

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Estudo *in vitro* da ação de metabólitos
secundários do extrato aquoso de *Phyllanthus
niruri* L. e de seus produtos de degradação**

ANA CAROLINA CONCEIÇÃO MONTEIRO DE CASTRO

ORIENTADOR: PROF. DR. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS

Araraquara- SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Estudo *in vitro* da ação de metabólitos
secundários do extrato aquoso de *Phyllanthus
niruri* L. e de seus produtos de degradação**

Ana Carolina Conceição Monteiro de Castro

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

ARARAQUARA - SP

2018

C355e Castro, Ana Carolina Conceição Monteiro de.
Estudo *in vitro* da ação de metabólitos secundários do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* L. e de seus produtos de degradação / Ana Carolina Conceição Monteiro de Castro. – Araraquara: [S.n.], 2018.
103 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: André Gonzaga dos Santos.

1. *Phyllanthus niruri*. 2. Anti-urolitíase. 3. Oxalato de cálcio. 4. Padronização química. 5. Taninos hidrolisáveis. 6. Flavonoides. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

DEDICATÓRIA

À Deus pela minha vida, por todo caminho percorrido que sem Ele nada disso seria possível. Por me dar sabedoria, me dar força as vezes que pensei em desistir.

Ao meu marido pelo companheirismo, apoio, amizade, amor e paciência para que eu pudesse desenvolver o trabalho. Meu maior incentivador.

Ao meu filho Eduardo pelo amor incondicional e paciência com a mamãe. E a minha filha Luísa que está a caminho. Vocês são minha inspiração.

Aos meus pais por todos ensinamentos, pelo amor e generosidade que nunca faltaram. Agradeço especialmente por toda doação, entrega, e disponibilidade em vir me ajudar todas as vezes que precisei para conclusão desse trabalho.

Ao meu irmão e minha família que sempre torceram e oraram por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos por todos ensinamentos, apoio, atenção, interesse pelo trabalho desenvolvido, por trabalhar junto para que mais uma etapa fosse concluída. Obrigada pela amizade em todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti por permitir que eu desenvolvesse o trabalho no Laboratório de Bioquímica. Agradeço pelos ensinamentos, pela confiança a mim investida.

Ao Prof. Dr. Márcio Barros pela sua atenção e disposição em ajudar. Pelas contribuições essenciais para esse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

Ao Grupo Centroflora, pela doação da *Phyllanthus niruri* L., objeto do meu estudo.

Ao Dr. Guilherme Julião Zocolo e Dr. Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro da Embrapa pelas análises realizadas.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera, Profa. Dra. Marcia Aparecida Silva Graminha, Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, Profa. Dra. Rosemeire Pietro, Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini, Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, por permitirem a utilização de seus laboratórios, cederem materiais, equipamentos ou ensinamentos que colaboraram para que este trabalho fosse desenvolvido.

Ao Professor Dr. Cleverton Roberto de Andrade pelo auxílio esclarecedor.

Ao Professor Dr. Alberto J. Cavalheiro pelo auxílio e pelas sugestões pertinentes ao trabalho.

Aos Professores Dr. Danilo Luiz Flumignan e Dr. Aristeu Gomes Tininis do Instituto Federal de São Paulo localizado na cidade de Matão por permitir a utilização de seu laboratório para a realização das análises em HPLC-DAD.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Maria Angelica Lima Barretto, Caio H. Perego, Mateus Scontrì, Tirene Pavanelli, Maria de Fatima Rodrigues, Vinícius Paschoalino Silvas, Rodrigo Sorrechia por estarem sempre prontos a ajudar.

A todos os amigos do Laboratório de Farmacognosia: Isabela J. Moro, Fernando B. Oda, Flávio A. Carvalho, Celia M. C. Martin, Juhan A. S. Pereira, por toda a amizade e ensinamento no desenvolvimento do trabalho.

Em especial a aluna de Pós-doutorado Dra. Renata Pires de Assis por todo ensinamento, ajuda, dedicação. Obrigada pela paciência e amizade!

A todos os amigos que conheci na Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP.

A toda minha família, amigos do Corpo de Cristo, que sempre oraram, me ajudaram de alguma maneira e torceram por mim nesta etapa.

Obrigada a todos!

EPÍGRAFE

"Existem apenas duas maneiras de viver sua vida.

uma é como se nada fosse um milagre, a outra

é como se tudo fosse um milagre."

— ALBERT EINSTEIN

RESUMO

Phyllanthus niruri L. (Euphorbiaceae) é uma espécie vegetal conhecida popularmente no Brasil como quebra-pedra. Muito importante na flora brasileira por ser considerada uma planta medicinal relevante no tratamento de doenças renais e hepáticas. Ensaios farmacológicos *in vitro*, em animais e clínicos demonstraram a ação do seu extrato aquoso na prevenção da formação de cálculos renais de oxalato de cálcio. Apesar desta ação estar bem documentada na literatura e da química de metabolismo secundário da espécie ser bastante conhecida, até o momento não foi possível concluir quais substâncias presentes no extrato aquoso de partes aéreas são responsáveis por tal efeito. Portanto, o objetivo desse trabalho foi identificar as substâncias químicas presentes no extrato aquoso de partes aéreas de *P. niruri* com ação na formação de cristais de oxalato de cálcio, a fim de determinar os marcadores químicos para a droga vegetal, extrato aquoso e fitoterápico à base da espécie. O extrato aquoso foi produzido a partir de 282,21 g da droga vegetal e o rendimento da extração foi de 15,8% (m/m). Foi realizada uma extração em fase sólida (EFS) com o extrato aquoso de partes aéreas de *P. niruri*, resultando em 14 frações, concentradas em taninos e flavonoides. Através das análises por UPLC-QToF-MS/MS e UPLC-PDA foram identificadas 18 substâncias no extrato de partes aéreas de *P. niruri* sendo 4 com o uso de padrões (ácido gálico, corilagina, ácido elágico e quercetina-o-ramnosídeo) e 14 tentativamente com base nos espectros de massas e UV. O extrato aquoso de *P. niruri* sofreu degradação em fluido gástrico simulado (FGS), conforme demonstrado pelas análises por HPLC-PDA, e UPLC-QToF-MS/MS. Os resultados da ação sobre a cristalização de oxalato de cálcio mostram que as frações F4, F5, F8, F9, F10, F11 e F12 se destacaram em relação as outras frações testadas, com diferença significativa no que se refere ao número de cristais e a área média deles. Esses resultados combinados com os resultados obtidos por HPLC-UV apontam para os flavonoides como umas das classes de metabólitos secundários responsáveis por essa ação sobre a cristalização de oxalato de cálcio.

Palavras-chave: *Phyllanthus niruri*, anti-urolitíase, oxalato de cálcio, padronização química, taninos hidrolisáveis, flavonoides.

ABSTRACT

Phyllanthus niruri L. (Euphorbiaceae) is a plant species popularly known in Brazil as a stone breaker. Very important in the Brazilian flora because it is considered a medicinal plant relevant in the treatment of renal and hepatic diseases. In vitro, in animal and clinical pharmacological studies have demonstrated the action of its aqueous extract in preventing the formation of renal calcium oxalate stones. Although this action is well documented in the literature and the secondary metabolism chemistry of the species is well known, to date it has not been possible to conclude which substances present in the aqueous extract of aerial parts are responsible for such an effect. Therefore, the objective of this work was to identify the chemical substances present in the aqueous extract of aerial parts of *P. niruri* with action in the formation of calcium oxalate crystals, in order to determine the chemical markers for the vegetal drug, aqueous extract and phytotherapeutic basis of the species. The aqueous extract was produced from 282.21 g of the plant drug and extraction yield was 15.8% (m/m) taking into account the loss by desiccation of the extract (10.8% m/m). A solid phase extraction (EFS) was performed with the aqueous extract of aerial parts of *P. niruri*, resulting in 14 fractions, concentrated in tannins and flavonoids. In UPLC-QToF-MS / MS and UPLC-PDA analyzes, 18 substances were identified in the extract of aerial parts of *P. niruri*, 4 with the use of standards (gallic acid, corilagine, ellagic acid and quercetin-O-rhamnoside) and 14 tentatively based on mass and UV spectra. The aqueous extract of *P. niruri* underwent degradation in simulated gastric fluid (FGS), as demonstrated by HPLC-PDA, and UPLC-QToF-MS / MS analysis. The results of the action on the crystallization of calcium oxalate show that the fractions F4, F5, F8, F9, F10, F11 and F12 stood out in relation to the other fractions tested, with significant difference in the number of crystals and their average area. These results combined with the results obtained by HPLC-UV point to the flavonoids as one of the classes of secondary metabolites responsible for this action on the crystallization of calcium oxalate.

Key words: *Phyllanthus niruri*, anti-urolithiasis, calcium oxalate, chemical standardization, hydrolysable tannins, flavonoids

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	22
Figura 2. Estrutura da Urolitina A.....	31
Figura 3. Desenho experimental do estudo.....	33
Figura 4. Esquema de obtenção e fracionamento do extrato aquoso de partes aéreas de <i>P. niruri</i>	38
Figura 5. Análise granulométrica da droga vegetal pulverizada.....	44
Figura 6. Cromatoplaça (sílica gel; 0,25 mm) referente à análise de F1 a F14 e do extrato aquoso, da esquerda para direita. Fase móvel: tolueno: acetato de etila: ácido fórmico 2,4:5,6:2,0 (v/v). Revelador: solução metanólica de cloreto férrico 2%.....	47
Figura 7. Cromatoplaça (sílica gel; 0,25 mm) referente à análise de F1 a F14 e do extrato aquoso, da esquerda para direita. Fase móvel: acetato de etila: acetona: ácido acético: água 6:2:1:1 v/v. Revelador: NP/PEG visualizado sob luz UV 365nm	48
Figura 8. Cromatograma do extrato aquoso de <i>P. niruri</i> (5 mg/mL). Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 2 (Shimadzu®). Condições de análise: coluna Ascentis C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); comprimento de onda 267 nm, volume de injeção 25 µL; vazão 1 mL/min; fase móvel solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) (A) e acetonitrila (B). Gradiente: 0-25 min, 13-37% B; 25-30 min, 37-100% B; 30-42 min, 100% B; 42-45 min, 100-13% B; 12 min 13% B.....	49
Figura 9. Cromatograma do padrão ácido gálico (1mg/mL). Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 2 (Shimadzu®). Condições de análise: coluna Ascentis C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); comprimento de onda 267 nm, volume de injeção 25 µL; vazão 1 mL/min; fase móvel solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) (A) e acetonitrila (B). Gradiente: 0-25 min, 13-37% B; 25-30 min, 37-100% B; 30-42 min, 100% B; 42-45 min, 100-13% B; 12 min, 12 min 13% B.....	49
Figura 10. Cromatograma das frações F1 a F14 (3 mg/mL). Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 2 (Shimadzu®). Condições de análise: coluna Ascentis C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); comprimento de onda 267 nm, volume de injeção 25 µL; vazão 1 mL/min; fase móvel solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) (A) e	

acetoneitrila (B). Gradiente: 0-25 min, 13-37% B; 25-30 min, 37-100% B; 30-35 min, 100% B; 35-37 min, 100-13% B; 12 min 13% B.	50
Figura 11. Núcleo fundamental da benzopirona.....	54
Figura 12. Representação das bandas I e II no espectro no UV/Vis.....	55
Figura 13. Núcleo fundamental das (1) flavonas e dos (2) flavonóis.....	56
Figura 14. Cromatograma do extrato aquoso de <i>P. niruri</i> (5 mg/mL) dos produtos de degradação ácida no tempo de 60' da fração aquosa do produto reacional de <i>P. niruri</i> (PR), e da fração metanólica do produto reacional de <i>P. niruri</i> (FmetPR). Análise em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 2 (Shimadzu®).- HPLC-DAD em coluna Ascentis C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); comprimento de onda 267 nm, volume de injeção 20 µL; vazão 1 mL/min; fase móvel solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) (A) e acetoneitrila (B). Gradiente: 0-25 min, 13-37% B; 25-30 min, 37-100% B; 30-42 min, 100% B; 42-45 min, 100-13% B; 12 min 13% B.....	58
Figura 15. Cromatograma da FmetPR (a) e do extrato aquoso de <i>P. niruri</i> (b) e observado no equipamento UPLC-QToF. Coluna Waters® Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 mm, 1,7 µm), temperatura de 40 °C, fases móveis água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetoneitrila com 0,1% de ácido formico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (15 min), vazão de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5 µL.....	60
Figura 16. Principais compostos identificados no extrato aquoso de <i>P. niruri</i> e observados no equipamento UPLC-QToF.....	63
Figura 17. Indução da cristalização de CaOx pela adição de NaOx em urina humana, monitorada pela absorbância (590 nm), na presença de soluções de concentrações crescentes de extrato de <i>P. niruri</i> (0,0625; 0,125; 0,25; 0,50 e 1,00 mg/mL).....	65
Figura 18. Microscopia ótica de cristais de CaOx na ausência e presença extrato de <i>P. niruri</i> em diferentes concentrações (0,0625; 0,125; 0,25, 0,50 mg/mL).....	66
Figura 19. Microscopia ótica de cristais de CaOx na presença extrato de <i>P. niruri</i> em diferentes concentrações (0,50 e 1,0 mg/mL).....	67
Figura 20. Número de cristais de oxalato de cálcio por contagem manual, na ausência e na presença de extrato de <i>P. niruri</i> (0,0625; 0,125; 0,250; 0,500 mg/mL) e frações obtidas a partir do FGS, PR e FmetPR (0,5 e 1,0 mg/mL) em urina humana.....	68

Figura 21. Área média das partículas analisadas por contagem manual, na ausência e presença de extrato de <i>P. niruri</i> (0,0625; 0,125; 0,250; 0,500 mg/mL) e frações obtidas a partir do FGS, PR e FmetPR (0,5 e 1,0 mg/mL) em urina humana.....	70
Figura 22. Número de cristais de oxalato por contagem manual, na ausência e na presença das frações (F1 a F14) do extrato de <i>P. niruri</i> obtidas por EFS, em urina humana.....	73
Figura 23. Número de cristais de oxalato por contagem manual, na ausência e na presença das frações F4 (0,062, 0,125 e 0,5 mg/mL), F5 (0,015 e 0,030 mg/mL), F8, F9 e F10 (0,015 mg/mL) e F12 (0,062, 0,125 e 1,0 mg/mL) do extrato de <i>P. niruri</i> obtidas por EFS, em urina humana e dos padrões ácido gálico (0,5 e 1,0 mg/mL) e ácido elágico (0,5 e 1,0 mg/mL).....	74
Figura 24. Área média das partículas analisadas por contagem manual, na ausência e presença das frações do extrato aquoso de <i>P. niruri</i> (mg/mL) a partir da EFS, em urina humana.....	76
Figura 25. Área média das partículas analisadas por contagem manual, na ausência e na presença das frações F4 (0,062, 0,125 e 0,5 mg/mL), F5 (0,015 e 0,030 mg/mL), F8, F9 e F10 (0,015 mg/mL) e F12 (0,062, 0,125 e 1,0 mg/mL) do extrato de <i>P. niruri</i> obtidas por EFS, em urina humana e dos padrões ácido gálico (0,5 e 1,0 mg/mL) e ácido elágico (0,5 e 1,0 mg/mL).....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metabólitos secundários de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	24
Tabela 2. Dados do fracionamento do extrato aquoso por EFS em pequena escala.....	45
Tabela 3. Dados do fracionamento do extrato aquoso por EFS em maior escala...	46
Tabela 4. Diferenciação das classes de flavonoides baseado em seu espectro no UV/Vis.....	55
Tabela 5. Substâncias tentativamente identificadas no extrato aquoso de partes aéreas de <i>P. niruri</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: acetonitrila

C18: sílica octadecilsilano

CaOx: oxalato de cálcio

CC: cromatografia em coluna

CCD: cromatografia em camada delgada

EFS: extração em fase sólida

EtOH: etanol

F1 a F14: frações 1 a 14 da EFS

PR: fração aquosa do produto reacional

FmetPR: fração metanólica do produto reacional

FE: fase estacionária

FGS: fluido gástrico simulado

FM: fase móvel

HPLC-PDA: high performance liquid chromatograph with photodiode array detector

HPLC-MS/MS: high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry

HPLCprep: preparative high-performance liquid chromatography

HPLC-UV: high-performance liquid chromatography with ultraviolet detector

IV: espectroscopia no infravermelho

MDCK: *Madin-Darby canine kidney cells*

MeOH: metanol

NP/PEG: natural product reagent/ polyethylene glycol reagent

NaOx: oxalato de sódio

PVDF: fluoreto de polivinilideno

RMN: ressonância magnética nuclear

t_R – tempo de retenção

UPLC® – ultra performance liquid chromatography

UPLC-PDA: ultraperformance liquid chromatography with photodiode array detector

UPLC-QToF-MS/MS: ultraperformance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometer detector

X: fator de correção de modo cromatográfico

λ : comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Plantas medicinais	19
2.2 Fitoterápicos: políticas públicas e normatização	20
2.3 <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	21
2.3.1 Composição química de <i>P. niruri</i>	23
2.4 <i>P. niruri</i> e urolitíase	26
2.5 Ensaios <i>in vitro</i> de degradação ácida (FGS).....	29
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo geral	32
ESTRATÉGIA GERAL.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Materiais	34
4.1.1 Equipamentos	34
4.1.2 Materiais	35
4.1.3 Solventes	35
4.2 Coleta e preparo do material vegetal	35
4.3 Análise granulométrica da droga vegetal pulverizada.....	36
4.4 Obtenção do extrato aquoso de partes aéreas	36
4.4.1 Perda por dessecação do extrato aquoso em balança com radiação por infravermelho (INFRATEST).....	37
4.5 Fracionamento do extrato aquoso e purificação de substâncias	37
4.6 Análise do extrato aquoso e de suas frações por cromatografia em camada delgada (CCD)	38
4.7 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV) do extrato aquoso e frações.....	39

