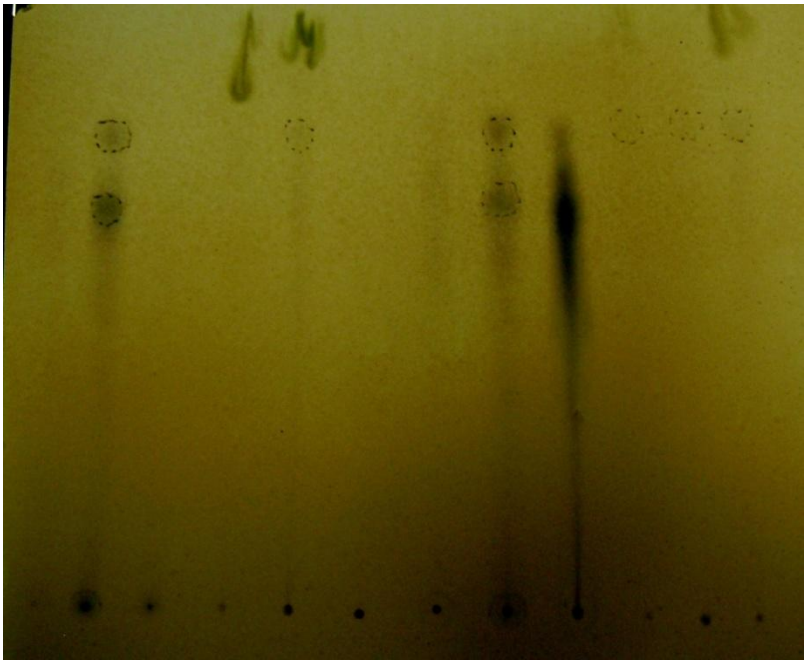

Figura 24. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, quercetina, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 1:5:3. Revelação com cloreto férrico 3 %.

A partir da observação das placas no momento em que foram finalizadas as análises e das imagens, tem-se os dados da Tabela 12 (Figuras 22 a 24).

Tabela 12. Resultados das análises por CCD para identificação de taninos e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 22 a 24).

NÚMERO DE MANCHAS												
extrato	1CAq	1FAq	1RAq	1CEt	1FEt	1REt	2CAq	2FFAq	2FAq	2CEt	2FFEt	2FEt
luz visível	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UV 254 nm	5	5	5	5	5	5	5	5	6	5	5	5
UV 365 nm	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
$FeCl_3$	5	5	-	-	-	-	5	5	5	-	-	-

Por meio da visualização da cromatoplaca sob luz visível não foram observadas manchas em nenhum extrato. Por meio da observação sob luz UV 254 nm em todos os extratos foram observados 5 manchas correspondentes, com exceção de 2FAq que possui uma mancha fluorescente a mais, sendo esta a única mancha visualizada sob luz UV 365 nm (Figura 20) para todos os extratos. Após a revelação da cromatoplaca com cloreto férrico (Figura 22), 1CAq, 1FAq, 2CAq, 2FFAq e 2FAq apresentaram as mesmas manchas visualizadas sob luz UV 254 nm. Tais manchas apresentaram coloração azul, o que sugere a presença de taninos hidrolisáveis ou substâncias relacionadas (ácido gálico, ácido elágico). Os demais extratos não apresentaram manchas. De modo geral, nesta condição de análise, não foram encontradas diferenças significativas no perfil químico das diferentes partes ou entre as diferentes coletas, com exceção de 1RAq que não apresntou manchas quando revelado com $FeCl_3$, demonstrando ausência de compostos fenólicos nesta condição.

Figura 25. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, ácido gálico, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 2,43:5,57:2,0. Luz visível.

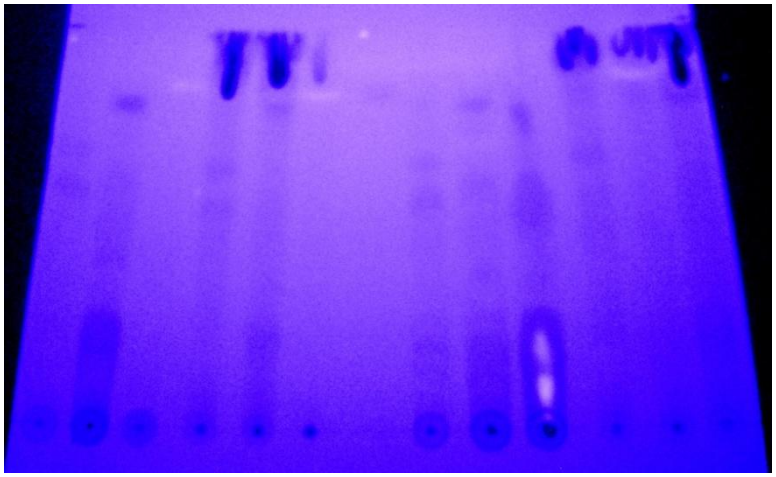

Figura 26. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, ácido gálico, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 2,43:5,57:2,0. Luz UV 365 nm.

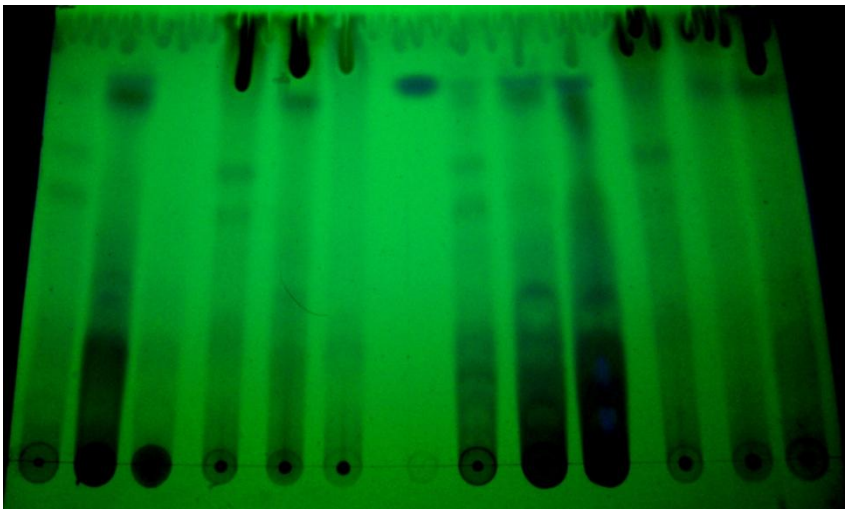

Figura 27. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, ácido gálico, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 2,43:5,57:2,0. Luz UV 254 nm.

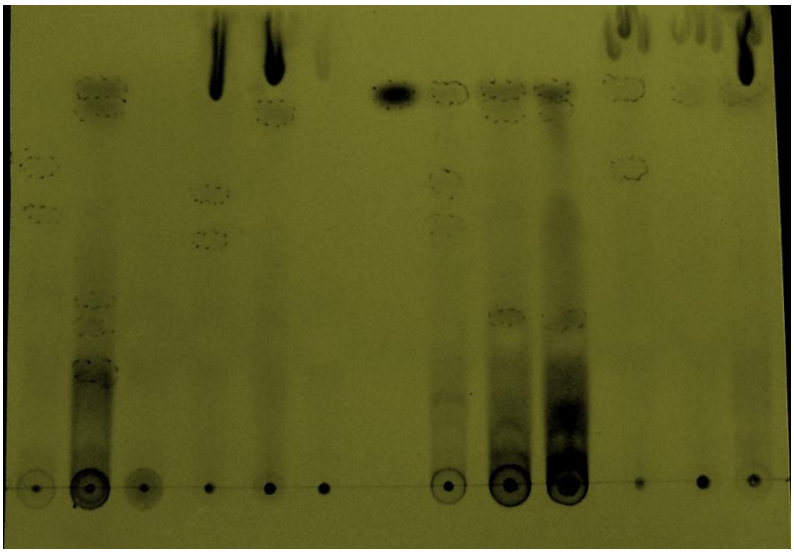

Figura 28. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, ácido gálico, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 2,43:5,57:2,0. Revelação com cloreto férrico 3 %.

A partir da observação das placas no momento em que foram finalizadas as análises e das imagens, tem-se os dados da Tabela 13 (Figuras 25 a 28).

Tabela 13. Resultados das análises por CCD para identificação de taninos e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 25 a 28).

	NÚMERO DE MANCHAS												
Extrato	1Caq	1FAq	1RAq	1CEt	1FEt	1REt	ác. gálico	2Caq	2FFAq	2FAq	2CEt	2FFEt	2FEt
luz visível	-	3	-	-	2	-	1	2	3	3	1	1	1
UV 365nm	6	6	1	3	3	-	1	7	7	6	6	1	1
UV 254nm	5	4	-	4	3	-	1	5	5	5	4	1	1
$FeCl_3$ 3%	1	5	-	-	2	-	1	2	5	6	1	2	2

Sob luz visível, os extratos aquosos de folhas (1FAq e 2FAq) e de flores/frutos (2FFAq) apresentaram mesmo perfil cromatográfico (3 manchas), mais complexo do que 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 cromatoplaca 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.

A observação da placa após a mesma ter sido revelada com cloreto férrico 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.

A partir da observação da placa no momento em que foi feita foram calculados os R_f, que estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Resultados das análises por CCD para identificação de corilagina e comparação dos R_f.

Extrato	1Caq	1FAq	1RAq	1CEt	1FEt	1Ret	corilagina	2CAq	2FFAq	2FAq	2CEt	2FFEt	2FEt
[1]R_f	0,23	0,23	-	-	0,23	-	0,23	0,23	0,23	0,23	-	0,23	0,23

[1]valores de R_f para manchas observadas nos extratos com valor semelhante ao apresentado pela corilagina.

Além das manchas já computadas na Tabela 13 (com exceção do ácido gálico), todos os extratos que apresentaram manchas evidenciaram uma mancha correspondente a mancha da corilagina (valores de R_f e coloração das manchas).

4.2.5. TERPENOS

Para análise de terpenos foram utilizadas 2 condições: a) fase móvel acetato de etila: hexano 1:9 (v/v) (SINGH et al., 1989); visualização sob luz visível (Figura 29), sob luz UV 365 nm (Figura 30) e 254 nm (Figura 31) e utilização do revelador ácido sulfúrico (Figura 32) e anisaldeído sulfúrico (Figura 33); b) fase móvel tolueno: acetato de etila: ácido acético 9,3:0,5:0,2 (v/v); baseada em KHATOON et al. (2006), visualização sob luz visível (Figura 34) e utilização do revelador anisaldeído sulfúrico (Figura 35). As amostras aplicadas foram: 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA.