4.8 Análise por UPLC-QToF e UPLC-PDA-QDa.....	39
4.9 Degradação ácida do extrato aquoso de <i>P. niruri</i> em fluido gástrico simulado (FGS)	40
4.10 Avaliação da ação do extrato aquoso e das frações de <i>P. niruri</i> sobre a formação de cristais de oxalato de cálcio <i>in vitro</i>	41
4.11 Análise estatística	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Análise da droga vegetal e obtenção do extrato aquoso de <i>P. niruri</i>	43
5.2 Fitoquímica	44
5.2.1 Fracionamento do extrato aquoso	44
5.2.2 Análise do extrato aquoso e de suas frações por CCD	46
5.2.3 Análise por HPLC-UV dos extratos e frações	48
5.3 Degradação ácida do extrato aquoso de <i>P. niruri</i> em fluido gástrico simulado (FGS)	57
5.4 Análise cromatográfica por UPLC-QToF-MS/MS e UPLC-PDA.....	59
5.5 Avaliação da ação do extrato aquoso e das frações de <i>P. niruri</i> sobre a formação de cristais de oxalato de cálcio <i>in vitro</i>	64
6 CONCLUSÃO	79
7 REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICE 1.....	91
APÊNDICE 2.....	92
APÊNDICE 3.....	94
APÊNDICE 4.....	95
APÊNDICE 5.....	96
APÊNDICE 6.....	97
APÊNDICE 7.....	98
APÊNDICE 8.....	99
APÊNDICE 9.....	100

APÊNDICE 10.....	101
------------------	-----

1 INTRODUÇÃO

Dentre as espécies mais empregadas pela medicina tradicional e popular no Brasil para o tratamento e prevenção de urolitíase destaca-se *Phyllanthus niruri* L., que pertence à família Euphorbiaceae. O gênero *Phyllanthus* é predominantemente encontrado em regiões tropicais e subtropicais (CALIXTO et al., 1998; BAGALKOTKAR et al., 2006; KAUR et al., 2017). No Brasil, plantas do gênero *Phyllanthus* são popularmente conhecidas como quebra-pedra, erva-pombinha, arrebenta-pedra, dentre outros nomes, e estão distribuídas em grande parte do território nacional (CALIXTO et al., 1998). Devido à variedade de propriedades terapêuticas benéficas, a partir de 1960, *P. niruri* passou a ser alvo de estudos referentes à fitoquímica e atividade farmacológica (ROW et al., 1964). Metabólitos secundários como lignanas, taninos, cumarinas, terpenos, flavonoides, alcaloides, saponinas e fenilpropanoides foram identificados na espécie, muitos dos quais foram isolados e têm sido investigados como possíveis responsáveis pelas atividades biológicas da planta (DHAR et al., 1968; CALIXTO et al., 1998; BAGALKOTKAR et al., 2006).

Na medicina popular e em estudos acerca das propriedades farmacológicas a planta inteira é utilizada frequentemente. No entanto, na Farmacopeia Brasileira 5ª edição sua monografia descreve o uso de partes aéreas (caule, folha, flor e fruto) como droga vegetal oficial e o ácido gálico como um de seus marcadores químicos (BRASIL, 2010a).

As espécies de quebra-pedra são reconhecidas etnomedicinalmente no mundo há tempos. No Brasil é muito usada no tratamento de cálculo renal, além de ser usada tradicionalmente como analgésico, antitérmico, e no tratamento da diabetes mellitus (KAUR et al., 2017). Na medicina popular, muitos estudos farmacológicos têm sido conduzidos, especialmente para o tratamento da urolitíase. Boim e colaboradores (2010) fizeram uma revisão sobre *P. niruri* como um tratamento alternativo para nefrolitíase, levando em consideração estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos. Eles enfatizaram o que Barros et al. (2003) apontaram em seu trabalho, sobre a interferência do extrato aquoso da espécie na formação do cálculo renal *in vitro*, incluindo a agregação do cristal, além de sua composição e estrutura. Nos estudos clínicos, os efeitos benéficos de *P. niruri* indicaram sua ação na indução do relaxamento uretral, na redução do tempo de residência dos cristais, ou na eliminação dos cálculos renais após litotripsia.

Levando em consideração o cenário apresentado sobre a ampla utilização de espécies de quebra-pedra e sua importante ação farmacológica, no presente trabalho foi realizado o fracionamento do extrato aquoso de *P. niruri* monitorado por ensaios *in vitro*, avaliando a sua ação na formação de cristais de oxalato de cálcio, com o objetivo de identificar os marcadores químicos responsáveis por tal atividade, os marcadores ativos. O nosso grupo de pesquisa iniciou esse trabalho anteriormente identificando algumas classes de substâncias ativas e avaliando a atividade na formação de cristais de oxalato de cálcio, assim como realizou avaliação da variabilidade química que compreendeu a comparação do perfil de metabólitos secundários de extratos de diferentes meses do ano e de diferentes órgãos (caules, flores+frutos, folhas e raízes), porém não chegou à definição de qual(is) substância(s) é(são) responsável(is) por essa atividade e, consequentemente, quais seriam marcadores químicos ativos para o extrato aquoso de *P. niruri* (DA SILVA, 2013; ALBRECHT, 2014).

A relevância de tal estudo se deve a contribuição para a padronização química do extrato aquoso de *P. niruri* baseada nos seus marcadores químicos ativos, com aplicação na produção de um medicamento fitoterápico padronizado com indicação na prevenção da formação de cálculos renais de oxalato de cálcio, ou mesmo para a validação do seu uso na forma de infuso ou decocto (chá medicinal). O estudo do extrato aquoso justifica-se pelo uso tradicional da espécie em forma de chá e pelos dados já publicados na literatura (BOIM et al., 2010).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

Há milhares de anos é sabido que a utilização de plantas medicinais tem contribuído de maneira consistente no suporte terapêutico para a humanidade (CALIXTO, 2000). Porém, com o crescimento da indústria farmacêutica e o desenvolvimento dos medicamentos de origem sintética esse cenário foi sendo modificado ao longo do século XX. Recentemente houve um resgate da utilização de plantas medicinais, oriundo da preferência por medicamentos de origem “natural”, ou de uma alternativa para diminuir os efeitos adversos causados pelos medicamentos sintéticos, e também do relativo menor custo dos fitoterápicos (SOUZA-MOREIRA et al., 2010; BORGES et al., 2010). No final do século XX aumentou a procura pela fitoterapia e estima-se que aproximadamente 25% de todos os medicamentos sejam decorrentes direta ou indiretamente de plantas superiores. Além disso, o uso tradicional das plantas medicinais *in natura* ou processadas de maneira simples (chás, “garrafadas”, banhos, entre outros) tem grande importância na atenção primária à saúde, especialmente em países em desenvolvimento (CALIXTO, 2000).

Newman e Cragg (2016) realizaram um trabalho de revisão, complementando os estudos anteriores já publicados em 1997, 2003, 2007, e 2012, sobre novos agentes terapêuticos lançados no mercado farmacêutico, que incluem fármacos (micromoléculas), extratos vegetais, macromoléculas biológicas e vacinas aprovados mundialmente no período de janeiro de 1981 a dezembro de 2014. Os pesquisadores encontraram um total de 1.211 micromoléculas aprovadas no período, das quais 6% são produtos naturais inalterados, 1% correspondem a extratos vegetais (os quais contém micromoléculas ativas), 26% são fármacos derivados de produtos naturais e 13% são fármacos inspirados em produtos vegetais, totalizando em 46% as micromoléculas oriundas diretamente ou indiretamente de produtos naturais. Nos produtos naturais inalterados (fármacos naturais), predominaram aqueles extraídos de plantas medicinais, os quais podem ser chamados de fitofármacos.

Considerando países como Índia, Etiópia, Tanzânia, Ruanda, Uganda, a medicina tradicional é a primeira escolha no tratamento a saúde, destacando-se as plantas medicinais. Em contrapartida, a medicina alternativa ou complementar

vem se propagando nos países desenvolvidos como Estados Unidos, França, Canadá, Austrália, com destaque para Alemanha, onde 80% da população já aderiu à fitoterapia (ZHANG, 2006).

Diante da história e do cenário mundial, são incontestáveis os benefícios dos fitoterápicos para a população, mas é imprescindível também o estudo das plantas medicinais, para melhor cultivo, extração, isolamento dos compostos e elucidação farmacológica da ação terapêutica, garantindo sua eficácia, segurança e qualidade (SEWELL et al., 2014).

2.2 Fitoterápicos: políticas públicas e normatização

O Brasil apresenta uma grande biodiversidade, principalmente a diversidade vegetal, e esta é considerada fonte de riqueza, o que comprova a importância de fazer uso sustentável dos recursos que o país possui (GOTTLIEB et al., 1998). Um dos motivos para que o número de pesquisas com o foco no desenvolvimento de medicamentos a partir de plantas aumentasse está relacionado às progressivas exigências para a comprovação da eficácia e segurança do produto, desde o plantio até a droga vegetal e o produto final, o fitoterápico. Sendo assim a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Saúde (MS) têm tomado iniciativas para estimular a padronização e a garantia da segurança, eficácia e qualidade de plantas medicinais, drogas vegetais e fitoterápicos. Fato semelhante acontece em países europeus, que são amparados pelas normas da Organização Mundial da Saúde e da European Medicines Agency (EMA) (COUTO et al., 2013a).

Algumas normas foram publicadas no Brasil neste sentido, como o Decreto Federal nº 5.813, de 22 de junho de 2006 que aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e estabeleceu a criação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que dentre seus objetivos pretendeu assegurar o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o crescimento da indústria nacional, através de novas tecnologias e inovações, o desenvolvimento da cadeia produtiva, e garantindo o uso sustentável da biodiversidade (BRASIL, 2006a).

A Portaria MS/GM n. 971/2006 aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema único de Saúde (SUS) que

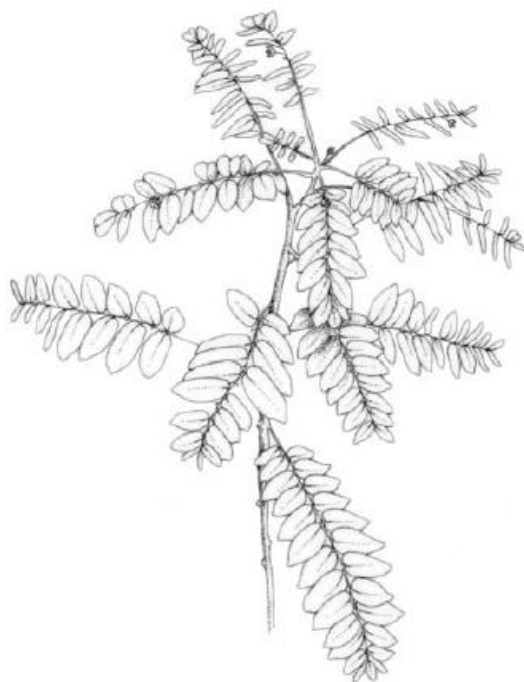
contempla os sistemas médicos complexos e recursos terapêuticos, a medicina tradicional e alternativa. Essa política, que inclui a fitoterapia, contribui para o fortalecimento dos princípios do SUS incentivando a prevenção de complicações e promovendo a saúde (BRASIL, 2006b).

Outra norma importante foi a Portaria MS/GM n. 2.960/2008 que aprovou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e criou o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2008). Em 2014 a ANVISA publicou a RDC n. 26/2014 que normatiza o registro de medicamentos fitoterápicos e também o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, abrangendo testes clínicos, de eficácia e caso o objeto tenha um registro simplificado, o mesmo deverá constar nas listas oficiais da ANVISA (BRASIL, 2014). A divisão dos fitoterápicos em duas categorias está baseada na normatização europeia (EMA) e tem a finalidade de reconhecer o uso tradicional como forma de obter informações que comprovem a efetividade e segurança dos produtos tradicionais fitoterápicos.

2.3 *Phyllanthus niruri* L.

Phyllanthus niruri L. pertence à família Euphorbiaceae, espécie representada na Figura 1. O gênero *Phyllanthus* é predominantemente encontrado em regiões tropicais e subtropicais (CALIXTO et al., 1998; NAENDRA et al., 2012), possuindo mais de 600 espécies, dentre as quais *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 estudadas em suas propriedades fitoquímicas e farmacológicas (BAGALKOTKAR et al., 2006).

Figura 1. *Phyllanthus niruri* L.



Fonte: BRASIL, 2010a.

P. niruri é nativa da Índia, sendo amplamente encontrada na Floresta Amazônica, Bahamas, China, Gana, Nigéria, entre outros locais (KAUR et al., 2017; SAMALI et al., 2012; BAGALKOTKAR et al., 2006). É uma espécie herbácea, atingindo 30 a 60 cm de altura (EMBRAPA, 2006; KAUR et al., 2017), sendo considerada uma planta medicinal, amplamente utilizada na Espanha (*chanca piedra*) e em sistemas de medicina como o Ayurveda da Índia, o Jamu da Indonésia e pela própria Medicina Tradicional Chinesa (BAGALKOTKAR et al., 2006; CAMPOS; SCHOR, 1999).

Na medicina tradicional não só a planta inteira é utilizada, mas também as partes aéreas, sob a forma de chás e o extrato da planta. *P. niruri* tem seu uso tradicional mundial empregado em diversas doenças, como no tratamento de bronquite, distúrbios gastrointestinais e renais, para o tratamento de diabetes, doenças respiratórias entre outras (KAUR et al., 2017).

No Brasil, plantas do gênero *Phyllanthus* são popularmente conhecidas como quebra-pedra, erva-pombinha, arrebenta-pedra, dentre outros nomes (CALIXTO et al., 1998). Estão distribuídas em grande parte do território nacional variando as espécies em suas características morfológicas, tamanho das folhas, aspecto das flores e caules (BRASIL, 2010a). Crescem principalmente nos

períodos de chuva, em qualquer tipo de solo, inclusive é frequente sua presença em terrenos baldios, calçadas e jardins (SILVA; SALES, 2007; TORRES, 2003). As espécies de *P. niruri* e *P. tenellus* Roxb., apresentam características semelhantes, o que dificulta a distinção das espécies, justificando a mesma utilização na medicina popular (BRASIL, 2010a; UNANDER et al., 1990), em tratamentos do sistema urinário, distúrbios renais, hepatite e diabetes (SANTOS et al., 1995; WANG et al., 1995; NAENDRA et al., 2012).

2.3.1 Composição química de *P. niruri*

Em virtude da diversidade de propriedades terapêuticas benéficas, a partir de 1960, *P. niruri* passou a ser alvo de diversos pesquisadores interessados em estudar a fitoquímica e atividade farmacológica (ROW et al., 1964). Os metabólitos secundários como lignanas, taninos, cumarinas, terpenos, flavonoides, alcaloides, saponinas e fenilpropanoides foram encontrados na espécie, muitos dos quais foram isolados e identificados, e têm sido investigados como possíveis responsáveis pelas atividades biológicas da planta (DHAR et al., 1968; CALIXTO et al., 1998; BAGALKOTKAR et al., 2006). A Tabela 1 relaciona os metabólitos secundários isolados/identificados de *P. niruri*.

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

CLASSE	METABÓLITO SECUNDÁRIO	REFERÊNCIAS
ALCALOIDES	4-hidroxisecurinina	1, 2, 3, 4, 5
	4-metoxidiidronorsecurinina	
	4-metoxitetraidrosecurinina	
	alosecurinina	
	diidrosecurinina	
	epibubbialina	
	nirurina	
	norsecurinina	
	securinina	
	securinol A, securinol B	
	tetraidrosecurinina	
CUMARINAS	metilbrevifolincarboxilato	2, 6, 7, 8, 9, 10, 12
FLAVONOIDES	astragalina	2, 3, 13
	canferol-4'-ramnopiranosídeo	
	eridioctiol-7-ramnopiranosídeo	
	fisetina-4-O-glicosídeo	
	flavanona-5-O-rutinosídeo	
	galocatequina	
	epicatequina	
	catequina	
	epigalocatequina	
	epigalocatequina-3-O-galato	
	epicatequina-3-O-galato	
	isoquercitrina	
	niruriflavona	
	nirurina	
	quercetina	
	quercetol	
	quercitrina	
	rutina	
LIGNANAS	cubedina dimetil eter	2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12
	2,3-demetoxisecoisolintetralina	
	3,4-dimetilenodioxibenzil-3',4'-dimetoxibenzilbutirolactona	
	8-(3-metilbuten-2-il)-2-fenil-croma-4-ona	
	2-(4-hidroxifenil)-8-(3-metilbuten-2-il)-croma-4-ona	
	5-demetoxinirantina	
	diacetato de 2,3-demetoxisecoisolintetralina	
	filantina	
	filnirurina	
	filtetralina	
	hidroxinirantina	
	hinoquinona	
	hipofilantina	
	isolintetralina	
	nirantina	
	nirfilina	
	nirtetralina	
	seco-4-hidroxilintetralina	
	trimetil éter de secoisolariciresinol	
	urinatetralina	
MONOTERPENOS	p-cimeno	2
	limoneno	
SAPONINAS (genina)	diosgenina	2
TANINOS	1-O-galoil-6-O-luteoil- α -D-glicose	2, 13, 14, 15, 16
HIDROLISÁVEIS (e substâncias relacionadas)	ácido gálico	
	ácido elágico	
	ácido repandusínico	
	corilagina	
	geraniina	
	nirurisídeo	
	β -glicogalina	

TRITERPENOS	3,7,11,15,19,23-hexametil-2Z,6Z,10Z,14E,18E,22E-tetracosenen-1-ol acetato de lupeol filanteol filantenol filantenona lupeol	2, 3, 17, 18
-------------	--	--------------

REFERÊNCIAS: 1. GUPTA e AHAMED, 1984. 2. BAGALKOTKAR et al, 2006. 3. MARQUES, 2010 4. HASSARAJANI e MULCHANDANI, 1990. 5. MULCHANDANI e HASSARAJANI, 1984. 6. HOUSSAIN et al, 1995. 7. SATYANARAYANA et al., 1988. 8. HUANG et al., 1992. 9. PANCHAGNULA e SOMEPALI, 1991. 10. SHANKIL et al., 2008. 11. SINGH et al., 1989. 12. ANJANEYULU et al., 1973. 13. ISHIMARU et al., 1992. 14. SUBEKI et al., 2005. 15. UENO et al., 1988. 16. QIAN-CUTRONE et al., 1996. 17. BIRKAM et al., 1989. 18. CALIXTO et al, 1998.

Em geral, nos estudos acerca das propriedades farmacológicas da espécie e na medicina popular, a planta inteira é utilizada repetidamente. Todavia, na Farmacopeia Brasileira 5ª edição, sua monografia apresenta o uso de partes aéreas (caule, folha, flor e fruto) como droga vegetal oficial e o ácido gálico como um de seus marcadores químicos (BRASIL, 2010a). Couto et al. (2013b) em seu trabalho avaliaram a atividade anti-inflamatória e antialodínica, além da composição química, dos extratos aquosos das diferentes partes de *P. niruri*: folhas, caules, raízes, folhas + caules e a planta toda. O ácido gálico foi quantificado por HPLC e considerado o marcador químico (marcador analítico) para essas análises. Os pesquisadores constataram que os perfis cromatográficos dos extratos de folhas e caules eram muito semelhantes, assim como a mistura de ambos. No entanto, quando o extrato da folha foi analisado isoladamente do extrato do caule, o ácido gálico apresentou um teor mais elevado, (6,20 µg/mg) do que quando comparado a mistura de folhas e caules (4,80 µg/mg). Outro aspecto relevante é que a diferença na composição química dos extratos analisados refletiu de maneira significativa na ação farmacológica *in vivo*, mais uma vez a ação foi maior para os extratos de folhas e/ou caules. Porém, quando comparado o extrato aquoso de folhas + caules com o extrato aquoso só de folhas houve um prolongamento da ação antialodínica na associação, sugerindo-se a ocorrência de sinergismo, o que confirma a utilização de partes aéreas para iniciar os estudos de fitoterápicos que tenham ação analgésica.

Markom e colaboradores (2007) testaram diferentes solventes e tipos de extração para avaliar taninos hidrolisáveis presentes em *P. niruri*. Avaliaram a eficiência da extração comparando os teores de ácido gálico, ácido elágico e

corilagina, e constataram que para o ácido gálico e o ácido elágico os teores aumentaram na extração com água, e para a corilagina, o teor aumentou na mistura etanol água. Além disso quantificaram esses compostos por cromatografia líquida. Colombo et al. (2009) determinaram corilagina em extratos hidroalcoólicos de *P. niruri* e validaram métodos cromatográficos para o controle de qualidade de extratos produzidos a partir de *P. niruri* e *P. corcovadensis*. Amin et al., (2013) empregaram cromatografia líquida de ultra eficiência ou UPLC acoplada a espectrômetro de massas com analisador por tempo de voo (TOF) para a identificação de ácido 4-*O*-cafeoliquínico e quercetina-3-*O*-ramnosídeo em frações obtidas a partir do extrato etanólico de *P. niruri*. Kaur et al. (2017) apontam em seu trabalho de revisão que os taninos e substâncias relacionadas, ácido gálico, corilagina e ácido elágico como sendo alguns compostos responsáveis pela ação anticancer e antimicrobiana, e o ácido gálico tem sua relatada ação no tratamento de úlceras (MIKI et al., 2001).

2.4 *P. niruri* e urolitíase

Ricardo et al. (2017) desenvolveram um trabalho importante a respeito da medicina tradicional brasileira baseado em relatos do médico polonês Piotr Czerniewicz. Em seu estudo os autores mostraram que recuperar dados etnofarmacológicos é um instrumento precioso no desenvolvimento de medicamentos utilizando plantas brasileiras que podem ser submetidas a ensaios clínicos baseando-se no seu uso tradicional já descrito. Entre as espécies com o uso antigo relatado com ação diurética *P. niruri* foi citada por Von Martius in *Materiae Medicae* (MARTIUS, 1843). Outras 21 espécies foram citadas, dentre elas estão *Tripogandra diuretica*, *Senna occidentalis*, *Boerhavia hirsuta*, *Phyllanthus* spp., *Andropogon bicornis* and *Polygonum* spp., *Acanthospermum australe*, *Chiococca alba* e *Vanilla planifolia* porém apenas *P. niruri* foi submetida a estudos farmacológicos e teve seu uso comprovado para tal finalidade (GIRIBABU et al., 2014), demonstrando a importância dessa planta medicinal no cenário brasileiro, considerando sua tradição de uso.

Bagalkotkar et al. (2006), em seu trabalho de revisão, mostram que os metabólitos secundários de *P. niruri* apresentam diferentes características estruturais relacionadas às diversas atividades farmacológicas. Por exemplo, as

lignanas estão relacionadas a propriedades hepatoprotetoras e antivirais, os terpenos com a ação antitumoral assim como a atividade antimicrobiana, já os alcaloides estão ligados a ação antiespasmódica e por fim os flavonoides apresentaram atividade antioxidante.

As espécies de quebra-pedra são reconhecidas há tempos no tratamento de cálculo renal, além de serem usadas como analgésico, antiespasmódico, hipoglicemiante, no tratamento de cistite, hepatite B, gonorreia, dispepsia entre outras doenças (CALIXTO et al., 1998; LORENZI; MATOS, 2002). Devido à amplitude do uso na medicina popular, muitos estudos farmacológicos foram conduzidos, especialmente para o tratamento da urolitíase, sendo assim é necessário investigar a formação dos cristais de oxalato de cálcio na urina.

É sabido que a urina é um meio complexo contendo minerais, íons que são capazes de interferir na saturação relativa urinária, e isso influencia a formação dos cristais de oxalato de cálcio. Estudos mostraram que a formação desses cristais está intimamente ligada aos níveis de supersaturação do oxalato de cálcio presente na urina. De fato, o mecanismo de interação do oxalato e do cálcio na urina é muito discutido e até mesmo controverso. Pesquisas desde 1972 (NORDIN et al., 1972) direcionam para que o aumento dos níveis de oxalato tenha maior efeito patogênico que a saturação do cálcio urinário. Pak et al. (2004) realizaram em seu estudo uma análise de dados retrospectiva com 667 pacientes que apresentaram pedra nos rins. A relação de saturação relativa foi calculada utilizando um programa chamado Equil 2, e a concentração de cálcio ou de oxalato foi variada. Segundo ele, os resultados mostraram que para os pacientes com propensão a formar cálculos de oxalato de cálcio, tanto o cálcio como o oxalato apresentam um efeito semelhante no que se refere a saturação de oxalato de cálcio na urina. Já experimentos de Daudon et al. (2016) apontam que a concentração molar de oxalato tem uma maior influência na formação dos cristais quando comparados com o cálcio na cristalização de CaOx.

Com relação a *P. niruri*, a literatura científica mostra vários estudos correlacionando o efeito do extrato aquoso sobre os cristais de oxalato de cálcio. Campos e Schor (1999) atestaram que o extrato aquoso de *P. niruri* produziu a inibição da internalização de cristais de oxalato de cálcio (CaOx) pelas células renais caninas (MDCK), sem apresentar citotoxicidade. Freitas et al. (2002) em seu estudo confirmou os resultados de Campos e Schor (1999) e apontou o

impedimento do crescimento de cálculos renais pelo extrato aquoso de *P. niruri* em um modelo de urolitíase induzida por CaOx em ratos. Corroborando com esses resultados, Barros et al. (2003) estudaram o efeito do extrato aquoso de *P. niruri* na cristalização de oxalato de cálcio *in vitro*, em urina de ratos e humanos. Os resultados mostraram um aumento do número de cristais de oxalato de cálcio, porém tais cristais apresentaram tamanho consideravelmente menor, resultado esse desejado visto que a diminuição do tamanho favorece a eliminação dos cristais. Outro resultado importante encontrado pelos autores foi que após 24 h de cristalização, a agregação e o crescimento dos cristais foram inibidos, o que contribuiu para a formação de uma estrutura cristalina dihidratada de CaOx menos aderente, sugerindo que provavelmente o extrato aquoso de *P. niruri* interfere nos estágios iniciais de formação dos cristais. Do mesmo modo, Freitas et al. (2002) em seu estudo mostraram que em um modelo de urolitíase induzido por CaOx em ratos, o crescimento de cálculos renais foi evitado, sendo uma das hipóteses sugeridas pelos autores é que compostos ativos de *P. niruri* podem competir com o cálcio nos sítios de ligação na superfície do cristal, não deixando que haja crescimento.

Nishiura et al. (2004) realizaram estudos clínicos em pacientes com cálculos renais. O estudo consistiu em administrar cápsulas de extrato aquoso liofilizado, durante 3 meses, e foi verificada a ausência de efeitos adversos ou tóxicos e significativa diminuição nos níveis de cálcio urinário.

Murugaiyah e Chan (2006) estudaram o efeito do extrato metanólico das folhas de *P. niruri* no plasma de ratos hiperuricêmicos e verificaram que os níveis de ácido úrico diminuíram, porém em ratos normais não foi observada influência. Além disso, isolaram as lignanas filantina e hipofilantina, e comprovaram também o efeito anti-hiperuricêmico no plasma, porém os mecanismos de ação não foram esclarecidos.

Boim e colaboradores (2010) fizeram uma revisão sobre *P. niruri* no tratamento da nefrolitíase, levando em consideração estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos. Eles enfatizaram o que Barros et al. (2003) apontaram em seu trabalho, sobre a interferência do extrato aquoso da espécie na formação do cálculo renal, incluindo a agregação do cristal, além de sua composição e estrutura. Com base nos estudos clínicos, apontaram também os efeitos benéficos de *P. niruri* para a ação na indução do relaxamento uretral, a diminuição do tempo de residência

dos cristais, e também na excreção dos cálculos renais devido à diminuição do tamanho deles.

2.5 Ensaios *in vitro* de degradação ácida (FGS)

Os ensaios *in vitro* de degradação ácida com o fluido gástrico simulado (FGS) são importantes, pois simulam a digestão que acontece no estômago quando medicamentos e produtos fitoterápicos são administrados oralmente. Essa importância se justifica a partir do desenvolvimento de novos fármacos, em que o estudo de metabolismo *in vitro* se torna imprescindível, pois podem apontar sítios moleculares mais susceptíveis à biotransformação e/ou indicar os principais produtos ou metabólitos formados, além da geração de produtos potencialmente tóxicos ou que apresentem maior ou menor atividade (PEARSON; WIENKERS, 2008).

Esses estudos de produtos de biotransformação ou de metabólitos produzidos a partir da ingestão dos fármacos vêm se destacando nos órgãos de vigilância e regulamentação de medicamentos no mundo e um comitê incluindo algumas multinacionais farmacêuticas que formularam um guia de testes de segurança (BAILLIE, 2002; FDA, 2008; EMA, 2009).

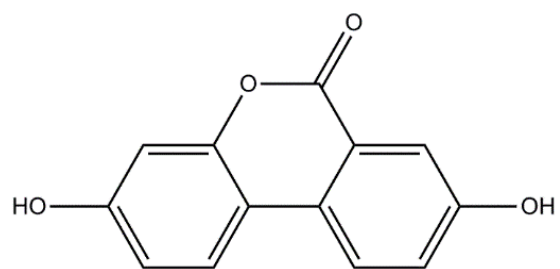
Vermaak et al. (2009) realizaram um estudo com extratos de *Tarchonanthus camphoratus* e *Agathosma betulina*, para investigar o potencial efeito da degradação ácida. Os extratos foram submetidos ao fluido gástrico simulado com ácido trifluoroacético. Os perfis químicos dos extratos e dos mesmos após a degradação ácida foram avaliados através de HPLC-MS, e observaram que após o ensaio com FGS a área de alguns picos diminuiu enquanto a de outros compostos aumentou, indicando degradação. Além disso, os resultados demonstraram diminuição da atividade antimicrobiana do extrato bruto de *T. camphoratus*.

É sabido que estudos *in vitro* nem sempre reproduzem o que ocorre *in vivo*, sendo de grande relevância a investigação da degradação ácida de componentes do chá ou de um fitoterápico à base de *P. niruri* ao entrar em contato com o fluido gástrico. É fundamental a investigação da degradação ácida, pois existem poucos estudos sobre a habilidade do suco gástrico em alterar a estrutura dos flavonoides, como os presentes em *P. niruri* (Tabela 1). A

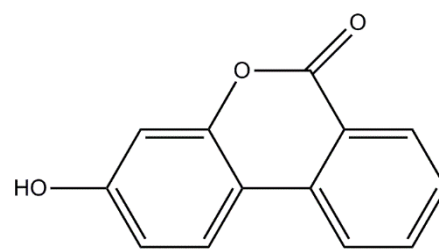
absorção dos flavonoides está intimamente ligada com o tamanho molecular, a configuração da molécula além da sua solubilidade, lipofilicidade e pKa. Na maior parte dos casos, os flavonoides agliconas podem ser facilmente absorvidos pelo intestino delgado, enquanto os glicosídeos são absorvidos no intestino delgado ou são conduzidos até o cólon para serem assimilados, como acontece com os C-glicosídeos. Os flavonoides possuem diferentes açúcares em sua estrutura química, o que é intrinsicamente relacionado a sua biodisponibilidade. Preferencialmente a metabolização acontece no fígado, mas o rim e as paredes intestinais também podem fazer esse metabolismo (KUMAR; PANDEY, 2013; ZUANAZZI, et al. 2017).

Os taninos hidrolisáveis presentes nos alimentos geralmente não são absorvidos pelo intestino a não ser quando ingeridos em altas doses. Uma vez absorvidos, devem estar disponíveis no local desejável para exercer a atividade biológica. Segundo Lipińska et al. (2014), os elagitaninos não sofrem degradação e nem hidrólise no estômago. No intestino delgado, os taninos hidrolisáveis são passíveis de serem degradados por hidrólise química ou enzimática nas várias unidades estruturais que os compõem (KHANBABAEE et al., 2001), produzindo os ácidos gálico, elágico e monossacarídeos (SGARBIERI, 1996). O ácido gálico é comumente absorvido sem modificações em sua estrutura no intestino delgado e após metabolização gera um derivado metoxilado, ácido 4-O-metil gálico (SERRANO et al., 2009). Com relação ao ácido elágico, uma pequena parte é assimilada pelo intestino, sofrendo metabolização e dando origem a produtos metoxilados. O que não for absorvido pelas células intestinais será degradado pelas bactérias presentes no intestino, gerando as urolitinas, que são metabólitos do ácido elágico, dibenzopiranoas hidroxiladas. A urolitina B tem sido usada com marcador por ser um dos principais produtos da degradação dos elagitaninos encontrados no plasma e na urina, e também são investigadas como possíveis responsáveis pela ação biológica dos elagitaninos (MELLO; SANTOS, 2017; SERRANO, et al. 2009).

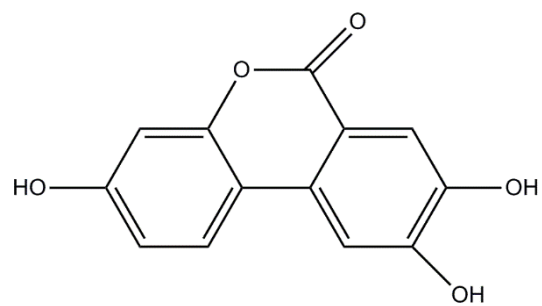
Figura 2. Estrutura das Urolitinas A, B, C e D.