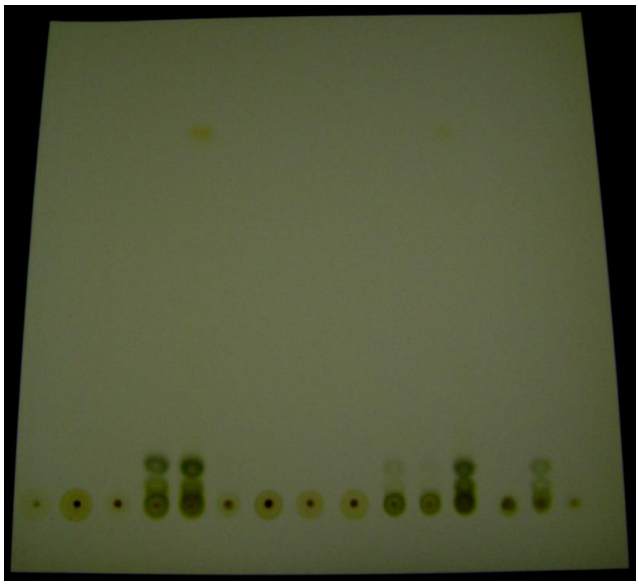

Figura 29. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: acetato de etila:hexano 1:9 (v/v). Luz visível.

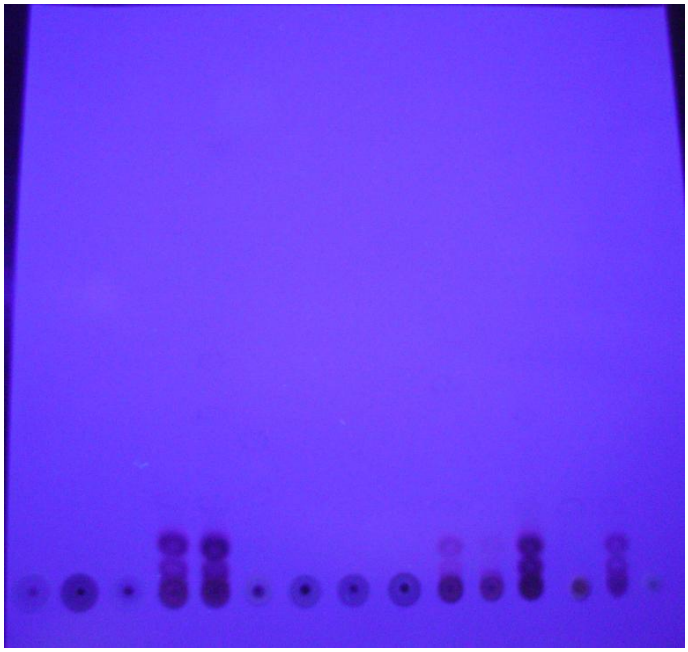

Figura 30. Observação sob luz UV 365nm da cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: acetato de etila:hexano 1:9 (v/v). Luz UV 365nm.

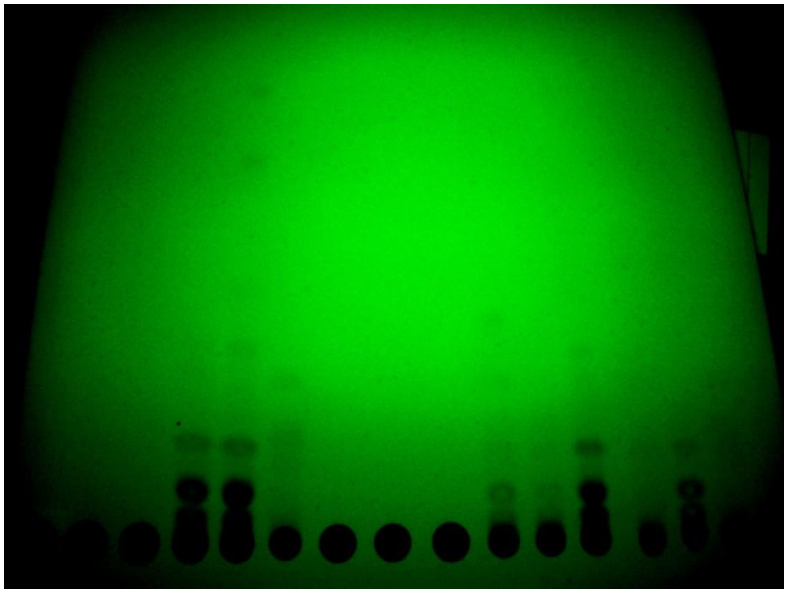

Figura 31. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: acetato de etila:hexano 1:9 (v/v).Luz UV 254 nm.

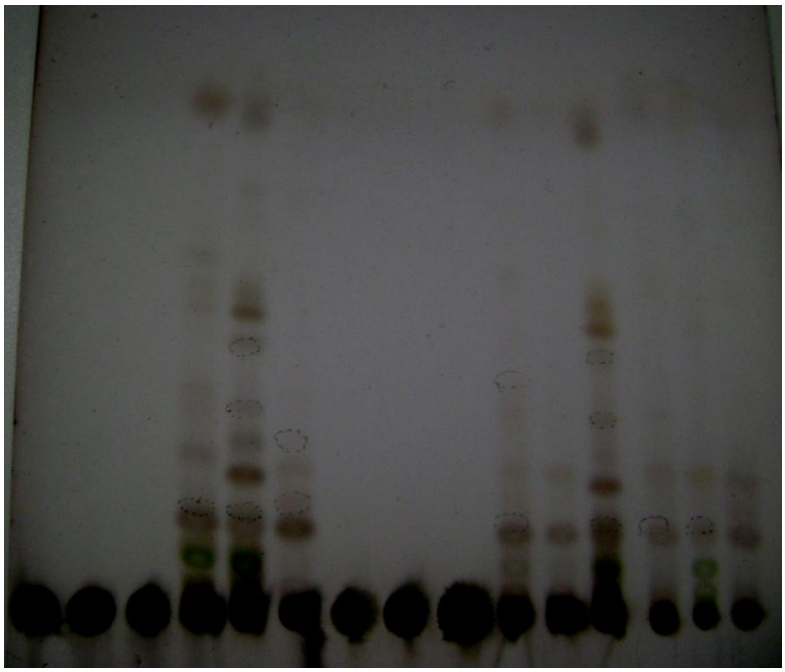

Figura 32. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: acetato de etila:hexano 1:9 (v/v). Revelação com ácido sulfúrico 10 %.

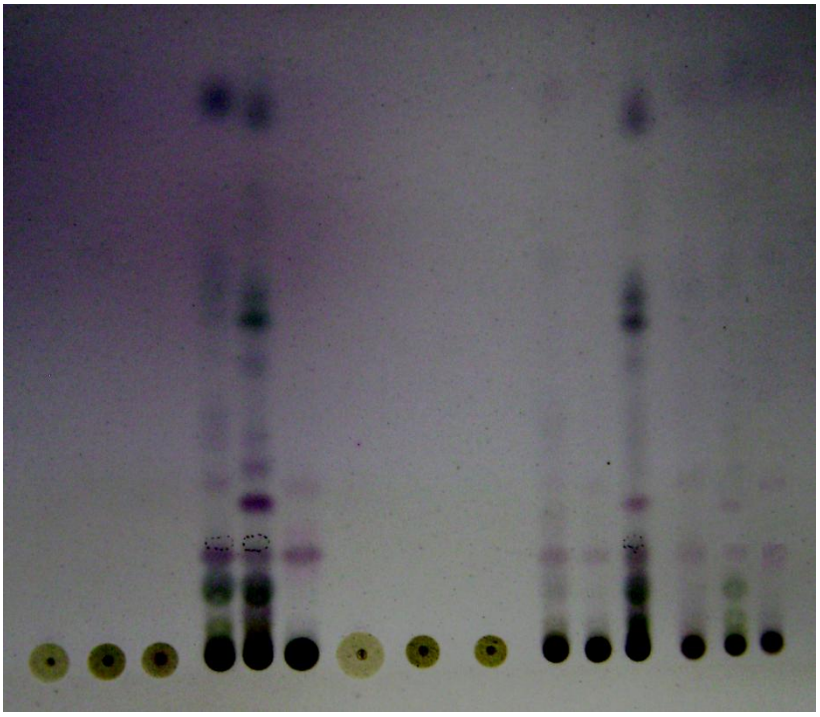

Figura 33. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: acetato de etila:hexano 1:9 (v/v). Revelação com anisaldeído sulfúrico.

A partir da observação da placa no momento em que foi feita e da imagem, tem-se os dados da Tabela 15 (Figuras 29 a 33).

Tabela 15. Resultados das análises por CCD para identificação de terpenos e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 29 a 33).

	NÚMERO DE MANCHAS														
Extrato	1CAq	1FAq	1RAq	1CEt	1FEt	1REt	2CAq	2FFAq	2FAq	2CEt	2FFEt	2FEt	1CHA	1FHA	1RHA
luz visível	-	-	-	2	3	-	-	-	-	2	2	3	-	2	-
UV 254 nm	-	-	-	5	8	3	-	-	-	6	4	8	1	3	1
UV 365 nm	-	-	-	2	2	-	-	-	-	2	2	2	1	2	-
ácido sulfúrico	-	-	-	13	13	4	-	-	-	9	5	13	12	12	7
anisaldeído sulfúrico	-	-	-	13	13	2	-	-	-	7	4	13	8	10	4

Conforme previsto devido à baixa força de eluição da fase móvel, não foram observadas manchas para os extratos aquosos em nenhuma das condições de visualização/revelação.

Sob luz visível e UV 365 nm os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos de folhas (1FEt e 2FEt) foram idênticos e, com exceção de uma mancha com maior valor de Rf, também foram iguais aos perfis de 1CEt, 2CEt, 2FFEt e 1FHA. Sob luz UV 254 nm, os perfis dos extratos etanólicos demonstraram maior complexidade, sendo que os extratos de folhas apresentaram 8 manchas com mesmos valores de Rf. Novamente, o perfil de raízes foi o que mais se distinguiu dos demais, não apresentando nenhuma mancha nas condições de visualização citadas.

As revelações com anisaldeído sulfúrico e ácido sulfúrico mostraram maior número de manchas. Os perfis cromatográficos de extratos etanólicos e hexano: acetato de etila de folhas e caules foram semelhantes. Já os extratos de raízes e flores/frutos apresentaram menor complexidade, porém suas manchas corresponderam às observadas nos outros órgãos.

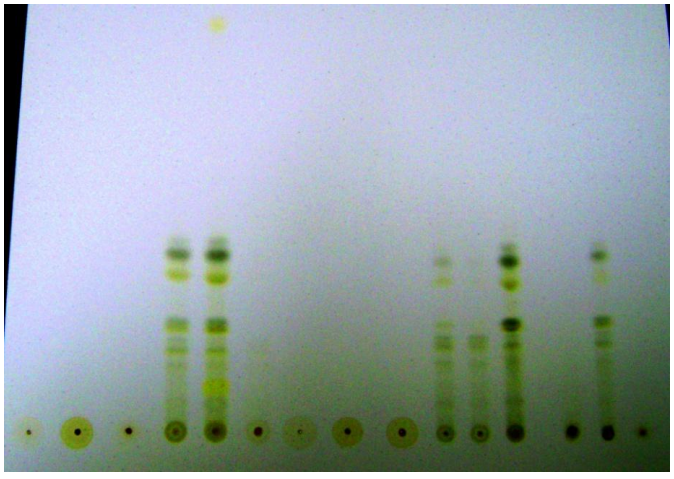

Figura 34. Cromatoplaca referente à análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetato de etila:ácido acético 9,3:0,5:0,2 (v/v).Luz visível.

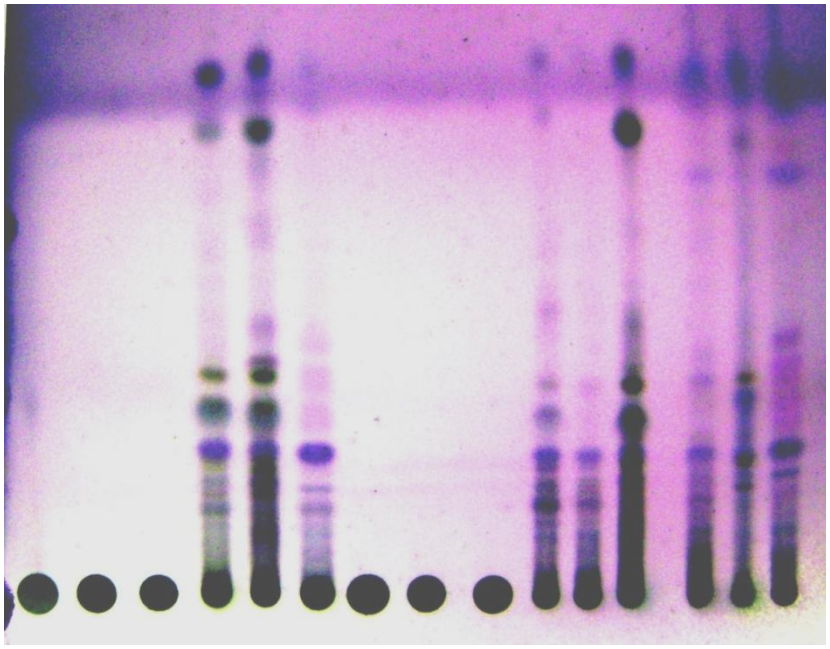

Figura 35. Cromatoplaca referente a análise dos extratos 1CAq, 1FAq, 1RAq, 1CEt, 1FEt, 1REt, 2CAq, 2FFAq, 2FAq, 2CEt, 2FFEt, 2FEt, 1CHA, 1FHA, 1RHA aplicados nesta ordem, da esquerda para a direita. FM: tolueno:acetato de etila:ácido acético 9,3:0,5:0,2 (v/v). Revelação com anisaldeído.

A partir da observação das placas no momento em que foram finalizadas as análises e das imagens, tem-se os dados da Tabela 16 (Figuras 34 e 35).

Tabela 16. Resultados das análises por CCD para identificação de terpenos e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos (Figuras 34 e 35).

extrato	1Caq	1FAq	1RAq	1CEt	1FEt	1REt	2CAq	2FFAq	2FAq	2CEt	2FFEt	2FEt	1CHA	1FHA	1RHA
luz visível	-	-	-	9	11	-	-	-	-	9	4	9	-	9	-
anisaldeído sulfúrico	-	-	-	16	17	11	-	-	-	16	7	17	13	15	12

Tanto na visualização quanto após a revelação com anisaldeído sulfúrico, 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 evidencia da variabilidade da produção de metabolitos secundários. Em relação aos extratos hexano: acetato de etila, somente 1FHA apresentou manchas, tendo perfil semelhante à 1CEt/2CEt.

Os perfis cromatográficos após revelação com anisaldeído sulfúrico demonstraram maior complexidade. Os perfis de extratos etanólicos e hexano: acetato de etila 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.

4.3. ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES

Foram testados os extratos aquosos e etanólicos com o reagente de Dragendorff e em nenhum deles houve formação de precipitado, o que indica a ausência ou presença apenas de traços de alcaloides nas amostras. O controle utilizado (quinina) deu reação positiva. Talvez a ausência de alcaloides justifique-se pelo método de extração utilizado, sendo uma extração do tipo ácido-base reconhecidamente mais eficiente para esta classe de metabólitos secundários.

4.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Para determinar a concentração de fenólicos totais nos extratos, foi utilizada uma curva analítica obtida a partir da leitura em triplicata da absorbância de

soluções de ácido gálico de diferentes concentrações. A concentração de ácido gálico utilizada variou de 1,25 a 20 µg/mL. A Tabela 17 apresenta os dados obtidos para a curva analítica.

Tabela 17. Dados de absorbância relativos às soluções de ácido gálico de diferentes concentrações.

ácido gálico (µg/mL)	Média das Absorbâncias
1,25	0,194
2,50	0,370
4,00	0,529
5,00	0,580
7,50	0,855
9,00	1,067
10,00	1,147
10,50	1,221
20,00	2,112

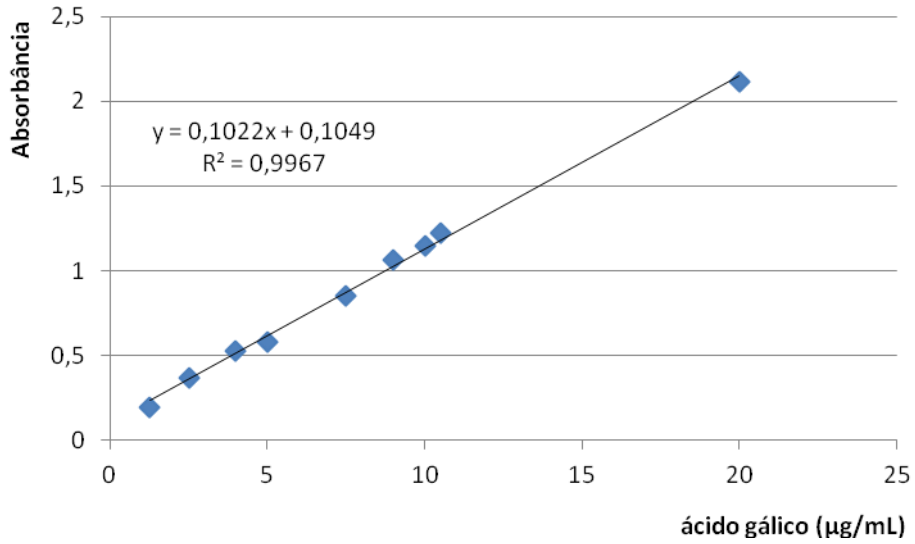

Figura 36. Curva analítica obtida a partir do ácido gálico para determinação do teor de fenólicos totais utilizando o reagente de Folin-Ciocalteau.

A leitura das absorbâncias de cada extrato foi feita em triplicata e a média dos valores foi calculada, como pode ser observado na Tabela 18.

Tabela 18. Dados de absorbância relativos às soluções dos extratos.

Extrato	Média das Absorbâncias
1Caq	0,347
1FAq*	0,756
1RAq	0,638
1CEt	0,259
1FEt	0,454
2Caq	0,546
2FFAq*	0,620
2FAq*	0,628
2CEt	0,295
2FFEt	0,354
2FEt	0,473

*****extratos cuja concentração final foi de 25µg/mL ao invés de 50µg/mL.

As respectivas concentrações de fenólicos totais nos extratos foram calculadas, descontando-se do valor de absorbância dos extratos o valor de absorbância do branco (0,020), segundo a equação a seguir:

$y = 0,1022 . x + 0,1049$

Sendo y referente à absorbância e x à concentração de fenólicos totais. Segue exemplo de cálculo para 1CAq:

Absorbância = 0,347

Branco = 0,020

Absorbância – Branco = 0,327

$y = 0,1022.x + 0,1049$

$0,327 = 0,1022.x + 0,1049$

$0,222 = 0,1022.x$

$x = 2,17$ µg/mL

Assim, considerando-se o volume de 1,0 mL, em 50 µg de amostra tem-se 2,17 µg de fenólicos totais, o que em porcentagem representa:

50 µg – 100% x = 4,34 %

2,17 µg – x

Tabela 19. Teor de fenólicos totais nos extratos de *P. niruri* L.

Extrato	Teor de Fenólicos Totais (%)
1CAq	4,34
1FAq	24,68
1RAq	10,04
1CEt	2,62
1FEt	6,44
2CAq	8,24
2FFAq	19,38
2FAq	19,69
2CEt	3,32
2FFEt	4,48
2FEt	6,81

Considerando os dados da tabela acima, podemos concluir que o maior conteúdo de fenólicos totais foi encontrado nos extratos aquosos das folhas, sendo que 1FAq apresentou teor cerca de 5 % maior do que 2FAq. 2FFAq apresentou mesmo teor de fenólicos do que 2FAq. Em relação ao caule, os resultados foram inversos ao de folhas ao se comparar os extratos produzidos com as partes vegetais colhidas em fevereiro e agosto, neste caso, o extrato produzido com os caules coletados em fevereiro apresentou maior teor. Comparando-se caules com folhas, o teor obtido no último caso foi bem maior. O extrato aquoso de raízes apresentou teor de fenólicos maior do que o de caules. O menor teor observado nos extratos etanólicos era esperado, já que a extração realizada foi sequencial e a água foi o primeiro solvente extrator utilizado. Porém, quando se objetiva a análise do teor de compostos fenólicos totais no material vegetal de partida para produção de extratos, todos os extratos produzidos sequencialmente com o mesmo material vegetal devem ser analisados. Observando os teores de compostos fenólicos totais encontrados para os extratos etanólicos, pode-se concluir que estes representam de 23 a 60% do teor encontrado nos extratos aquosos para os respectivos extratos, porcentagem esta significativa. Após a extração com etanol ainda restaram compostos fenólicos totais no material vegetal residual.

4.5. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

O procedimento utilizado para analisar o teor de flavonoides totais em *P. niruri* foi escolhido com base na análise das classes de flavonoides preponderantes na espécie. Assim, é importante destacar que ao contrário do que a nomenclatura indica, esse método não é capaz de fornecer o teor de flavonoides totais, mas sim, dos flavonoides que reagem com o agente complexante. Estudos anteriores mostraram que no procedimento A utilizado por Yu et al. (2012), o mecanismo cromogênico pode ser a formação de um complexo estável amarelo brilhante, por complexação de íons de alumínio com o grupo carbonila na posição C-4 e o grupo hidroxila na posição C-3 ou C-5 da estrutura dos flavonoides. Assim, as flavonas, por exemplo, sem a hidroxila na posição 5, tais como 6-hidroxiflavona, não podem ser quantificadas com este procedimento (YU et al., 2012).