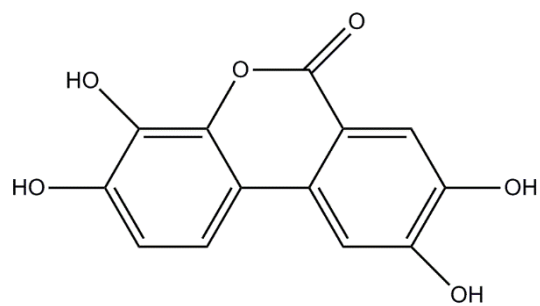
Urolitina A (m/z^- 227)



Urolitina B (m/z^- 211)



Urolitina C (m/z^- 243)



Urolitina D (m/z^- 259)

2 OBJETIVOS

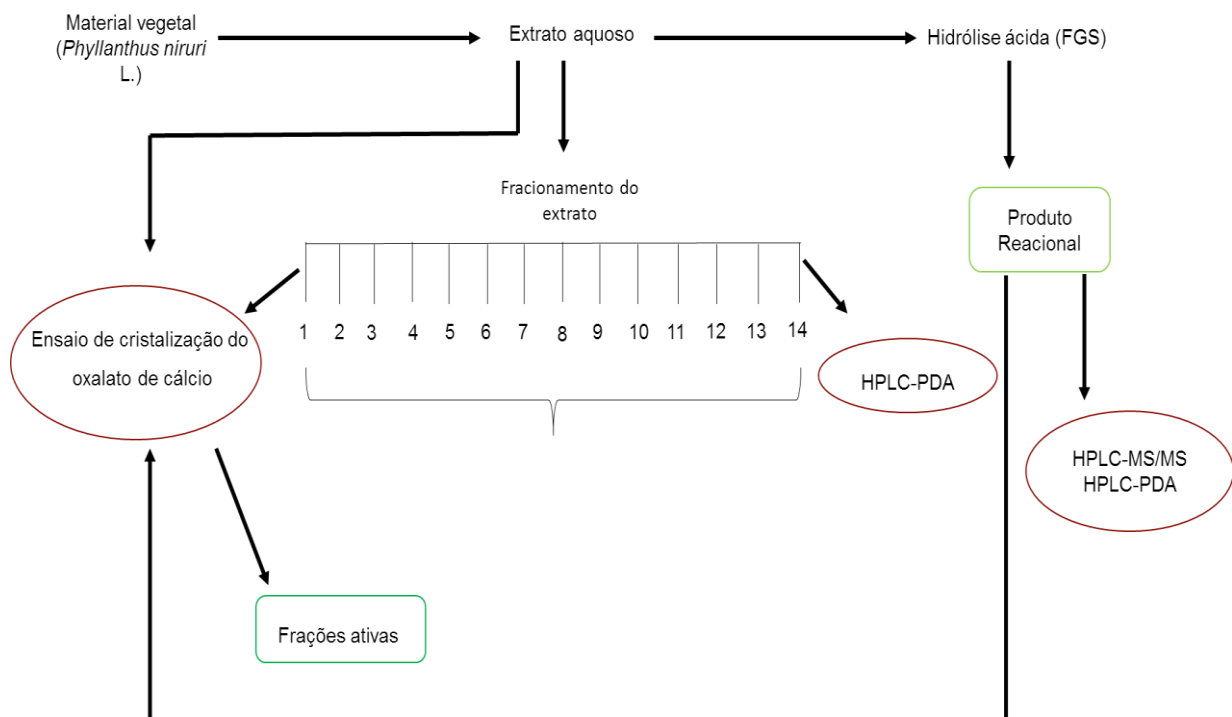
2.1 Objetivo geral

Identificar substâncias presentes no extrato aquoso de partes aéreas de *P. niruri* e seus produtos de degradação ácida com ação na formação de cristais de oxalato de cálcio, determinando assim marcadores químicos ativos para a droga vegetal, extrato aquoso e fitoterápico à base da espécie.

ESTRATÉGIA GERAL

O material vegetal seco e moído (partes aéreas: caule, folha, flor e fruto) foi submetido à extração com água, 1:20 (m/v). O extrato aquoso seco (liofilizado) foi conduzido ao fracionamento cromatográfico e, em seguida, as frações obtidas foram analisadas em HPLC-PDA.

O extrato e as frações foram submetidos ao ensaio de cristalização de oxalato de cálcio *in vitro*, seguindo a estratégia do fracionamento monitorado, que conduz por seleção de frações ativas aos metabólitos secundários ativos. O extrato foi submetido à hidrólise ácida em meio de fluido gástrico simulado (FGS) sem enzimas para a avaliação dos produtos de degradação obtidos no ensaio de cristalização do oxalato de cálcio *in vitro*. O extrato e os produtos de degradação resultantes do FGS foram identificados através de análises por HPLC-MS/MS e HPLC-PDA (Figura 3).

Figura 3. Desenho experimental do estudo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Equipamentos

- Sonicador Ultra Sonic Cleaner (Unique®), modelo USC-2800; frequência: 40KHz .;
- Balança analítica: Marte®, modelo AY220 (Max 220 g. min 0,01 g; d = 0,0001 g);
- Balança com radiação infravermelha: GEHAKA®, modelo IV 2000;
- High Performance Liquid Chromatograph 1 (Perkin Elmer Flexar®, modo analítico e semipreparativo): bomba quaternária, desgaseificador, injetor manual Rheodyne® de 6 pórticos com alça de amostragem de 20 e 1.000 µL, detector UV/VIS de comprimento de onda variável, detector PDA, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Chromera® 4.1.0.6386;
- High Performance Liquid Chromatograph 2 (Shimadzu®, modo analítico e semipreparativo): bomba binária LC-6AD, desgaseificador, injetor automático Rheodyne de 6 pórticos com alça de amostragem de 2.000 µL, detector UV/VIS de comprimento de onda variável SPD-M20A, módulo gerenciador do sistema CBM-20A, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados LC solution® versão 1.25 SP4;
- Ultra High Performance Liquid Chromatograph (Waters®): bomba quaternária, desgaseificador, injetor manual Rheodyne de 6 pórticos com alça de amostragem de 10 µL, detector PDA, detector do tipo espectrômetro de massas com fonte de ionização ESI e analisador quadrupolo / tempo de voo (QtoF, Waters®), programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Acquity® UPLC H-Class.
- Leitor de microplacas (espectrofotômetro): BioTek® Epoch;
- Estufa de secagem com circulação de ar: Fanem®, modelo 315 SE;
- Liofilizador Edwards E-C Micromodulyo®;
- Moinho de facas: Tecnal®, modelo TE 148;
- Homogeneizador de soluções: Agitador Phoenix, modelo AP 22;
- Tamisador vibratório: Produtest®;

- Tamises: Telatest®;
- Placa Aquecedora com agitação magnética: IKA® Modelo C-MAG HS7, com controlador de temperatura ETS-D5;
- Peagâmetro: GeHaka PG 1800;
- Ultrassom: Unique®, modelo USC – 2800, frequência 40 KHz.
- Microscópio óptico: Leica DMLB

4.1.2 Materiais

- Cartucho para extração em fase sólida: Agilent SampliQ® C18 (15 x 10 mm; 55 µm);
- Placa de 96 poços para cultura celular (TPP): Kasvi;
- Coluna cromatográfica de bancada: colunas de vidro com diâmetro interno de 1,0 e 2,5 cm; equipadas com torneira;
- Coluna cromatográfica para HPLC: Ascentis® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm);
- Cromatografia em camada delgada: placas de alumínio cobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich®, 20 x 20 cm, 15-40 µm, 0,25 mm);

Fases estacionárias utilizadas em EFS e CC:

- Sílica gel: Sigma-Aldrich®, 63-200 µm; 60 Å; Sigma-Aldrich®, 40-63µm.
- Sílica C18: Sigma-Aldrich® 40-60 µm;

4.1.3 Solventes

- Água deionizada: obtida em sistema purificador de água GEHAKA® modelo DG 300;
- Água ultrapura: obtida em ultrapurificador Merck Millipore® modelo Direct® – Q 3 UV;
- Solventes grau P.A.: acetato de etila, etanol, metanol Qhemis® e Synth®.
- Solventes grau cromatográfico: etanol, metanol, acetonitrila e ácido acético glacial J.T. Baker®.

4.2 Coleta e preparo do material vegetal

O material vegetal (caule, folha, flor e fruto) foi doado pela empresa Anidro Extrações do Brasil Ltda., Grupo Centroflora-SP, empresa do ramo

farmoquímico, localizada em Botucatu-SP. As mudas foram feitas na empresa Anidro, e cultivadas em Cardópolis-PR (23°25'30" Sul, 49°43'15" Oeste). O número de cadastro de acesso ao patrimônio genético no SisGen é A7AFB93/CNPJ 48.031.918/0001-24. As plantas foram secas em secador tipo "panelão" durante cerca de 8 h à temperatura de 60 a 80° C. O material vegetal obtido, ao chegar no laboratório de farmacognosia da UNESP, foi moído em moinho de facas originando a droga vegetal pulverizada.

4.3 Análise granulométrica da droga vegetal pulverizada

A análise granulométrica foi realizada segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (BRASIL, 2010a). 25 g da droga vegetal pulverizada foram pesados e transferidos para o tamis superior, distribuindo-se uniformemente o pó. Para a análise, foi utilizado um conjunto de 5 tamises com abertura de malhas correspondentes a 1,00 mm, 710, 500, 212 e 180 µm e posicionados na sequência da menor abertura a maior sobre o coletor. Em seguida foram agitados pelo equipamento vibratório (Produtest®) durante 60 min com agitação (nº 7). Ao final do processo, o pó retido em cada tamis foi pesado. O percentual retido foi calculado para cada tamis, conforme a equação 1.

$$\% \text{ Retida pelo tamis} = (P_1/P_2) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

P_1 = Peso da amostra retida em cada tamis (em gramas)

P_2 = Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas)

100 = Fator de porcentagem

4.4 Obtenção do extrato aquoso de partes aéreas

A obtenção do extrato aquoso de partes aéreas de *P. niruri* (caule, folha, flor e fruto) foi adaptada do método proposto por Barros et al. (2003). A droga vegetal pulverizada foi submetida à extração com água deionizada a 70° C por 90 min, com renovação do líquido extrator a cada 30 min, sob agitação ocasional. A relação total droga vegetal: solvente foi de 1:15 (m/v) (massa: 282 g; volume

total: 4.230 mL). Após cada etapa a solução extrativa obtida foi filtrada. As três soluções extrativas foram reunidas e a solução resultante foi congelada e liofilizada (Edwards E-C Micromodulyo®), obtendo-se o extrato seco. O extrato aquoso seco foi armazenado em frasco de vidro, vedado e mantido sob refrigeração.

4.4.1 Perda por dessecação do extrato aquoso em balança com radiação por infravermelho (INFRATEST)

No método por radiação infravermelha, cerca de 1,5 g do extrato foi pesado e submetido a aquecimento (105° C) por radiação por infravermelho durante 2 min em balança GEHAKA®, modelo IV 2000. Os resultados foram expressos através da relação entre a massa inicial e final do material vegetal, em porcentagem (% m/m) (BRASIL, 2010a).

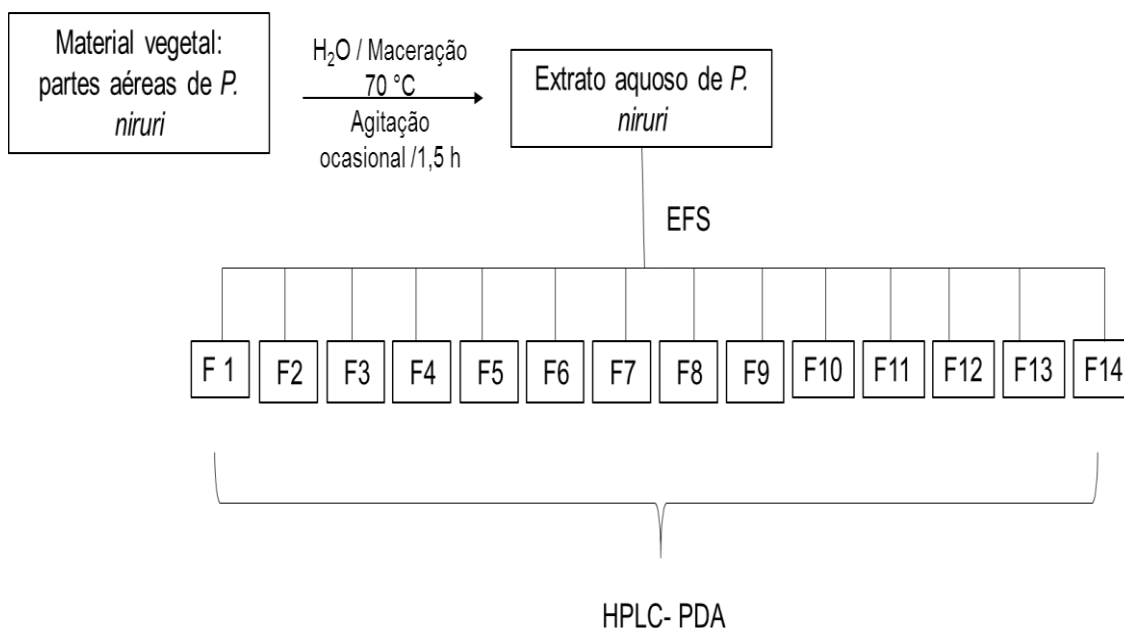
4.5 Fracionamento do extrato aquoso e purificação de substâncias

Inicialmente as condições de separação cromatográfica foram otimizadas em pequena escala. O extrato aquoso seco (500 mg) foi fracionado em 14 frações por extração em fase sólida (EFS) utilizando coluna de vidro com 1,0 cm de diâmetro interno e preenchida com 15 cm de altura de sílica C18 (40-63 µm), 14,5 g em massa. A eluição ($V_{\text{elute}} = 840$ mL) foi executada sob pressão com o seguinte gradiente: 1. Água (frações 1 e 2); 2. Etanol: água 5:95 (3 e 4); 3. 10:95 (5 e 6); 4. 15:85 (7 e 8); 5. 25:75 (9 e 10); 6. 1:1 (11 e 12); 7. EtOH (13 e 14). O volume de coleta das frações foi de 30 mL. As frações obtidas foram secas sob fluxo de ar em capela e analisadas por CCD; algumas frações foram selecionadas e analisadas também por HPLC-UV.

O fracionamento em maior escala (Figura 4) foi realizado por extração em fase sólida (EFS) com 10 g de extrato aquoso seco em coluna de vidro de 2,5 cm de diâmetro interno e 10 cm de altura de sílica C18 (40-63 µm), 98,5 g em massa. A eluição ($V_{\text{elute}} = 2800$ mL) foi realizada sob vácuo e os eluentes utilizados e a coleta de frações seguiram o realizado no fracionamento em pequena escala. O volume de coleta das frações foi de 200 mL. As frações

obtidas foram secas sob fluxo de ar em capela, evaporador rotativo seguido de liofilização e analisadas por HPLC-PDA.

Figura 4. Esquema de obtenção e fracionamento do extrato aquoso de partes aéreas de *P. niruri*.



4.6 Análise do extrato aquoso e de suas frações por cromatografia em camada delgada (CCD)

O extrato e as frações foram analisados por CCD, utilizando placas de alumínio cobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich®, 20 x 20 x 0,25 mm). A partir de dados da literatura as fases móveis foram selecionadas, levando em consideração a classe de metabólitos de interesse. Para análise de flavonoides foi utilizada como fase móvel acetato de etila: acetona: ácido acético: água (6:2:1:1 v/v) (LIONÇO et al., 2001). Para os taninos, tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (2,4:5,6:2,0 v/v) (FALKENBERG et al., 2004).

Como reveladores foram utilizados NP/PEG (*Natural Products Reagent*/polietilenoglicol) para flavonoides. A visualização foi sob luz UV (365 nm). Para o NP/PEG foram feitas soluções A e B, solução A - metanólica a 1% do éster do ácido β -etilamino difenilbórico e uma solução B - etanólica a 5% de

polietilenoglicol 4000. As soluções A e B foram misturadas na proporção 1:1 (v/v). Para taninos foi empregada uma solução de cloreto férrico 2% em metanol.

4.7 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV) do extrato aquoso e frações

O extrato aquoso e suas frações, foram solubilizados em metanol: água (40:60 v/v; 5,0 mg/mL para extratos e 3,0 mg/mL para frações) e filtrados em membrana (0,22 µm, PVDF). As análises foram desenvolvidas no cromatógrafo líquido Perkin Elmer Flexar® em modo reverso, adaptando o método de Colombo et al. (2009). Condições de análise: coluna Ascentis® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); $\lambda = 267$ nm; $V_{\text{injeção}} = 20$ µL; vazão = 1,0 mL/min. Fase móvel composta por solução aquosa de ácido acético 1% (A) e acetonitrila (B) - gradiente: 0-25 min, 13-37% B; 25-30 min, 37-100% B; 30-35 min, 100% B; 35-37 min, 100-13% B; 13% B 12 min. Uma solução 1,0 mg/mL de ácido gálico (Sigma Aldrich®; pureza $\geq 98\%$) foi empregada com finalidade de identificação (ALBRECHT, 2014).

4.8 Análise por UPLC-QToF e UPLC-PDA-QDa

As análises utilizando UPLC-QToF-MS/MS foram realizadas na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA pelo analista Dr. Paulo Riceli V. Ribeiro, sob a responsabilidade do Pesquisador em Química de Produtos Naturais Dr. Guilherme Julião Zocolo. As análises do extrato aquoso de partes aéreas de *P. niruri* e da fração metanólica do produto reacional do FGS (FmetPR) (item 4.6) foram realizadas em um sistema Acquity UPLC (Waters®), acoplado a um módulo Quadrupolo / Tempo de Voo (QToF, Waters®) e em um sistema UPLC (Waters®), acoplado a um detector de arranjo de diodos seguido por um módulo de massas tipo Quadrupolo pertencentes a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA (Fortaleza-CE). As análises foram realizadas em uma coluna C18 Waters® Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 mm, 1,7 µm), temperatura de 40 °C, $V_{\text{injeção}} = 5$ µL para UPLC-QToF e 2 µL para UPLC-QDa, vazão = 0,4 mL/min. Fase móvel composta por solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B) - gradiente: 0-15 min, 2-95% B. A ionização foi realizada com fonte de ionização por electrospray

(modo negativo - ESI), adquirida na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte ajustada em 120 °C, temperatura de dessolvatação de 350 °C, vazão de gás de dessolvatação de 500 L · h⁻¹, voltagem do cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. O modo de aquisição foi o MSE. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation). Todas as amostras foram injetadas em triplicata.

4.9 Degradação ácida do extrato aquoso de *P. niruri* em fluido gástrico simulado (FGS)

O extrato aquoso de *P. niruri* foi submetido ao ensaio de fluido gástrico simulado (FGS) sem enzimas, de acordo com a United States Pharmacopeia (2015): 200 mg de cloreto de sódio foram solubilizados em 10 mL de água deionizada; em seguida, 0,7 mL de ácido clorídrico concentrado foram adicionados à solução salina; o volume foi completado para 100 mL e o pH ajustado para 1,2 ± 0,1 com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. O extrato aquoso foi solubilizado em água e incubado nesse meio a 37° C na concentração final de 5 mg/mL no FGS durante 15 min, 30 min, 60 min e 90 min sob agitação.

No fim do processo de degradação (15, 30, 60 e 90 min), o pH foi ajustado para 7,0 (hidróxido de sódio), para cada amostra coletada, e o meio reacional (FGS + produto) foi submetido a uma filtração em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®), o filtro foi “lavado” com 10 mL de metanol grau HPLC, para verificar se não havia restado nenhum composto de interesse. Em seguida, as soluções metanólicas referentes a cada tempo de coleta, foram secas sob fluxo de ar em capela, e solubilizadas em MeOH:H₂O 60:40 (v/v). O filtrado do produto reacional (PR) foi analisado por HPLC-PDA (Condições de análise estão no item 4.5.3), assim como a solução metanólica obtida na “lavagem” do filtro.

Alternativamente, foi realizada uma avaliação com o produto reacional empregando pré-tratamento através de extração em fase sólida (EFS) com sílica de fase reversa (Phenomenex® Strata C18-E; 15 x 10 mm; 55 µm), com a finalidade de eliminar os interferentes (sais) dos produtos de interesse (metabólitos secundários e seus produtos de degradação). A coluna foi condicionada com 5 mL de metanol, seguidos de 8 mL de água. A amostra foi aplicada (alíquota de 10 mL de meio reacional: FGS + produto) e eluída com 8

mL de água e, posteriormente, com 8 mL de metanol. Os sais foram eluídos através da “lavagem” com água da fase estacionária, que foi recolhida e analisada, assim como os compostos de interesse retidos pela fase estacionária que foram eluídos com 8 mL de metanol. O PR e a fração metanólica do produto reacional (FmetPR) foram analisadas por HPLC-PDA (Condições de análise estão no item 4.5.3). e a FmetPR foi também analisada por UPLC-QToF-MS/MS (Condições de análise estão no item 4.8).

4.10 Avaliação da ação do extrato aquoso e das frações de *P. niruri* sobre a formação de cristais de oxalato de cálcio *in vitro*

Os experimentos foram realizados de acordo com Barros et al. (2003), com modificações. O ensaio baseia-se na indução da cristalização de oxalato de cálcio (CaOx) com adição de 40 µL de solução de oxalato de sódio (NaOx) 0,1 M para cada 1 mL de urina humana, a cada 30 min durante um período de 90 min (0, 30, 60 e 90 min), à 37° C, sob agitação constante.

Para esse ensaio foi preparado um *pool* de urina humana de seis indivíduos com propensão ao desenvolvimento de cálculo renal ou que já possuíam litíase renal. A urina foi centrifugada a 2000 rpm durante 8 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um béquer e o pH foi ajustado para 6,0 (NaOH 1 M ou HCl 1 M). O *pool* de urina foi dividido em alíquotas de 10 mL em tubos Falcon. Uma alíquota foi usada como controle (cristalização sem adição de extrato, frações de *P. niruri*, ou padrões) e outra alíquota como branco (adição de 40 µL/mL de água ao invés de solução de NaOx e sem adição de amostra), para verificar que a urina não tinha cristais de oxalato de cálcio. Nas outras alíquotas de 10 mL do *pool* de urina, foram adicionadas soluções do extrato de *P. niruri* com diferentes concentrações (0,0625; 0,125; 0,250; 0,500; 1,000 mg/mL), soluções das frações F1 a F14 em diferentes concentrações (0,015 a 1,0 mg/mL), a fração aquosa do produto reacional (PR) do FGS e a fração metanólica do produto reacional (FmetPR) do FGS nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL, além dos padrões ácido gálico e ácido elágico nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL. O extrato ou frações foram adicionados 30 min antes da indução da precipitação.

Após 90 min, foi retirada uma alíquota de 10 μL de cada tubo e foi realizada a análise em microscópio óptico Leica DMLB e a captura das imagens no software AxioVision Release 4.8.2. A contagem foi realizada manualmente e utilizando câmara de Neubauer e o cálculo da área média dos cristais de CaOx foi mensurada com o auxílio do processador de imagens, Image J. Os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Também foi realizada a análise semiquantitativa do número de cristais que é estimada pela determinação da turbidez do meio reacional comparado nos tempos 0 e 90 min. Após a cristalização (90 min), alíquotas de 100 μL foram colocadas em placas de 96 poços e a absorbância foi determinada em 590 nm. É possível observar turbidez na urina em que foi adicionado o oxalato de sódio, no tempo 0 da reação, o que indica o início do processo de cristalização.

4.11 Análise estatística

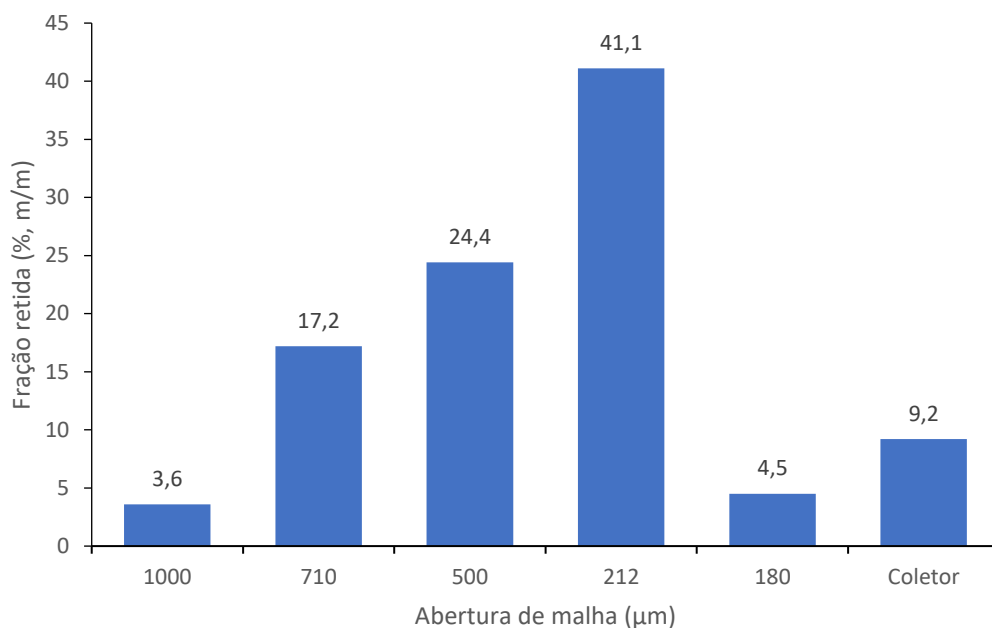
A análise estatística e a elaboração das figuras foram realizadas utilizando os programas Excel e GraphPad Prism® versão 5. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. A análise dos dados foi realizada por análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Newman-keuls. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da droga vegetal e obtenção do extrato aquoso de *P. niruri*

A droga vegetal rasurada constituída de partes aéreas de *P. niruri*, oriunda da empresa Centroflora, foi doada acompanhada de um laudo de controle de qualidade com os resultados de ensaios de pureza. Os resultados apresentados foram relativos aos teores (m/m) de umidade, de cinzas totais e de cinzas insolúveis em ácido, respectivamente 9,2% (máx. 14%), 6,7% (máx. 12%) e 0,3% (máx. 3%). Todos os resultados atenderam as especificações da Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (BRASIL, 2010a).

Os resultados da distribuição granulométrica estão apresentados na Figura 5, a maior porcentagem 41,1% do pó apresentou tamanho de partícula acima de 212 µm. O material vegetal estudado é misto em termos de órgãos o que pode ter produzido a distribuição granulométrica em faixa mais ampla, já que os caules são mais duros do que o resto do material (folhas, flores e frutos). Markom et al (2007) apontou em seu trabalho que 43% apresentou tamanho de partícula entre 600 µm e 1,18 mm para a análise da granulometria de caule e partes aéreas de *P. niruri*. A droga vegetal não foi classificada segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (BRASIL, 2010a) por conta da diferença entre as aberturas dos tamises utilizados e o descrito pela Farmacopeia Brasileira 5ª ed.

Figura 5. Análise granulométrica da droga vegetal pulverizada.

Foram realizadas 3 extrações com o total de 282,21 g da droga vegetal pulverizada, que foram extraídas com 4230 mL de água deionizada, resultando em 50,11 g de extrato seco, com umidade de 10,8 % e rendimento de 15,8% (m/m), calculado levando em consideração a perda por dessecação do extrato.

O rendimento encontrado foi superior ao obtido por Albrecht (2014) que levou em consideração o cálculo tanto em base seca para a droga vegetal como para o extrato e obteve 10,9% (m/m) para o extrato aquoso de *P. niruri*. Sabir e Rocha (2008) obtiveram rendimento de 21-23% (m/m) com extrato aquoso de *P. niruri*, com proporção de droga vegetal:solvente 1:10 (m/v). Já Markom et al. (2007) em seu trabalho obtiveram 8,5% (m/m) de rendimento na extração de caules e partes aéreas de *P. niruri*.

5.2 Fitoquímica

5.2.1 Fracionamento do extrato aquoso

O método de fracionamento por EFS em modo reverso foi adaptado de Colombo et al. (2009) com substituição do metanol por etanol na fase móvel, solvente melhor classificado em termos de Química Verde (TOBISZEWSKI et

al., 2017). A tabela 2 mostra os dados das frações obtidas. Os rendimentos foram calculados em relação a 0,5 g de extrato utilizado.

Tabela 2. Dados do fracionamento do extrato aquoso por EFS em pequena escala.

Fração (F)	Eluente (v/v)	Massa (g)	Rendimento (% m/m)
F1	H ₂ O	0,130	26,0
F2	H ₂ O	0,166	33,2
F3	EtOH: H ₂ O 5:95	0,028	5,6
F4	EtOH: H ₂ O 5:95	0,025	5,0
F5	EtOH: H ₂ O 10:90	0,026	5,2
F6	EtOH: H ₂ O 10:90	0,021	4,2
F7	EtOH: H ₂ O 15:85	0,018	3,6
F8	EtOH: H ₂ O 15:85	0,009	1,8
F9	EtOH: H ₂ O 25:75	0,017	3,4
F10	EtOH: H ₂ O 25:75	0,010	2,0
F11	EtOH: H ₂ O 50:50	0,011	2,2
F12	EtOH: H ₂ O 50:50	0,006	1,2
F13	EtOH	0,003	0,6
F14	EtOH	0,003	0,6
Total das frações		0,473	94,6

As frações F1 e 2 eluídas com água, apresentaram os maiores rendimentos (m/m), 26,0 e 33,2% respectivamente. O rendimento total foi de 94,6 % (m/m). O perfil cromatográfico das frações EFS foi avaliado por CCD para taninos e flavonoides.

Após a avaliação da separação em pequena escala, fizemos o escalonamento das condições cromatográficas e prosseguimos para EFS em maior escala (Tabela 3) utilizando 10 g de extrato seco. O rendimento total foi de 92,2% (m/m). Como aconteceu no fracionamento em pequena escala as frações 1 e 2 que foram eluídas com água apresentaram maior rendimento (m/m), 14,3% e 31,7% respectivamente. Seguida pelas frações 3 e 4 que eluíram com EtOH: H₂O 5:95 e obtiveram rendimento de 5,3%. Podemos destacar também a fração 8 que apresentou rendimento de 12,9 % e eluiu com EtOH: H₂O 15:85.

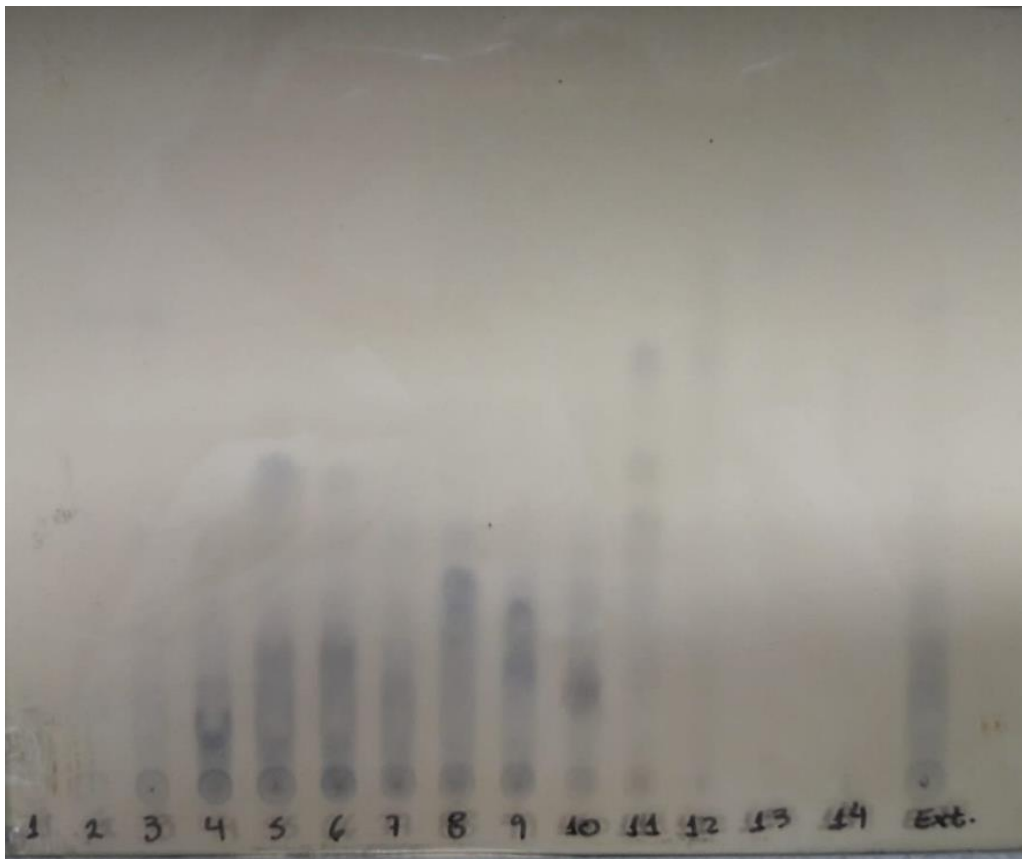
Tabela 3. Dados do fracionamento do extrato aquoso por EFS em maior escala.

Fração (F)	Eluente (v/v)	Massa (g)	Rendimento (% m/m)
F1	H ₂ O	1,432	14,3
F2	H ₂ O	3,168	31,7
F3	EtOH: H ₂ O 5:95	0,526	5,3
F4	EtOH: H ₂ O 5:95	0,529	5,3
F5	EtOH: H ₂ O 10:90	0,311	3,1
F6	EtOH: H ₂ O 10:90	0,549	5,5
F7	EtOH: H ₂ O 15:85	0,297	3,0
F8	EtOH: H ₂ O 15:85	1,292	12,9
F9	EtOH: H ₂ O 25:75	0,285	2,8
F10	EtOH: H ₂ O 25:75	0,361	3,6
F11	EtOH: H ₂ O 50:50	0,307	3,1
F12	EtOH: H ₂ O 50:50	0,034	0,3
F13	EtOH	0,086	0,9
F14	EtOH	0,038	0,4
Total das frações		9,215	92,2

5.2.2 Análise do extrato aquoso e de suas frações por CCD

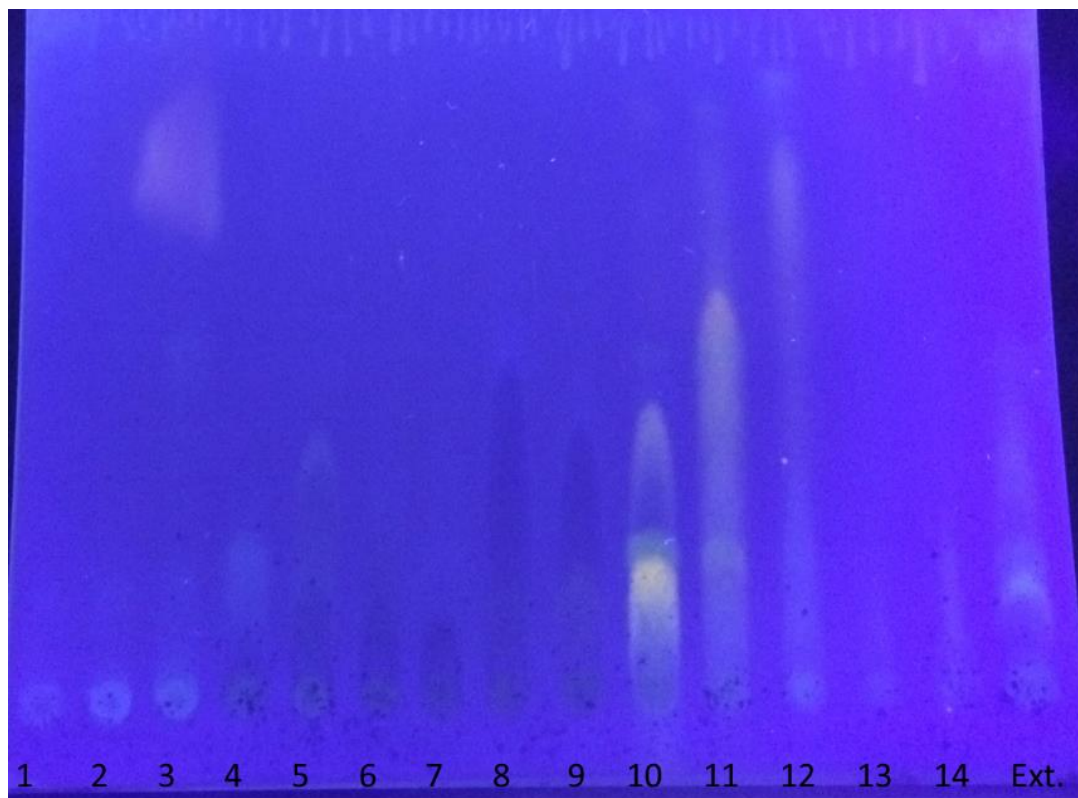
As frações e o extrato aquoso foram analisados por CCD em condições descritas para flavonoides e taninos. Na condição cromatográfica para taninos foram observadas bandas (Figura 6) com coloração azul típica após revelação com solução de cloreto férrico para taninos hidrolisáveis e derivados do ácido gálico nas frações F4 a F10 e no extrato, sendo mais intensas nas frações F5 e F6 e F8 a F9.