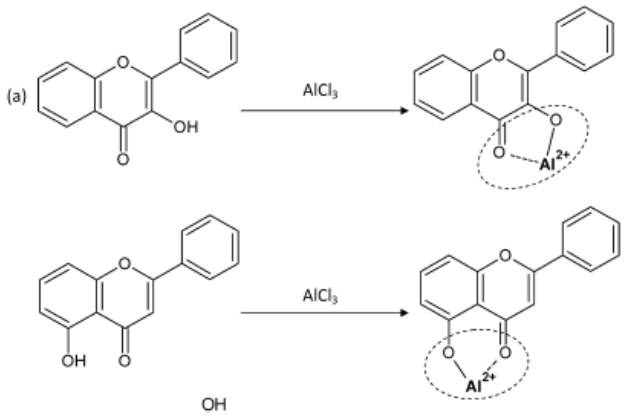

Figura 37. Possíveis complexos cromogênicos gerados por íons de alumínio com substituintes funcionais de flavonóis e flavonas.

Para determinar a concentração de flavonoides totais nos extratos, foi utilizada uma curva analítica obtida a partir da leitura em triplicata da absorbância de soluções de quercetina de diferentes concentrações. A concentração final da quercetina (na cubeta) variou de 0,3125 a 10 µg/mL. A Tabela 20 apresenta os dados obtidos para a curva analítica.

Tabela 20. Dados de absorbância relativos às soluções de quercetina de diferentes concentrações.

quercetina (µg/mL)	Média das Absorbâncias
0,31	0,018
0,63	0,049
1,25	0,111
2,50	0,250
5,00	0,508
10,00	1,011

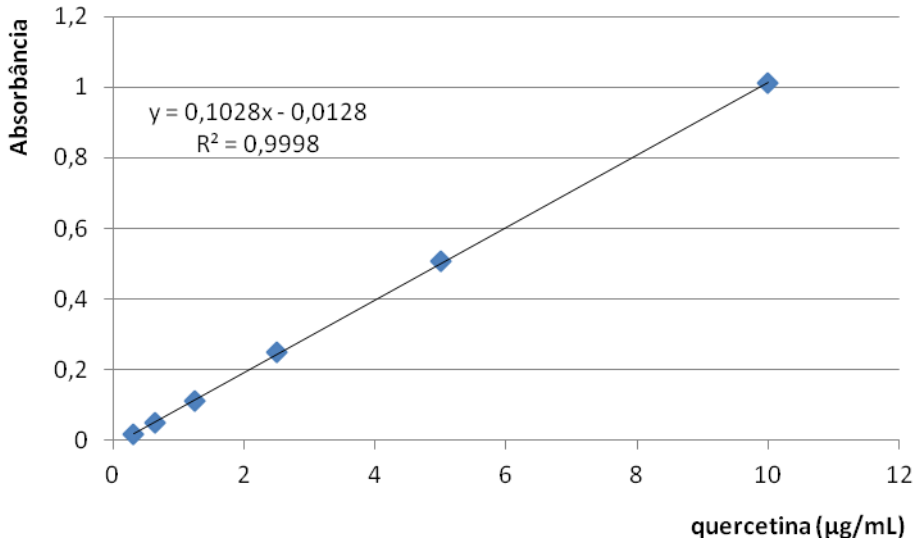

Figura 38. Curva analítica obtida para a quercetina para determinação do teor de flavonoides totais utilizando o reagente complexante cloreto de alumínio.

A leitura das absorbâncias de cada extrato foi feita em triplicata e a média dos valores foi calculada, como pode ser observado na Tabela 21.

Tabela 21. Dados de absorbância relativos às soluções dos extratos.

Extrato	Média das Absorbâncias
1CAq	0,084
1FAq	0,311
1RAq	0,052
1CEt*	0,521
1FEt*	1,071
2CAq	0,069
2FFAq	0,099
2FAq	0,228
2CEt*	0,517
2FFEt	0,864
2FEt*	0,992

*extratos cuja concentração final foi de 250 µg/mL ao invés de 500 µg/mL.

As respectivas concentrações de flavonoides totais devem ser calculadas descontando-se do valor de absorbância dos extratos o valor e absorbância do branco, porém, como esse valor foi zero, tendo o valor de absorbância dos extratos parte-se direto para a seguinte equação:

$y = 0,1028 . x – 0,0128$

Sendo y referente à absorbância e x à concentração de flavonoides totais expressos como quercetina.

Segue exemplo de cálculo para 1CAq:

Absorbância solução do extrato 1CAq = 0,084

Absorbância solução Branco = 0

Absorbância 1CAq – Absorbância Branco = 0,084

$y = 0,1028 . x - 0,0128$

$0,084 = 0,1028 . x - 0,0128$

$0,0968 = 0,1028.x$

$x = 0,94$ µg/mL

Assim, considerando-se o volume de 1,0 mL, em 500 μg de amostra tem-se 9,40 μg de flavonoides totais expressos como quercetina, o que em porcentagem representa:

500 μg – 100% x = 0,19 %

0,94 μg - x

Tabela 22. Teor de flavonoides totais expressos como quercetina nos extratos de *P. niruri* L.

Extrato	Teor de Flavonoides Totais (%)
1CAq	0,19
1FAq	0,63
1RAq	0,13
1CEt	2,08
1FEt	4,22
2CAq	0,16
2FFAq	0,22
2FAq	0,47
2CEt	2,06
2FFEt	1,71
2FEt	3,91

Considerando os dados da tabela acima, podemos concluir que o maior conteúdo de flavonoides totais foi encontrado nos extratos etanólicos das folhas, cujos valores foram próximos para as duas coletas distintas. Os extratos etanólicos de caule foram os que apresentaram o segundo maior teor de flavonoides totais, superando o extrato etanólico de flores/frutos, diferentemente do que ocorreu na análise do Teor de Fenólicos Totais (Relatório Parcial), onde o segundo maior teor pertenceu ao extrato de flores/frutos. O extrato etanólico de raízes não foi analisado por falta de amostra. Ao se comparar os extratos produzidos com as partes vegetais colhidas em fevereiro e agosto, em todos os casos os extratos produzidos com as partes vegetais colhidas em agosto apresentaram maior teor de flavonoides totais. Comparando-se caules com folhas, tanto dos extratos aquosos, quanto dos extratos

etanólicos, o teor obtido nas folhas foi bem maior, tendo ocorrido variação entre cerca de 2 a 4 vezes. O teor do extrato aquoso de raízes foi o menor teor observado. O menor teor observado nos extratos aquosos era esperado, já que, de modo geral, o etanol possui maior seletividade na extração de flavonoides (SIMÕES et al., 2007). É importante lembrar 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, como explicado no início deste ítem.

Os valores obtidos mostram claramente a importância de se fazer extrações sucessivas (ou exaustivas) no caso de análises empregadas para avaliar teores em drogas vegetais, o que pode ser observado, por exemplo, comparando os extratos 1FAq e 1FEt, sendo o valor obtido por 1FAq corresponde a 15% do valor obtido por 1FEt, porcentagem esta significativa, e que deve ser somada ao valor predominante (1FEt) para se chegar a um teor de flavonoides totais na droga vegetal mais próximo do real. Possivelmente, após a extração com etanol ainda restaram flavonoides no material vegetal residual.

4.6. PREPARO DOS EXTRAOS (*CLEAN UP*) PARA ANÁLISE POR CLUE

Após o *clean up* a massa das amostras obtidas variou como mostrado na Tabela 23.

Tabela 23. Massa e rendimento obtido no pré-tratamento das amostras para análise por CLUE.

Extrato	Massa inicial	Massa pós *clean up*	Rendimento (%)
1CAq	10,0	2,6	26
1FAq	10,7	2,8	26
1RAq	10,7	2,6	24
2CAq	9,9	2,7	27
2FFAq	10,2	2,5	25
2FAq	9,9	1,7	17
1CEt	5,5	2,8	51
1FEt	5,0	1,9	38
2CEt	3,0	1,5	50
2FFEt	5,2	2,7	52
2FEt	5,4	1,7	31

4.7. ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE)

Os dados referentes às curvas analíticas (Figuras 39 a 41) obtidas por meio dos padrões ácido elágico, ácido gálico e corilagina são apresentados na Tabela 24 e nas Figuras 42 a 44.

Tabela 24. Dados relativos às curvas analíticas de ácido elágico, ácido gálico e corilagina.

Padrão	Concentração (mg/L)	Área do pico (média triplicata)	Tempo de retenção (min)
Ácido elágico	7,560	359457,33	4,7
	30,274	1321702,00	
	37,964	1494760,67	
	45,427	1685448,33	
	68,141	2133574,33	
Ácido gálico	4,115	133324,67	2,1
	32,916	1119308,33	
	41,146	1396695,33	
	49,375	1674826,67	
	82,291	2695763,33	
Corilagina	13,696	274299,00	3,3
	54,786	1097547,33	
	68,482	1344803,00	
	82,179	1662297,00	
	136,965	2767820,67	

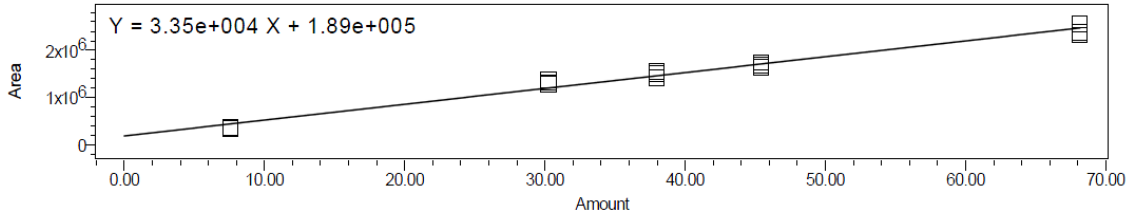

Figura 39. Curva analítica do ácido elágico.

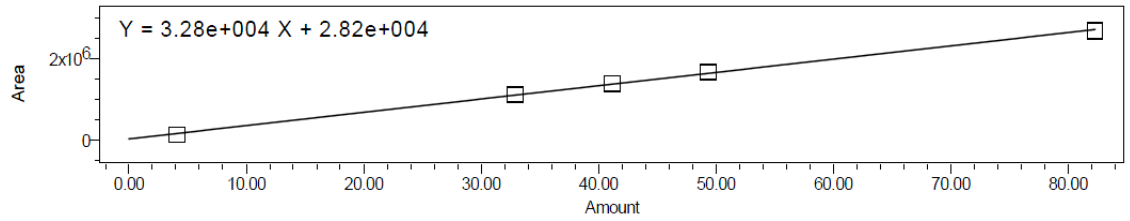

Figura 40. Curva analítica do ácido gálico.

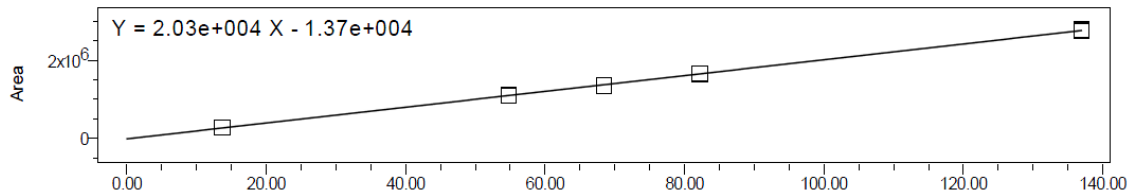

Figura 41. Curva analítica da corilagina.

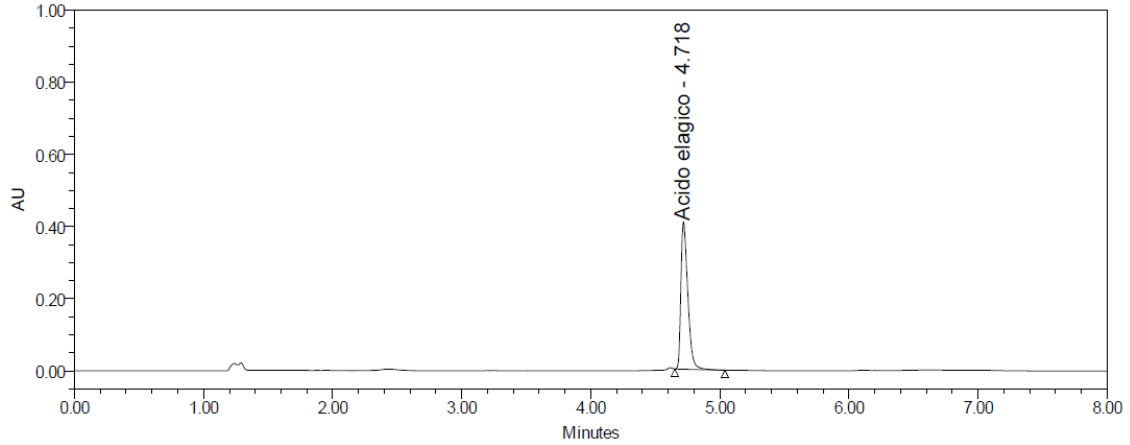

Figura 42. Cromatograma do ácido elágico na concentração de 37,96 µg/mL, referente à curva analítica.

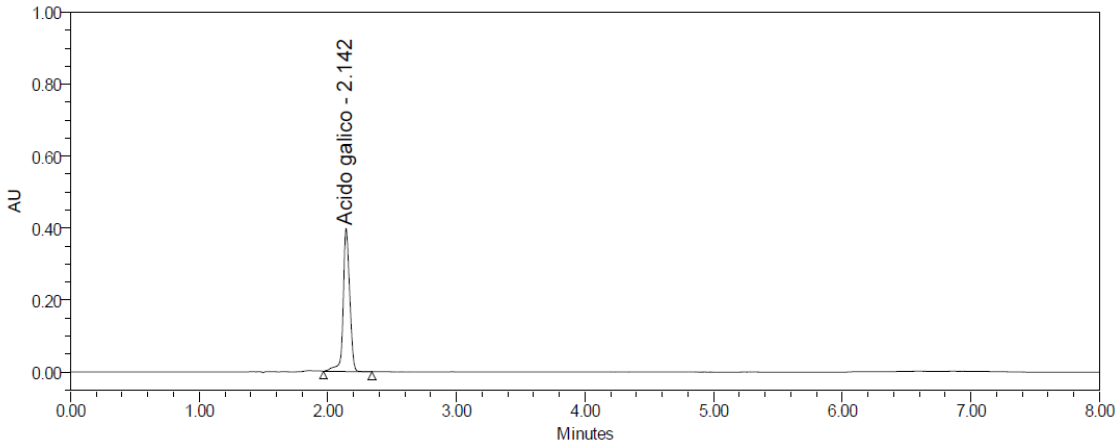

Figura 43. Cromatograma do ácido gálico na concentração de 41,15 µg/mL, referente à curva analítica.

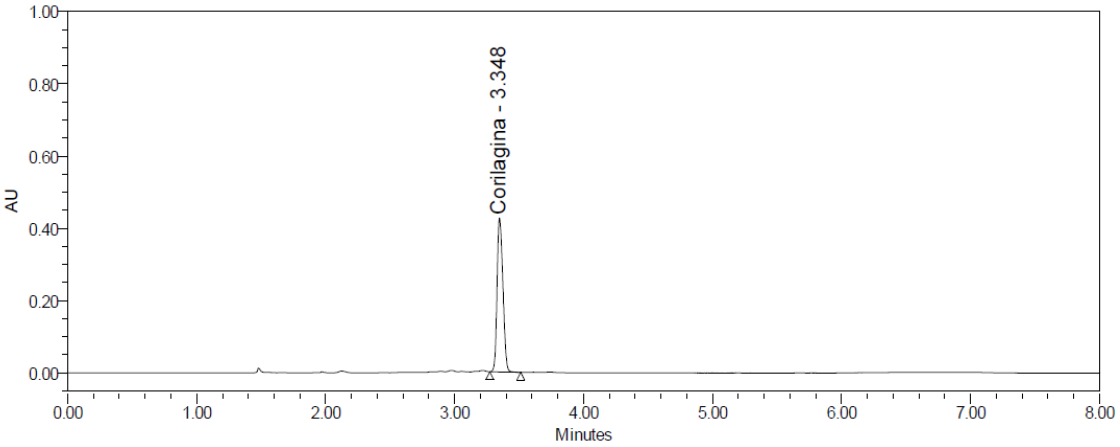

Figura 44. Cromatograma da corilagina na concentração de 68,48 µg/mL, referente à curva analítica.

Os dados referentes às amostras são apresentados nas Tabela 25 a 28 e nas Figuras 45 a 55.

Tabela 25. Concentração de ácido elágico nos extratos aquosos e etanólicos. t_R = 4,7 min.

Amostra			Resultados análise		
Nome	**Massa (mg)**	**Volume (mL)**	**Área do pico**	**Concentração (mg/L)**	**Teor (m/m, %)**
1CAq	2,6	5,0	22551,5	-----[1]	-----
2CAq	2,7	5,0	44678,9	-----[1]	-----
2FFAq	2,5	5,0	350489,2	9627,76	0,96
1FAq	2,8	5,0	1553046,3	73558,09	7,36
2FAq	1,7	5,0	345025,8	13441,08	1,34
1RAq	2,6	5,0	12968,2	-----[1]	-----
1CEt	2,8	4,0	13748,1	-----[1]	-----
2CEt	1,5	4,0	23329,0	-----[1]	-----
2FFEt	2,7	4,0	164934,4	-----[1]	-----
1FEt	1,9	4,0	393055,7	12812,51	1,28
2FEt	1,7	4,0	734954,8	38360,66	3,84

[1]concentração não calculada devido ao valor da área obtida ser menor do que o valor da concentração mais baixa utilizada na curva analítica.

Tabela 26. Concentração de ácido gálico nos extratos aquosos e etanólicos. t_R = 2,1 min.

Amostra			Resultados análise		
Nome	**Massa (mg)**	**Volume (mL)**	**Área do pico**	**Concentração (mg/L)**	**Teor (%)**
1CAq	2,6	5,0	42038,2	818,99	0,08
2CAq	2,7	5,0	102380,4	4267,48	0,43
2FFAq	2,5	5,0	195158,8	10184,13	1,02
1FAq	2,8	5,0	551054,2	28788,85	2,88
2FAq	1,7	5,0	236973,6	18403,66	1,84
1RAq	2,6	5,0	15853,3	-----[1]	-----
1CEt	2,8	4,0	32934,7	204,64	0,02
2CEt	1,5	4,0	56971,7	2337,40	0,23
2FFEt	2,7	4,0	135645,6	4854,15	0,49
1FEt	1,9	4,0	202250,7	11175,60	1,12
2FEt	1,7	4,0	12207,8	-----[1]	-----

[1]concentração não calculada devido ao valor da área obtida ser menor do que o valor da concentração mais baixa utilizada na curva analítica.

Tabela 27. Concentração de corilagina nos extratos aquosos e etanólicos. t_R = 3,4 min.

Amostra			Resultados análise		
Nome	**Massa (mg)**	**Volume (mL)**	**Área do pico**	**Concentração (mg/L)**	**Teor (%)**
1CAq	2,6	5,0	12326,9	2497,57	0,25
2CAq	2,7	5,0	31508,6	4385,87	0,44
2FFAq	2,5	5,0	600406,4	60919,04	6,09
1FAq	2,8	5,0	686550,2	62383,24	6,24
2FAq	1,7	5,0	588023,3	85830,87	8,58
1RAq	2,6	5,0	4578,8	1707,08	0,17
1CEt	2,8	4,0	2536,8	1143,65	0,11
2CEt	1,5	4,0	3963,6	2322,60	0,23
2FFEt	2,7	4,0	68696,7	6023,56	0,60
1FEt	1,9	4,0	257628,4	28190,96	2,82
2FEt	1,7	4,0	92399,6	12319,46	1,23

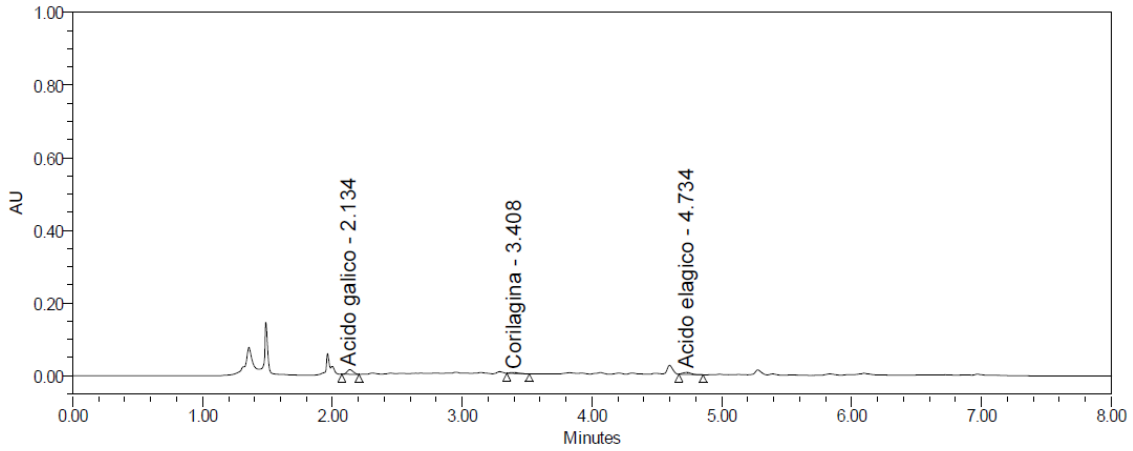

Figura 45. Cromatograma da amostra 1CAq.