Figura 6. Cromatoplaca (sílica gel; 0,25 mm) referente à análise de F1 a F14 e do extrato aquoso, da esquerda para direita. Fase móvel: tolueno: acetato de etila: ácido fórmico 2,4:5,6:2,0 (v/v). Revelador: solução metanólica de cloreto férrico 2%.



Para a classe de flavonoides foi verificada a presença de bandas fluorescentes após revelação com NP/PEG sugestivas da presença destes compostos nas frações F4 e F5 e com maior intensidade nas frações F10 a F12 e no extrato (Figura 7). Desta forma, as análises por CCD sugerem uma maior concentração de taninos hidrolisáveis e substâncias relacionadas em F4 a F10 e de flavonoides em F10 a F12, resultado que está de acordo com o objetivo de separar tais classes de substâncias em diferentes frações. As bandas do extrato tanto na condição para flavonoides quanto para taninos apareceram com menor intensidade porque ele contém maior número de substâncias do que as frações.

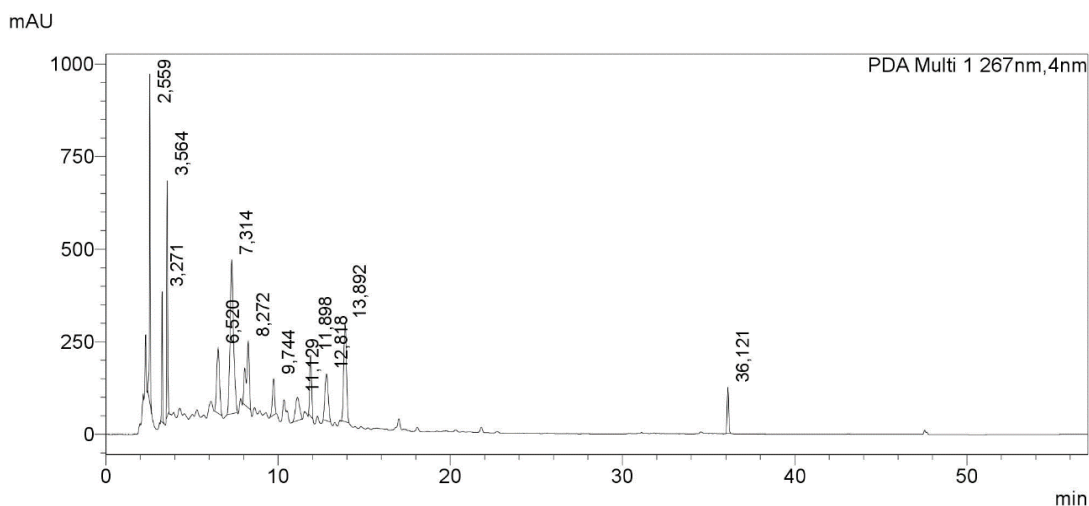
Figura 7. Cromatoplaca (sílica gel; 0,25 mm) referente à análise de F1 a F14 e do extrato aquoso, da esquerda para direita. Fase móvel: acetato de etila: acetona: ácido acético: água 6:2:1:1 v/v. Revelador: NP/PEG visualizado sob luz UV 365 nm.



5.2.3 Análise por HPLC-UV dos extratos e frações

O extrato aquoso (Figura 8), o padrão de ácido gálico (Figura 9), e as frações do extrato (Figura 10), foram submetidos à análise por HPLC-PDA utilizando o método adaptado de Colombo et al. (2009), para se obter seus perfis cromatográficos, o espectro no UV dos picos, a fim de compará-los quanto a sua complexidade em termos de tempos de retenção dos picos e componentes majoritários (maior área dos picos), além de verificar a eficiência da EFS. A adição de ácido acético (1%) no solvente A, fez com que reduzisse o pH da fase móvel, aumentando a retenção das substâncias e a resolução dos picos cromatográficos (controle de ionização dos compostos fenólicos).

Figura 8. Cromatograma do extrato aquoso de *P. niruri* (5 mg/mL). Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 2 (Shimadzu®). Condições de análise: coluna Ascentis C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); comprimento de onda 267 nm, volume de injeção 25 µL; vazão 1 mL/min; fase móvel solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) (A) e acetonitrila (B). Gradiente: 0-25 min, 13-37% B; 25-30 min, 37-100% B; 30-42 min, 100% B; 42-45 min, 100-13% B; 12 min 13% B.



A identificação de ácido gálico no extrato aquoso de *P. niruri* foi baseada na comparação dos t_R , em 3,56 e 3,57 min (Figuras 7 e 8). Em seu trabalho Albrecht (2014), também identificou ácido gálico no extrato aquoso de *P. niruri*.

Figura 9. Cromatograma do padrão ácido gálico (1mg/mL). Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 2 (Shimadzu®). Condições de análise: coluna Ascentis C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); comprimento de onda 267 nm, volume de injeção 25 µL; vazão 1 mL/min; fase móvel solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) (A) e acetonitrila (B). Gradiente: 0-25 min, 13-37% B; 25-30 min, 37-100% B; 30-42 min, 100% B; 42-45 min, 100-13% B; 12 min, 12 min 13% B.

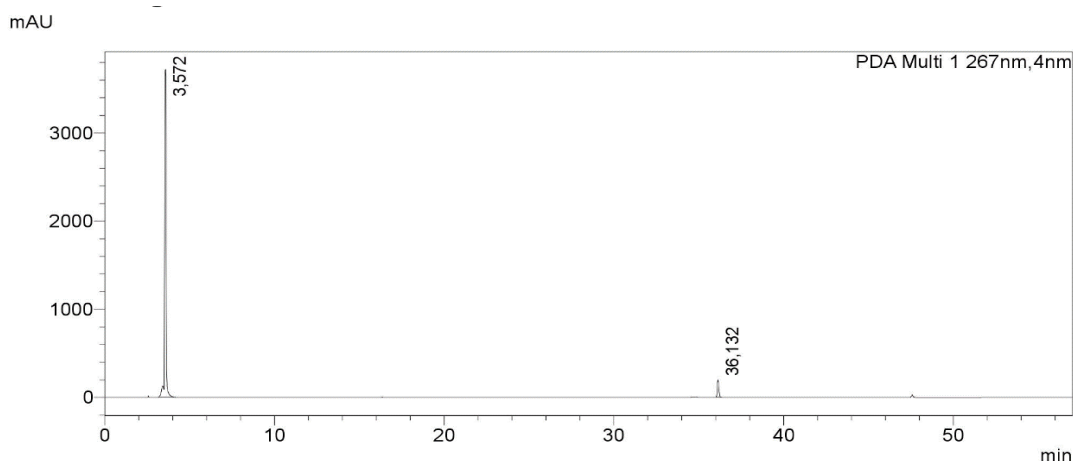
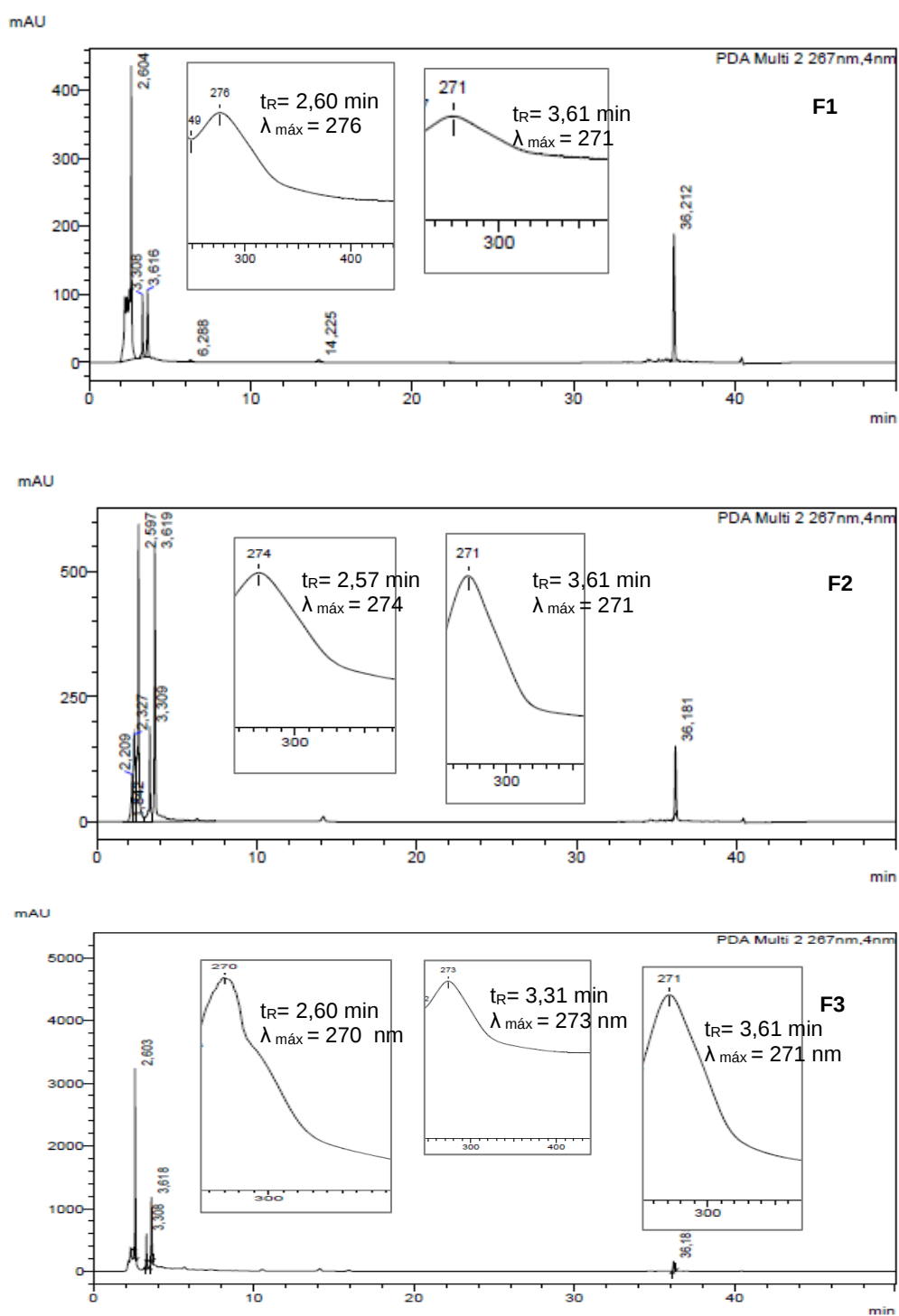
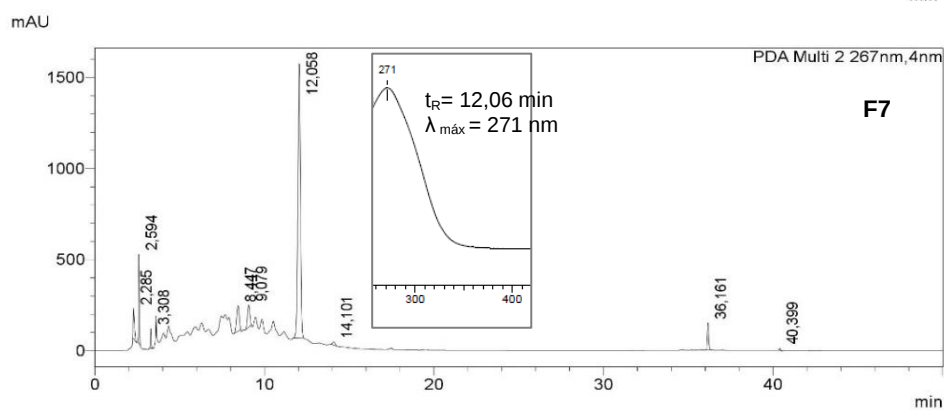
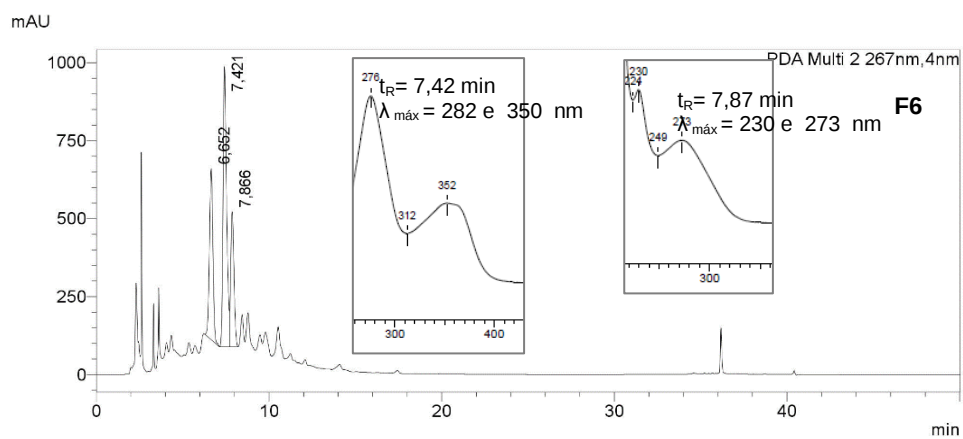
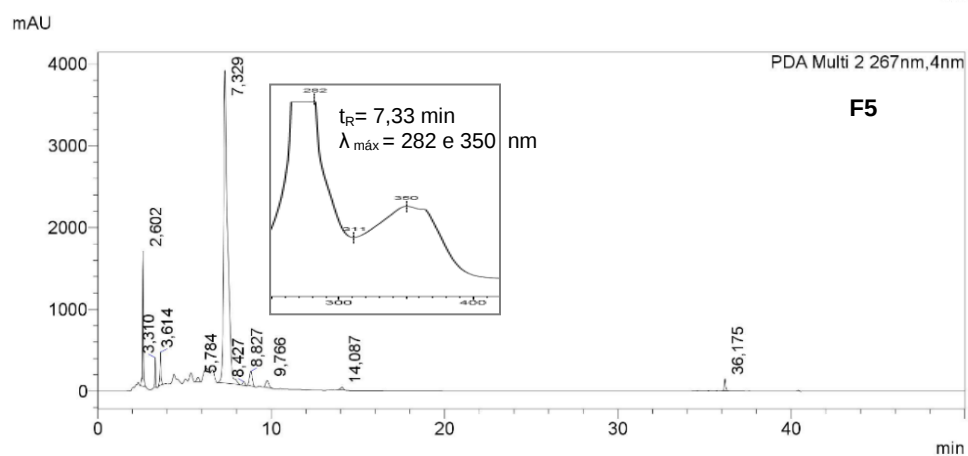
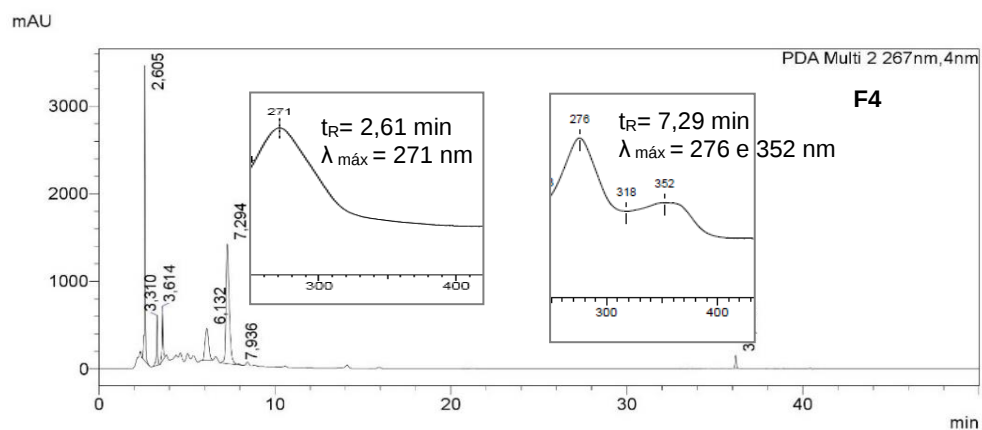
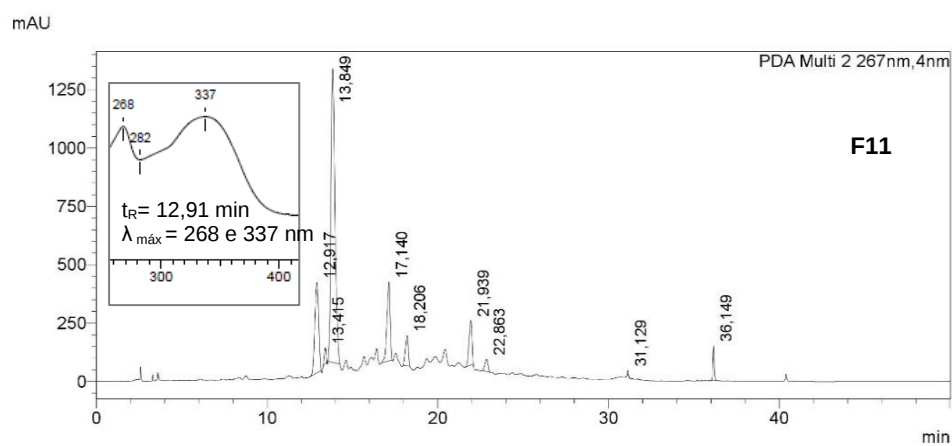
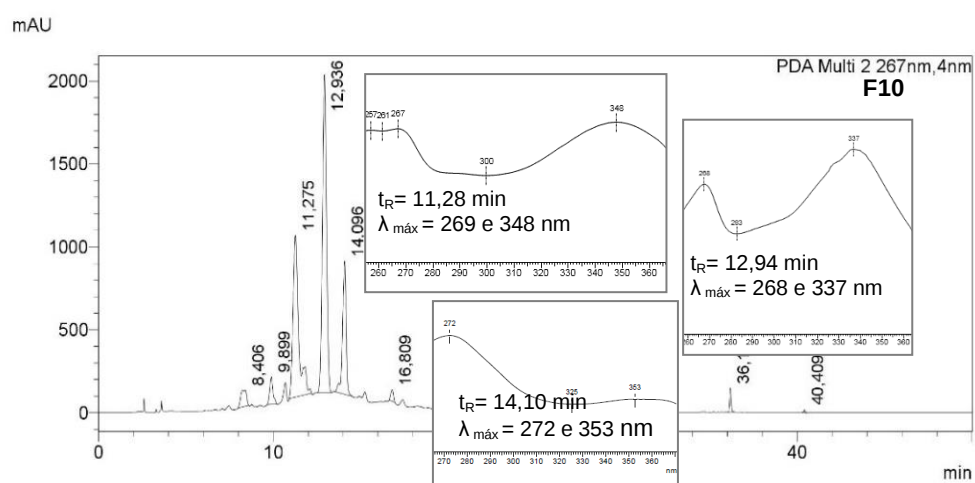
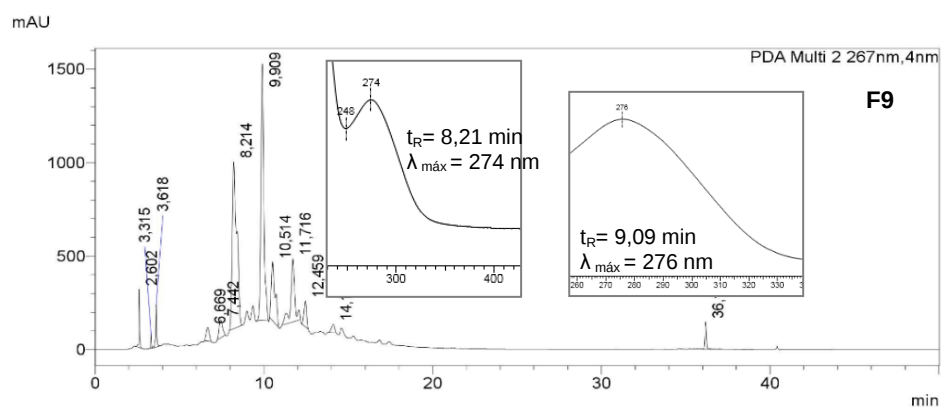
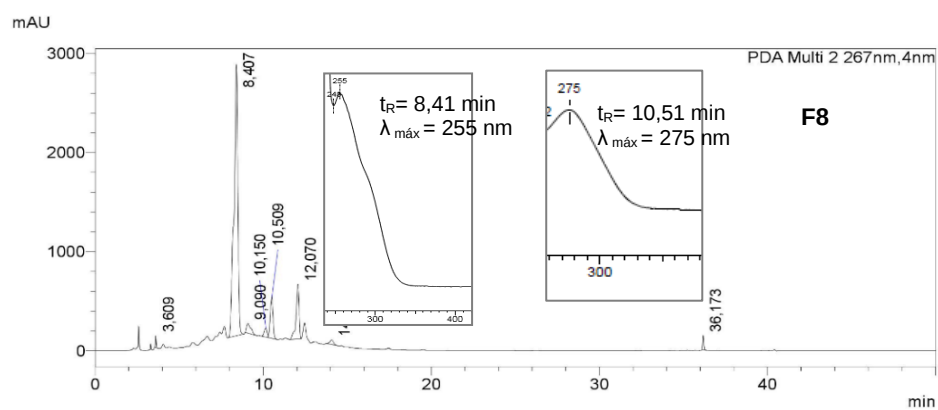
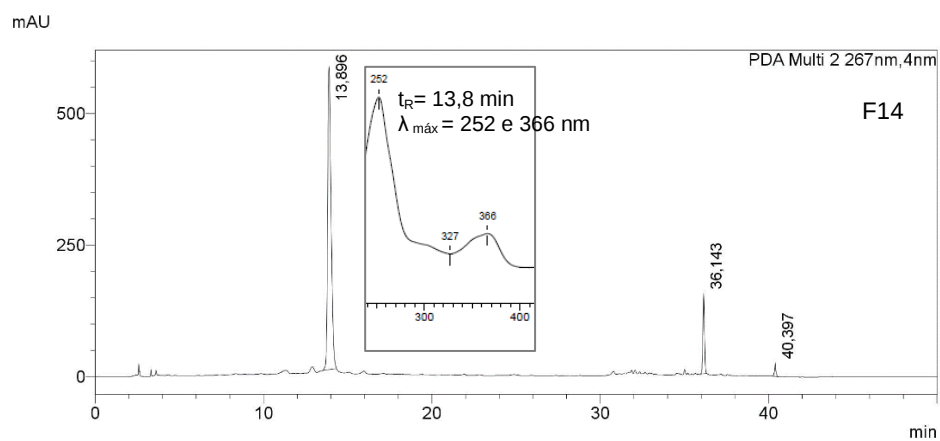
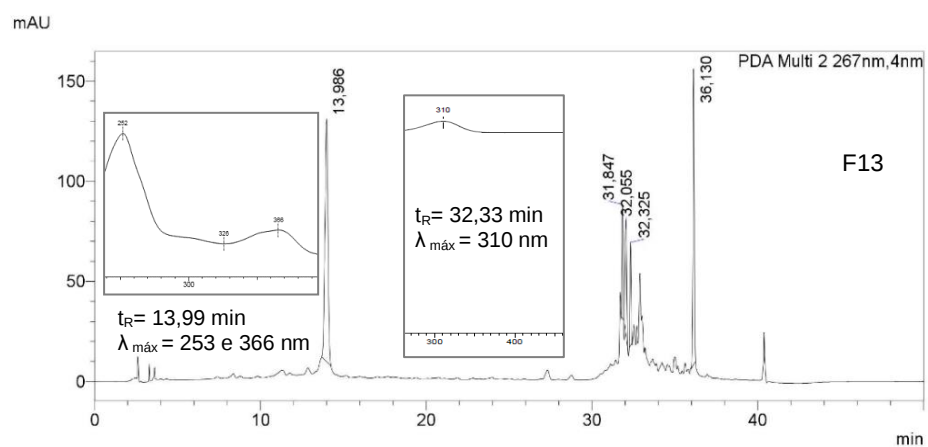
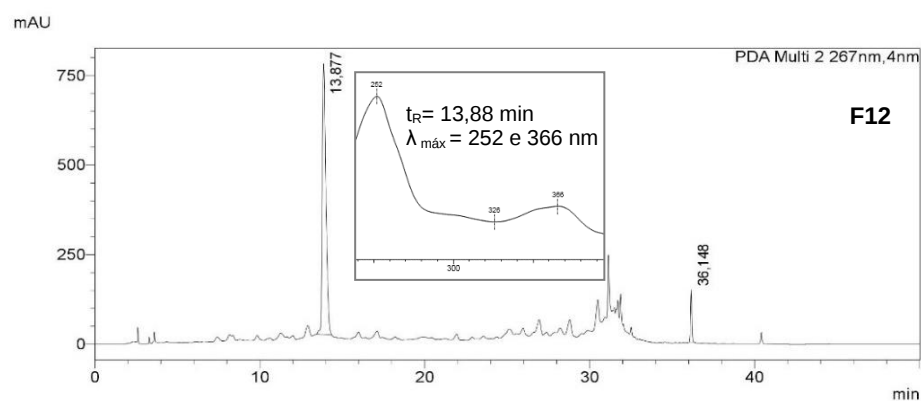
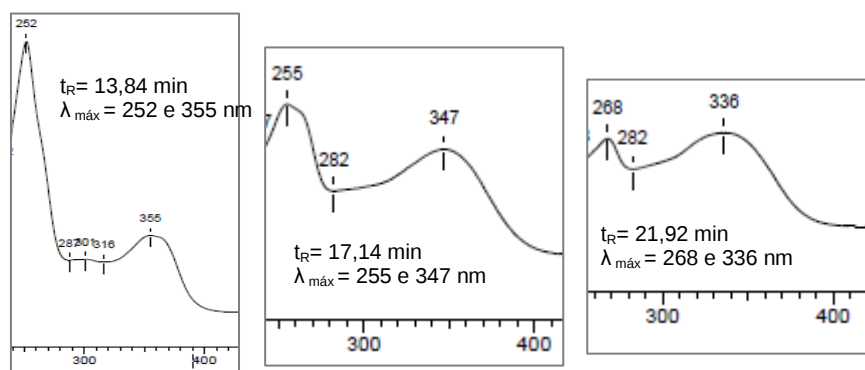