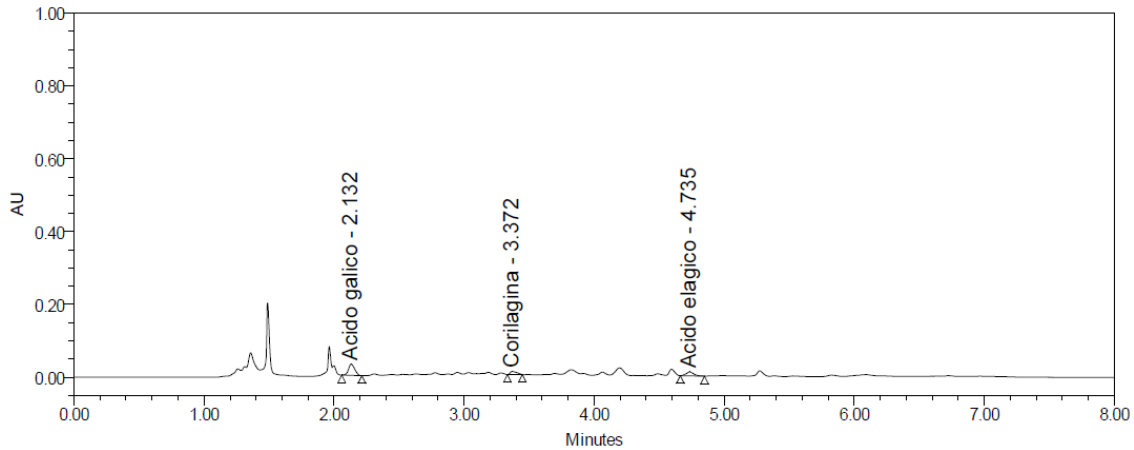

Figura 46. Cromatograma da amostra 2CAq.

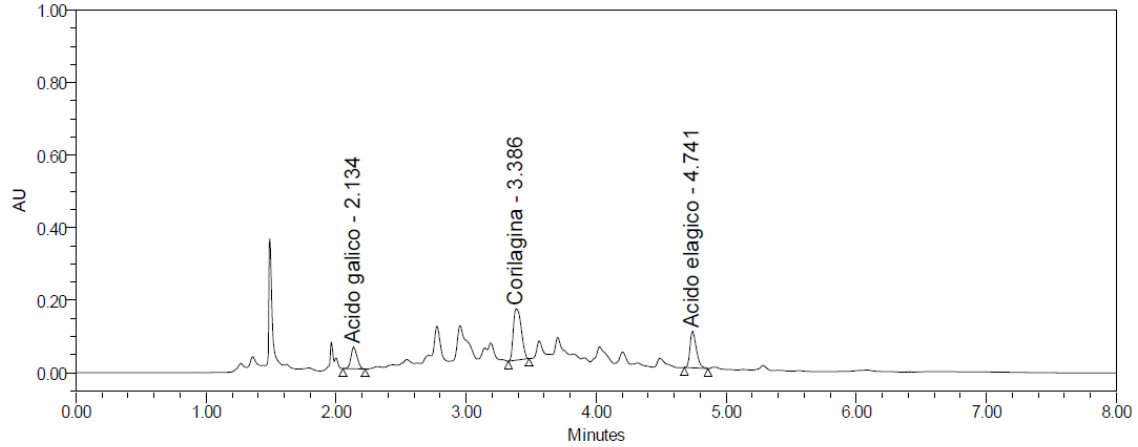

Figura 47. Cromatograma da amostra 2FFAq.

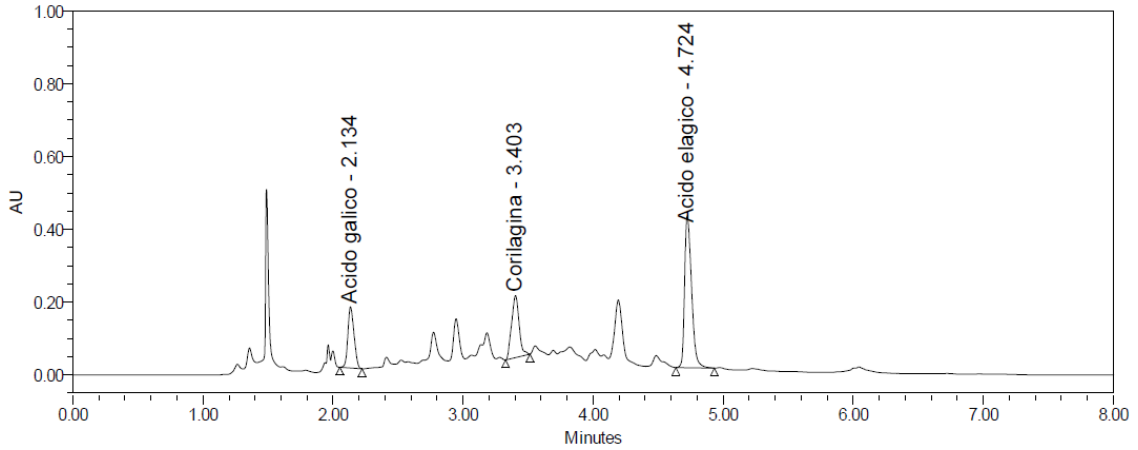

Figura 48. Cromatograma da amostra 1FAq.

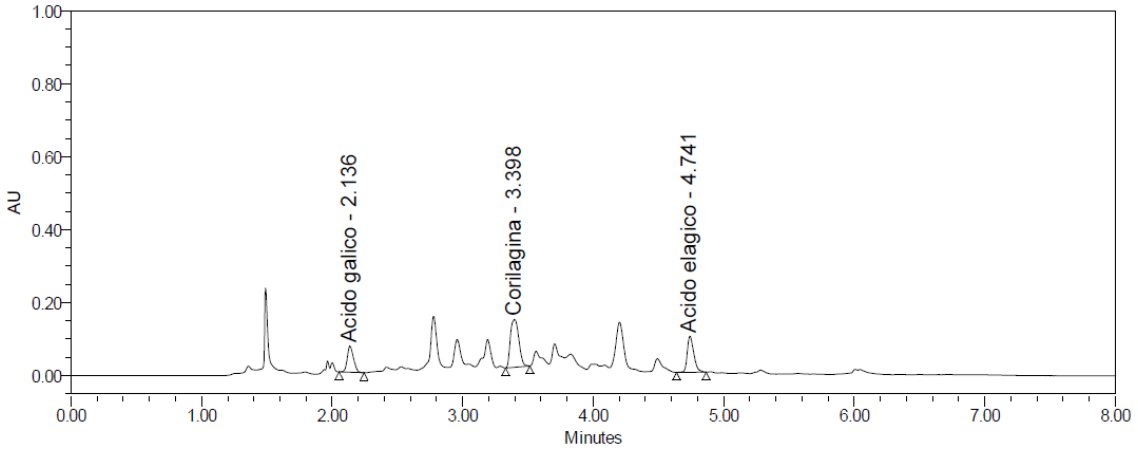

Figura 49. Cromatograma da amostra 2FAq.

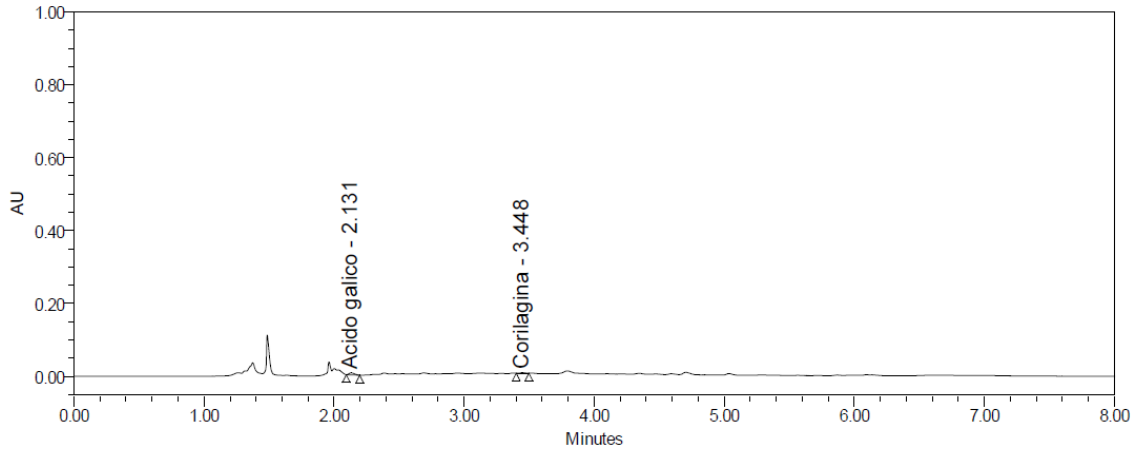

Figura 50. Cromatograma da amostra 1RAq.

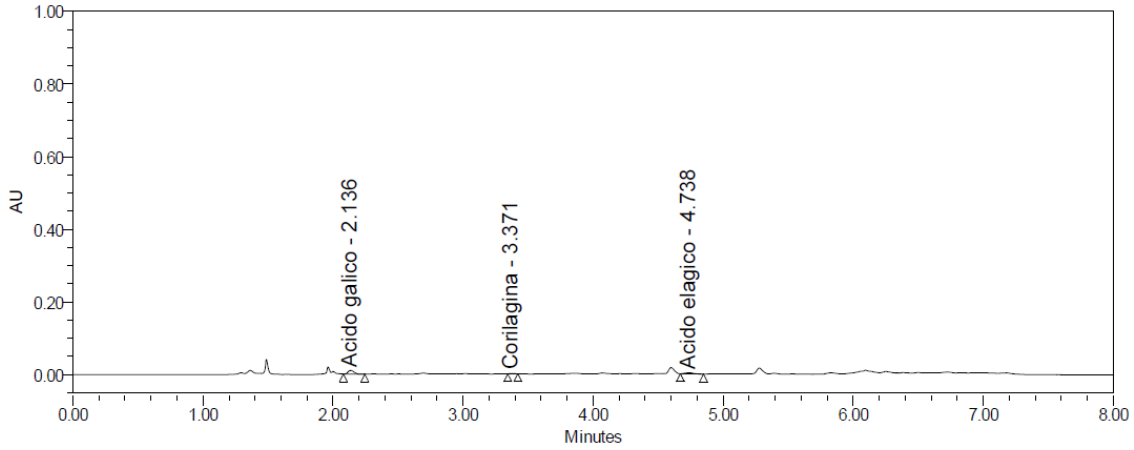

Figura 51. Cromatograma da amostra 1CEt.