Figura 10. Cromatograma das frações F1 a F14 (3 mg/mL). Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 2 (Shimadzu®). Condições de análise: coluna Ascentis C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); comprimento de onda 267 nm, volume de injeção 25 µL; vazão 1 mL/min; fase móvel solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) (A) e acetonitrila (B). Gradiente: 0-25 min, 13-37% B; 25-30 min, 37-100% B; 30-35 min, 100% B; 35-37 min, 100-13% B; 12 min 13% B.









Ao analisarmos os cromatogramas do extrato (Figura 8) e das frações (Figura 10) verificamos um pico com t_R de cerca de 36,1 min que aparece em todos os cromatogramas, incluindo o cromatograma do padrão de ácido gálico (Figura 9), e por isto deve possivelmente tratar-se de um contaminante.

A espectroscopia UV-VIS é simples e efetiva levando em consideração testes rápidos para identificar grupos funcionais. A espectroscopia no UV é uma importante ferramenta utilizada para identificação de flavonoides que possuem espectros de absorção característicos no UV. Os flavonoides são formados pelo núcleo básico da benzopirona (Figura 11) com 15 carbonos, constituído por dois anéis benzênicos (A e B), ligados por um anel heterocíclico (C). O anel A apresenta absorção máxima entre 240 e 285 nm (banda II) e o anel B entre 300 e 400 nm (banda I) (Figura 12). Os flavonoides são constituídos de diversas classes, entre elas as chalconas, auronas, flavonas (Figura 13), flavonóis (Figura 13), flavanonas, isoflavonas, catequinas, entre outras e podem ser diferenciadas com base em seu espectro no UV (Tabela 4). A estrutura considerada básica do flavonoide corresponde ao núcleo flavônico da Figura 11. A medida que aumenta o grau de hidroxilação do núcleo ocorre um aumento do efeito batocrômico, que é o aumento do $\lambda_{m\acute{a}x}$, resultando em um deslocamento da absorção para maiores comprimentos de onda (KUMAR; PANDEY, 2013; ZUANAZZI, et al. 2017).

Figura 11. Núcleo fundamental da benzopirona.

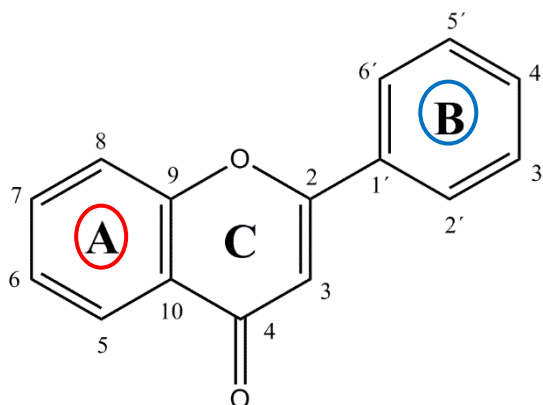
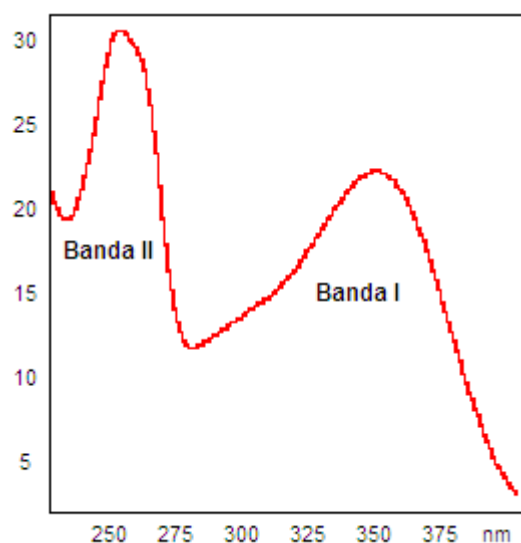
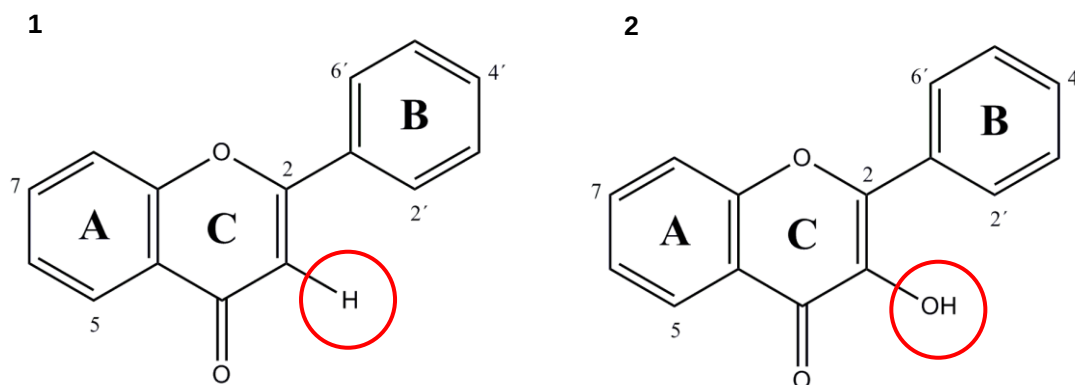


Figura 12. Representação das bandas I e II no espectro no UV/Vis.**Tabela 4.** Diferenciação das classes de flavonoides baseado em seu espectro no UV/Vis.

Classes	Banda I (nm)	Banda II (nm)
Flavonas	304-350	250-285
Flavonóis	352-385	250-285
Di-hidroflavonóis	Baixa intensidade	275-295
Flavanonas	Baixa intensidade	270-295
Isoflavona	Baixa intensidade	245-275
Chalconas	340-390 (ocorre regularmente um pico em 300-320)	220-270
Antocianinas	465-550	270-280 (Baixa intensidade)

(KUMAR; PANDEY, 2013; ZUANAZZI, et al. 2017).

Figura 13. Núcleo fundamental das (1) flavonas e dos (2) flavonóis.



Levando em consideração o número de frações (F1 a F14) e a complexidade das mesmas devido ao número de picos em cada fração, foram apresentados nos cromatogramas das frações apenas os espectros no UV dos picos majoritários. O espectro no UV do pico majoritário da fração F3 com t_R de 3,31 min e $\lambda_{m\acute{a}x} = 273$ nm, sugere tratar-se de um derivado do composto ácido gálico. Ainda na fração 4, o pico com t_R em 7,29 min apresentou espectro no UV com duas bandas com valores de $\lambda_{m\acute{a}x} = 276$ e 352 nm, características de flavonóis. Na F5, o pico majoritário com $t_R = 7,32$ min mostrou espectro no UV com valores de $\lambda_{m\acute{a}x} = 282$ e 350 nm, sendo típico de flavonas; o mesmo perfil de absorção no UV foi observado para o pico majoritário com $t_R = 7,42$ min da F6 indicando que possivelmente é a mesma substância. Já o pico com $t_R = 7,86$ min, mostrou espectro no UV com duas bandas com valores de $\lambda_{m\acute{a}x} = 230$ e 273 nm, sugere tratar-se de um derivado do ácido gálico. A fração F8 cujo pico com t_R em 8,40 min, apresentou espectro no UV com uma banda com valor de $\lambda_{m\acute{a}x} = 255$ nm, o espectro no UV sugere a presença do ácido elágico já relatados previamente na espécie *P. niruri* por ALBRECHT, 2014. Nas frações F8 e 9 os picos com t_R de 10,51; 8,2 e 9,9 min, e exibiu espectro no UV com bandas apresentando valores de $\lambda_{m\acute{a}x} = 275$, 274 e 276 nm respectivamente apontam para presença de derivados do ácido gálico. A fração F10 apresentou um pico com t_R de 11,27 min e um com t_R de 12,93 min, apontou espectro no UV com duas bandas com valores de $\lambda_{m\acute{a}x} = 269$ e 348 nm e 268 e 337 nm, respectivamente que são característicos de flavonas, e um com t_R de 14,09 min, espectro no UV com duas bandas com valores de $\lambda_{m\acute{a}x} = 272$ e 353 nm indicando ser um flavonol. Na fração F11, os picos com $t_R = 12,91$; 17,14 e 21,93 min