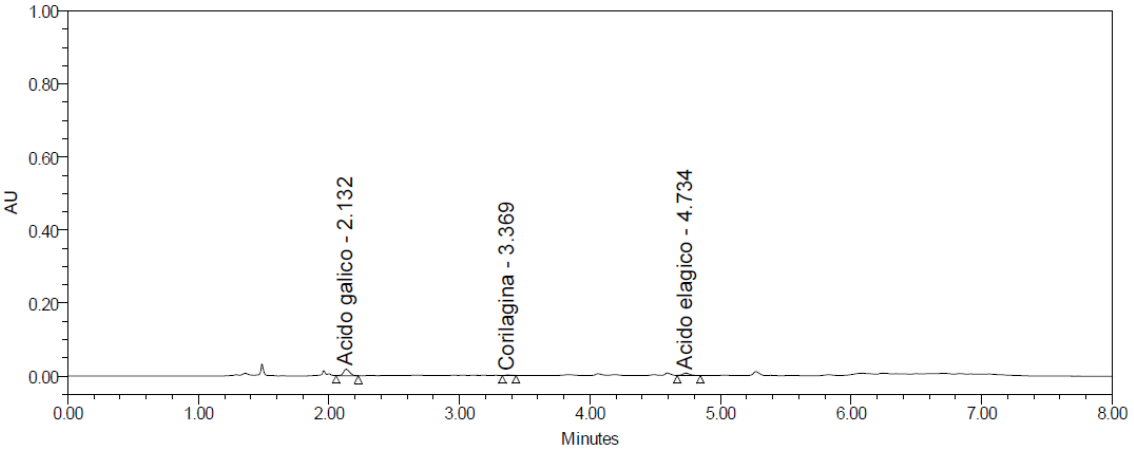

Figura 52. Cromatograma da amostra 2CEt.

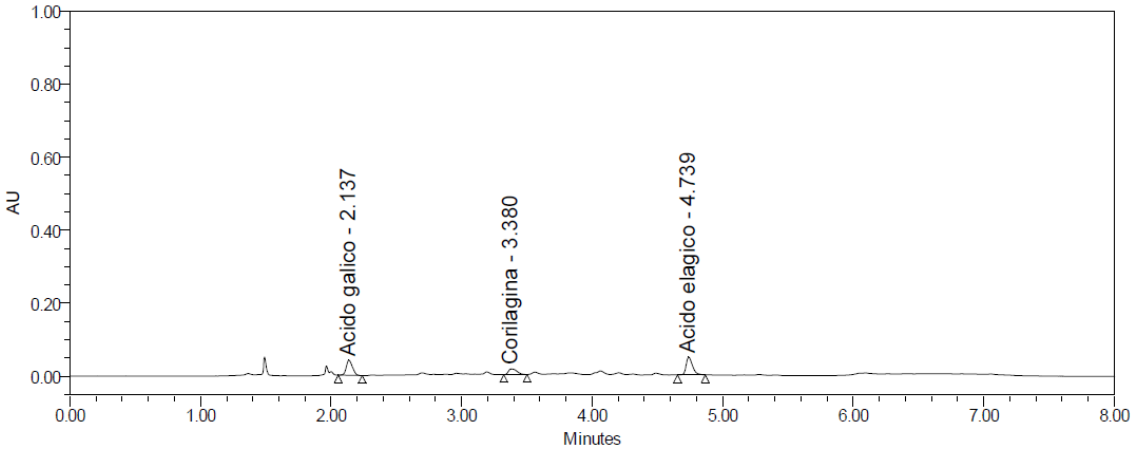

Figura 53. Cromatograma da amostra 2FFEt.

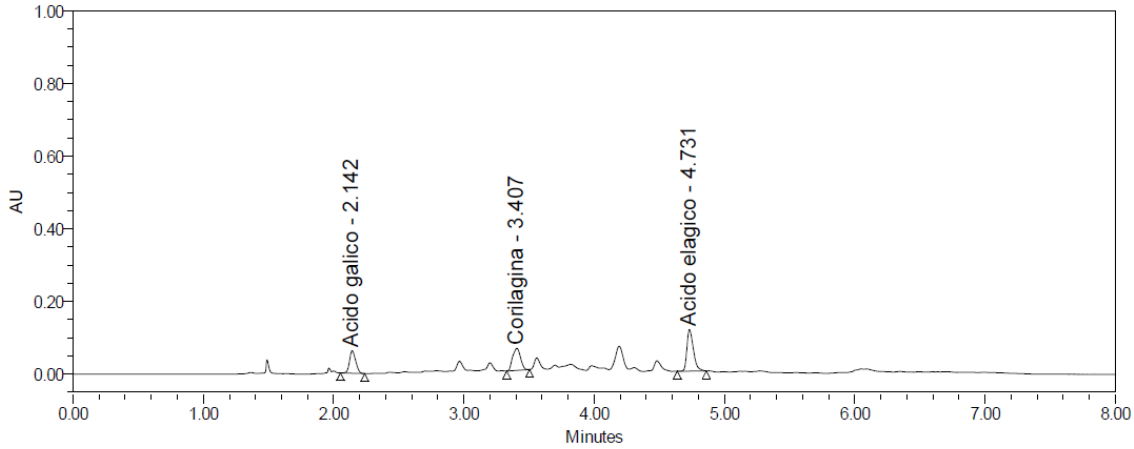

Figura 54. Cromatograma da amostra 1FEt.

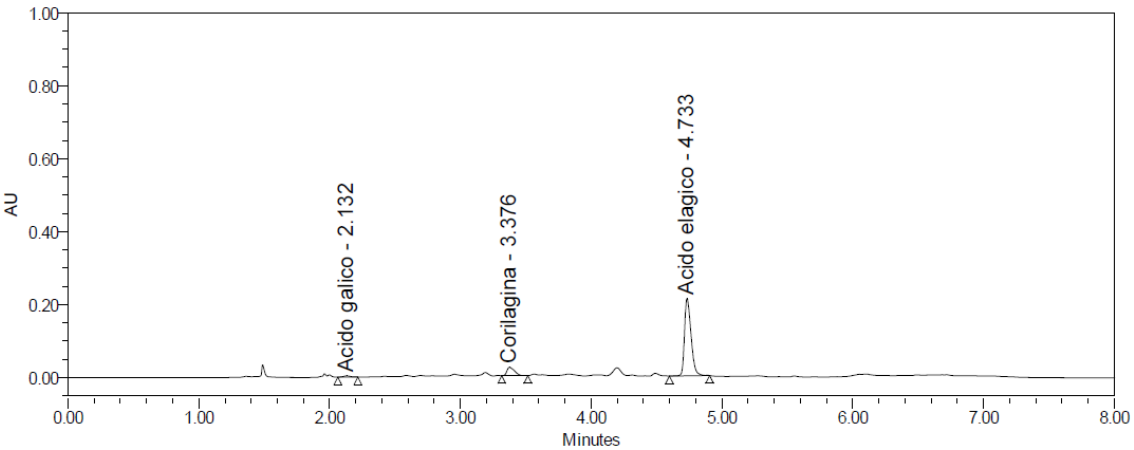

Figura 55. Cromatograma da amostra 2FEt.

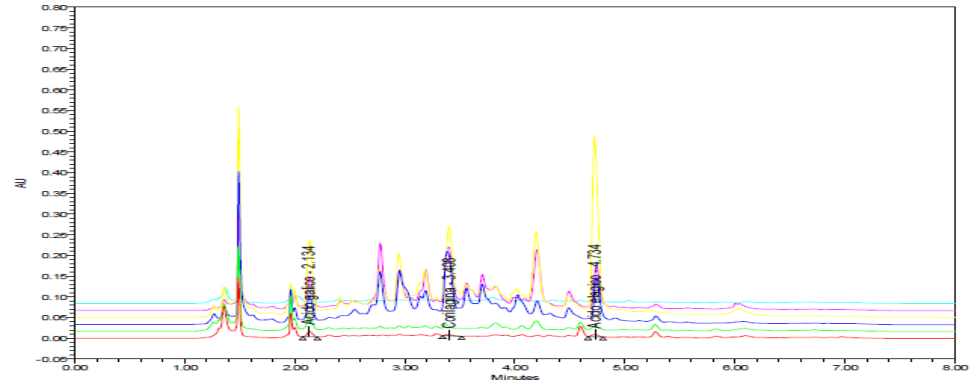

Figura 56. Sobreposição dos cromatogramas referentes à análise dos extratos 1CAq, 2CAq, 2FFAq, 1FAq, 2FAq e 1RAq, da frente para trás.

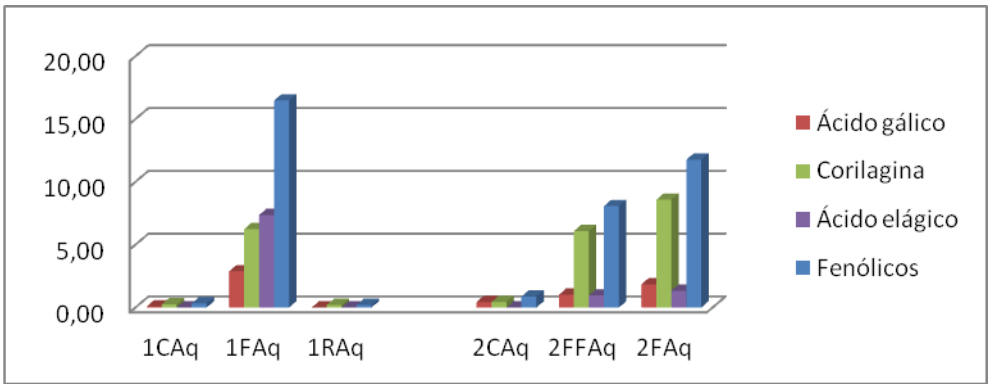

Figura 57. Teor em porcentagem de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e fenólicos (soma dos três anteriores) nos extratos aquosos de diferentes partes de *P. niruri.*

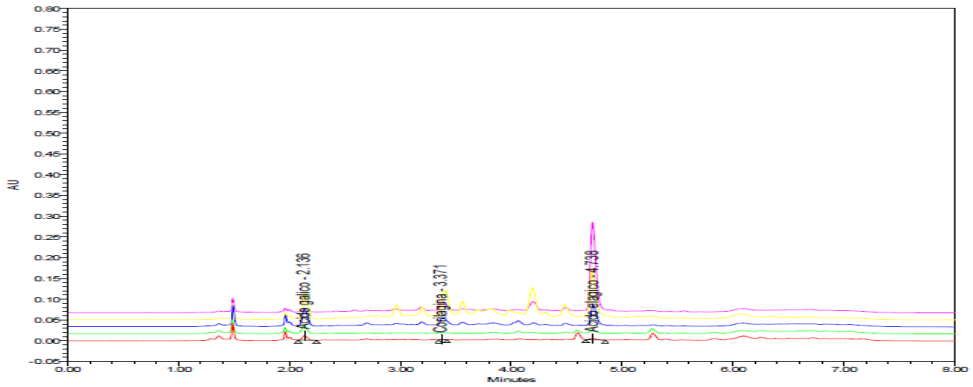

Figura 58. Sobreposição dos cromatogramas referentes à análise dos extratos 1CEt, 2CEt, 2FFEt, 1FEt e 2FEt, da frente para trás.

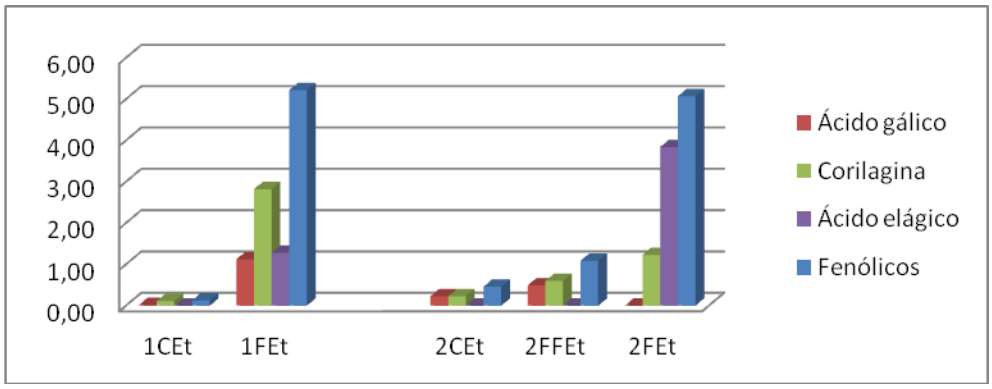

Figura 59. Teor em porcentagem de ácido gálico, corilagina, ácido elágico e fenólicos (soma dos três anteriores) nos extratos etanólicos de diferentes partes de *P. niruri.*

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 (7,36 %); 2FAq apresentou teor de 1,34 %.

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.

A detecção da corilagina em todas as amostras analisadas e o seu maior teor apresentado, além de possuir importância por sua ação biológica mostra, em contraponto com os outros 2 padrões, que a corilagina é um bom marcador fitoquímico para a espécie *Phyllanthus niruri*,

Com relação aos perfis cromatográficos observados nos cromatogramas (Figuras 42 a 52), os extratos de folhas e frutos/flores apresentaram perfis mais complexos e similares entre si, em oposição aos extratos de caules e raiz.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados pode-se inferir que o perfil químico de folhas e caules é mais complexo do que o perfil químico de raízes para todas as classes de metabólitos avaliadas. Há também diferenças químicas menos pronunciadas entre folhas e caules, sendo o perfil de folhas mais complexo. Quanto às flores/frutos, mostraram-se semelhantes quimicamente às folhas. Os extratos etanólicos apresentaram perfil químico (CCD) semelhante aos aquosos em condições de fase móvel mais polares e com fases móveis menos polares, perfis semelhantes aos extratos acetato de etila:hexano. Comparando-se as duas coletas realizadas, foram observadas diferenças significativas entre os mesmos órgãos da planta (folhas e caules), o que sugere a existência de variabilidade química na espécie (sazonalidade).

Quanto aos padrões utilizados em CCD, tanto a rutina como a corilagina foram identificadas na maioria dos extratos, o que sugere mais uma vez a

possibilidade de uso dessas substâncias como marcadores fitoquímicos de *Phyllanthus niruri*.

A determinação do teor de flavonoides totais revelou maior teor destes compostos em folhas, seguido de caules e raízes, para os extratos **1**; e folhas, seguido de caule e flores/frutos, para os extratos **2**. Já em relação aos compostos fenólicos totais, foi observado maior conteúdo em folhas, seguido de raízes e caule, para os extratos **1**; e folhas, seguido de flores/fruto e caule, para os extratos **2**.

As análises por CLUE, tanto em relação aos teores de corilagina, ácidos gálico e elágico quanto ao perfil cromatográfico, permitiram chegar as mesmas conclusões do que as análises por CCD: perfil marcadamente distinto entre partes aéreas e raízes, com maior semelhança entre folhas e flores/frutos; variabilidade química entre as diferentes coletas.

De forma geral, concluímos que o perfil químico de raízes é o que mais se distingue das demais partes da planta, resultado semelhante ao descrito por Couto et al. (2013a). Além disso, dentre os extratos aquosos obtidos, o extrato de raízes foi o que apresentou menor rendimento. Considerando-se também as dificuldades relacionadas ao uso de raízes, desde o manejo do cultivo até a produção da droga vegetal, como por exemplo, a contaminação por solo e micro-organismos, nossos dados sugerem o uso apenas de partes aéreas ou de folhas de *P. niruri* L. na produção de fitoterápicos ou medicamentos fitoterápicos.

6. REFERÊNCIAS

ALONSO, M. A.; AMARAL, M. C. E. **Estudos taxonômicos e biossistemáticos no complexo *Phyllanthus niruri* L. (Phyllanthaceae)**. UNICAMP. Disponível em: <http://www.prp.rei.unicamp.br/pibic/congressos/xviiicongresso/paineis/082090.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2013.

ANDERSEN, Ø.M., MARKHAM, K.R. **Flavonoids:** chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton: CRC Taylor and Francis, 2006. p. 12.

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 Phyllantus niruri on calcium oxalate crystallization in vitro. **Urological research**, v. 30, n. 6, p. 374–397, 2003.

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. Volumes 1 e 2. Brasília: Anvisa, 2010b.

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. 2010a.

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 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**, v.81, n.4, p.393–397, 1999.

CHANG, C. C.; YANG, M. H.; WEN, H. M.; CHERN, J. C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **J. Food Drug Anal**, v. 10, p. 178-182, 2002.

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.

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. DA S.; SILVA, D. H. S.; PELÍCIA, C. R.; GUIMARÃES, F. M. ; HEIMBERG, 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, p. 573-580, 2009.

COUTO, A. G.; KASSUYA, C. A. L.; CALIXTO, J. B.; PETROVICK, P.R. Antiinflammatory, 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.

CUTRONE, J. Q.; HUANG, S.; TRIMPLE, J.; LI, H.; LIN, P. F.; ALAM, M.; KLOHR, S. E.; KADOW, K. F. Niruriside, a New HIV REV/RRE Binding Inhibitor from *Phyllanthus niruri.* **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 196-199, 1996.

DE SOUZA, T. P.; AMOZA, J. L. G.; PACHECO, R. M.; PETROVICK, P. R. Development of granules from *Phyllanthus niruri* spray-dried extract. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 669-675, 2009.

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 nirui* aerial parts. **Journal Pharm Biomed Anal**, v. 30, n. 2, p. 351-356, 2002.

DE SOUZA, T. P.; PACHECO, R. M.; AMOZA, J. L. G.; PETROVICK, P. R. Eudragit E as Excipient for Production of Granules and Tablets From Phyllanthus niruri L Spray-Dried Extract. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 2, 2007.

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 Medicinais, Condimentares e Aromáticas**, 2006.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 73, n. 2, 1927.

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.

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.

HASSARAJANI, S. A.; MULCHANDANI, N. B. Securinine type of alkaloids from *Phyllanthus niruri*. **Indian Journal of Chemistry**, v. 29B, n. 9, p. 801-803, 1990.

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.

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.

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**, v. 46, p. 71-78, 2011.

MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, 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**, v. 52, p. 487-496, 2007.

MARKOM, M.; HASAN, M.; WAN, DAUD, W. R. W. Pressurized Water Extraction of Hydrolysable Tannins from *Phyllanthus niruri* Linn. **Separation Science and Technology**, v. 45, n. 4; p. 548-553, 2010.

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.

MIGUEL, M. D; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Probe Editorial, p. 116, 1999.

MOREIRA, J.; KLEIN-JÚNIOR, L.; CHECHINEL FILHO, V.; BUZZI, F. C. Antihyperalgesic activity of corilagin, a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.146, p. 318–323, 2013.

MURUGAIYAH, V.; CHAN, K. L. Analysis of lignans from *Phyllanthus niruri* L. in plasma using a simple HPLC method with fluorescence detection and its application in a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 852, p. 138-144, 2007b.

MURUGAIYAH, V.; CHAN, K. L. Antihyperuricemic Lignans from the Leaves of *Phyllanthus niruri.* **Planta Med**, 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, 2007a.

NAKWETI, R. K.; NDIKU, S. L.; DOUMAS, P.; NKUNG, M. H. S.; BAISSAC, Y.; KANYANGA, R. C.; NDOFUNSU, A. D.; OTONO, F. B.; ALLEMAND, C. J. Phytochemical analysis of *Phyllanthus niruri* L. (Phyllanthaceae) extracts collected in four geographical areas in the Democratic Republic of the Congo. **African Journal of Plant Science**, v. 7, n. 1, p. 9-20, 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**, v. 2012.

OGATA, T.; HIGUCHI, H.; MOCHIDA, S.; MATSUMOTO, H.; KATO, A.; ENDO, T.; KAJI, A.; KAJI, H. HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor from *Phyllanthus niruri.* **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 8, n. 11, p. 1937-1944, 1992.

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.

PRASHANTH, K. S.; MANDAHASAN, A.; VIJAYA, K. S.; DHIRENDRA, B. S.; SHREEDHARA, C. S.; MANJUNATH, S. M. Production 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. 752-561, 2012.

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, 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.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da Planta ao medicamento, Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999. p. 635.

SINGH, B.; AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S. An acyclic triterpene from *Phyllanthus niruri*. **Phytochemistry,** v. 28, n. 7, p. 1980-1981, 1989.

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 Republico f 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.

TRIPATHI, A. K.; VERMA, R. K.; GUPTA, A. K.; GUPTA, M. M.; KHANUJA, S. P. S. Quantitative Determination of Phyllanthin and Hypophyllanthin in *Phyllanthus*

Species by High-performance Thin Layer Chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 394-397, 2006.

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.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drugs Analysis. Springer, 1996.

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.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures chemical quality control. **J. Apic. Res.**, v. 37, p. 99−105. 1998.

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.