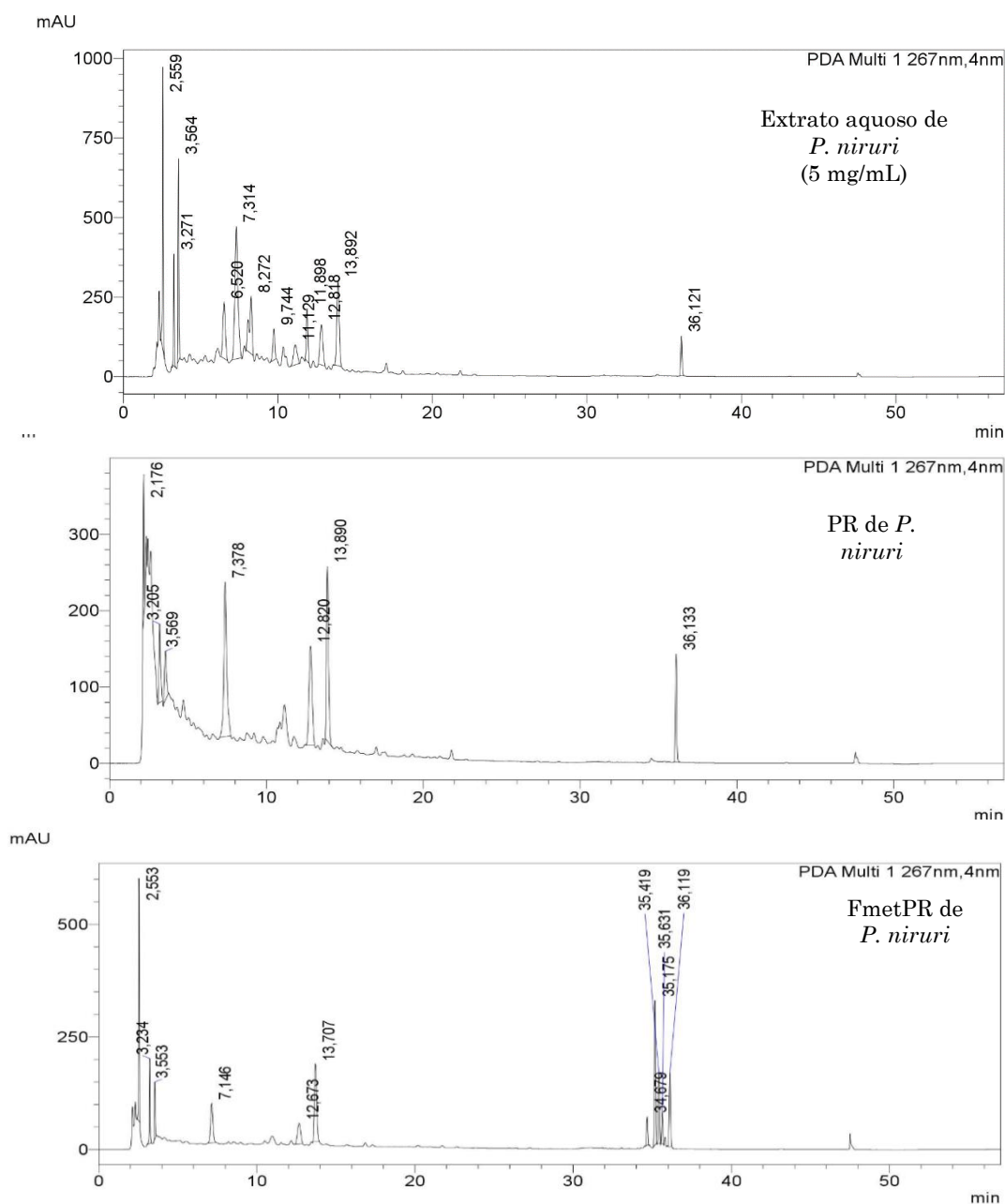
apontam para flavonas e o pico com $t_R = 13,84$ min para flavonol, assim como os picos com $t_R = 13,87$ min da F12 que sugerem ser a mesma substância. As frações F13 e F14 apresentaram o mesmo pico com $t_R = 13,98$ min, com $\lambda_{\text{máx}} = 252$ e 366 nm, sinalizando ser o mesmo composto da classe dos flavonóis. Alguns picos no final do cromatograma nas frações F12 e F13 devem ser compostos que ficaram retidos na coluna, e que eluíram com 100% de etanol. Através da avaliação do espectro de absorção no UV, não foi possível detectar corilagina no extrato, provavelmente devido ao fato de que ela tenha eluido junto com outros compostos.

Conforme apresentado no item 5.2.2, através das análises por CCD foi possível sugerir a presença de flavonoides nas frações F10 a F12, o que é coerente com os espectros no UV dessas frações. As análises por CCD das frações F4, F5 e F6 (Figura 7) apresentam manchas com fluorescência de baixa intensidade, que podem ser flavonoides. Para as frações F4 e F5 é possível observar nas cromatoplasmas da Figura 7. As frações F7, F8 e F9 conforme visto na cromatoplasma (Figura 6) indicam a presença de taninos e substâncias relacionadas.

5.3 Degradação ácida do extrato aquoso de *P. niruri* em fluido gástrico simulado (FGS)

A partir da análise dos cromatogramas (Figura 14) é possível verificar que a degradação ácida em meio FGS produziu substâncias com maior polaridade, o que fica mais evidente na comparação dos cromatogramas do extrato e produto reacional sem pré-tratamento por EFS (PR). Os picos com t_R de 6,52, 8,27, 9,74 e 11,89 min foram observados no cromatograma do extrato (Figura 13) sem degradação, já no cromatograma do PR e da FmetPR não foram verificados. Os cromatogramas do PR e da FmetPR indicaram que algumas substâncias foram parcialmente ou totalmente consumidas e apresentaram menor intensidade relativa (t_R de 8,27, 9,74 e 11,89 min), enquanto os picos com t_R 3,56, 7,37, 11,12, 12,81 e 13,89 min foram observados em todos cromatogramas (extrato, PR e FmetPR). Além disso, houve o aumento do número de picos e da área relativa até t_R de 4 min no cromatogramas de PR, sugerindo que houve degradação com formação de produtos mais polares.

Figura 14. Cromatograma do extrato aquoso de *P. niruri* (5 mg/mL) dos produtos de degradação ácida no tempo de 60' da fração aquosa do produto reacional de *P. niruri* (PR), e da fração metanólica do produto reacional de *P. niruri* (FmetPR). Análise em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 2 (Shimadzu®).- HPLC-DAD em coluna Ascentis C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); comprimento de onda 267 nm, volume de injeção 20 µL; vazão 1 mL/min; fase móvel solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) (A) e acetonitrila (B). Gradiente: 0-25 min, 13-37% B; 25-30 min, 37-100% B; 30-42 min, 100% B; 42-45 min, 100-13% B; 12 min 13% B.



5.4 Análise cromatográfica por UPLC-QToF-MS/MS e UPLC-PDA

As análises por UPLC mostraram boa separação cromatográfica com definição precisa dos fragmentos relativos a cada substância. Através das análises por UPLC-QToF-MS/MS e UPLC-PDA foram identificadas 20 substâncias no extrato de partes aéreas de *P. niruri* (Figura 15; Tabela 5). Ácido gálico, corilagina, ácido elágico e quercetina-*O*-ramnosídeo (Figura 16) foram identificados com o emprego de padrões cromatográficos, as outras 14 substâncias foram identificadas tentativamente com dados relatados na literatura para confirmação. No total 18 substâncias foram caracterizadas. Analisando a Figura 15 é possível observar que os picos referentes às substâncias **10** (ácido carboxílico de brevifolina), **9** (corilagina) e **13** (vitexina-*O*-ramnosídeo) foram os majoritários em termos de área, destacando a corilagina, lembrando que a resposta do detector de massas depende da facilidade de ionização no ESI. Os principais compostos foram taninos hidrolisáveis e substâncias relacionadas, dentre eles o ácido gálico, a corilagina e o ácido elágico, e flavonoides como a vitexina-*O*-ramnosídeo (flavona), miricetina-*O*-ramnosídeo e quercetina-*O*-ramnosídeo (flavonóis) (Figura 16).

Também foi analisada a FmetPR por UPLC-QToF-MS/MS (Figura 15). Comparando os cromatogramas do extrato aquoso de *P. niruri* e FmetPR pode-se observar que o perfil dos dois é muito semelhante, porém há uma redução na intensidade ou ausência dos picos de **1 a 4**, possivelmente porque estes referem-se a substâncias mais polares que podem ter sido eluídas na fração aquosa da EFS do FGS, juntamente com os sais interferentes. É possível também notar uma diminuição na área relativa dos picos **7-11** e a ausência dos picos **5 e 6**, o que sugere a degradação de taninos hidrolisáveis.

Figura 15. Cromatograma da FmetPR (a) e do extrato aquoso de *P. niruri* (b) e observado no equipamento UPLC-QToF. Coluna Waters® Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 mm, 1,7 μ m), temperatura de 40 °C, fases móveis água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (15 min), vazão de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5 μ L.

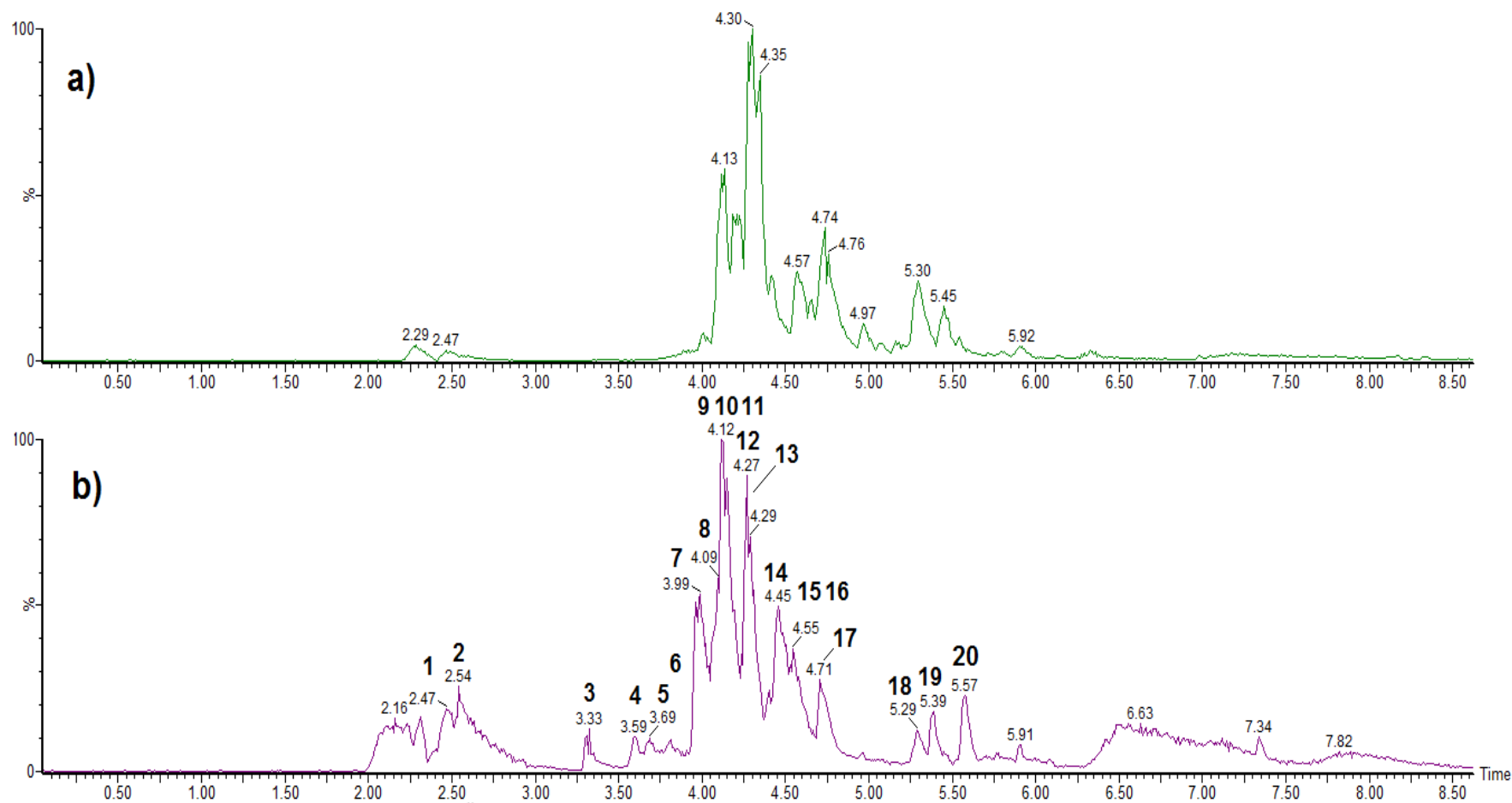


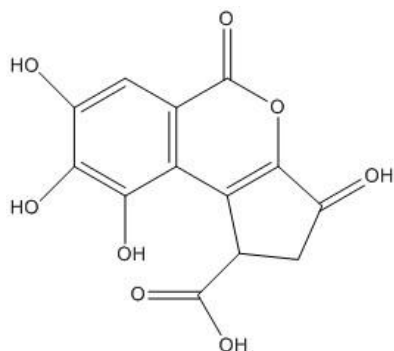
Tabela 5. Substâncias tentativamente identificadas no extrato aquoso de partes aéreas de *P. niruri*.

N° do pico	t _R (min)	[M-H] ⁻ Observado	[M-H] ⁻ Calculado	Ions produtos (MS ²)	Fórmula empírica	Erro (ppm)	Identificação	Referências
1	2,47	209,0305	209,0297	191,0490	C ₆ H ₉ O ₈	3.8	ácido mucico	1
2	2,54	191,0190	191,0192	111,0078	C ₆ H ₇ O ₇	-1.0	ácido cítrico	-
3	3,33	355,0299	355,0351	337,0150	C ₁₄ H ₁₁ O ₁₁	-0.6	ácido chebulico	1
4	3,59	1690135	169,0137	125,0246	C ₇ H ₅ O ₅	-1.2	ácido gálico	padrão
5	3,69	669,0945	669,0939	337,0134	C ₂₇ H ₂₅ O ₂₀	0.9	isômero da neochebuloil galoilglicose	1
6	3,81	667,0770	667,0783	247,0222	C ₂₇ H ₂₃ O ₂₀	-1.9	isômero da virganina	2
7	3,99	969,0838	969,0845	633,0698; 247,0219	C ₄₁ H ₂₉ O ₂₈	-0.7	isômero do ácido amariínico	3
8	4,09	969,0827	969,0845	633,0652; 247,0201	C ₄₁ H ₂₉ O ₂₈	-1.9	isômero do ácido amariínico	3
9	4,12	633,0747	633,0728	300,9931; 169,0132	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₈	3.0	corilagina	padrão
10	4,15	291,0139	291,0141	247,0161; 219,0278; 191,0305	C ₁₃ H ₇ O ₈	-0.7	ácido carboxílico de brevifolina	4
11	4,19	951,0723	951,0740	300,9921; 169,0123	C ₄₁ H ₂₇ O ₂₇	-1.8	isômero da geranina	5

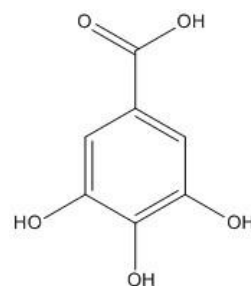
12	4,21	593,1489	593,1506	473,1011; 426,0846, 357,0598; 327,0500	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	-2.9	orientina-O- ramnosídeo	6
13	4,27	577,1566	577,1557	457,1098; 413,0799; 293,0381	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄	1.6	vitexina-O- ramnosídeo	7
14	4,45	463,0855	463,0877	317,0279; 316,0162	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	-4.8	miricetina-O- ramnosídeo	8
15	4,48	300,9981	300,9984	-	C ₁₄ H ₅ O ₈	-1.0	ácido elágico	padrão
16	4,57	447,0908	447,0927	301,0261	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	-4.2	quercetina-O- ramnosídeo	padrão
17	4,71	559,1448	559,1452	483,1824; 395,0741	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₃	-0.7	ácido sinapoil- O-cafeoilquínico	9
18	5,29	327,2170	327,2171	325,1831; 211,1289	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	-0.3	Ácido tri- hidroxiocta decadienóico	10
19	5,39	1041,5348	1041,5329	-	C ₄₅ H ₈₅ O ₂₆	1.8	Unknow	-
20	5,57	1055,550	1055,5486	-	C ₄₆ H ₈₇ O ₂₆	1.3	Unknow	-

¹YANG et al., 2012. ²GUO et al., 2014. ³YEAP FOO, 1995. ⁴SOUSA et al., 2016. ⁵KUMAR et al., 2015. ⁶SPRENGER et al., 2013. ⁷LLORENT-MARTÍNEZA et al., 2015. ⁸ZHANG, et al. 2002. ⁹KUHNERT et al., 2011. ¹⁰SIMIRGIOTIS, et al. 2017.

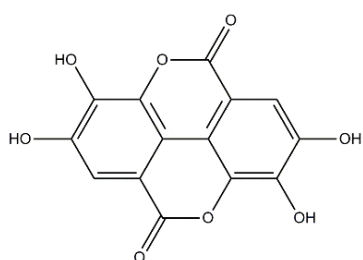
Figura 16. Principais compostos identificados no extrato aquoso de *P. niruri* e observados no equipamento UPLC-QToF.



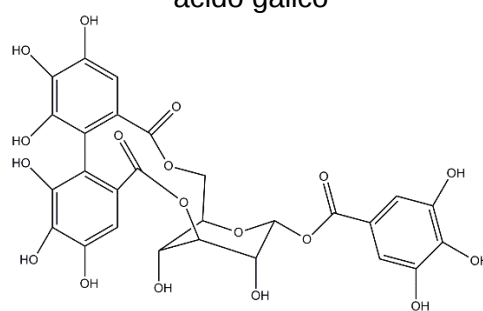
ácido carboxílico de brevifolina



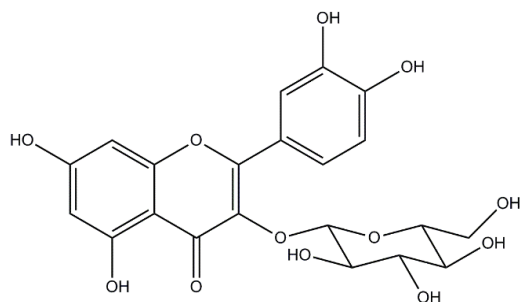
ácido gálico



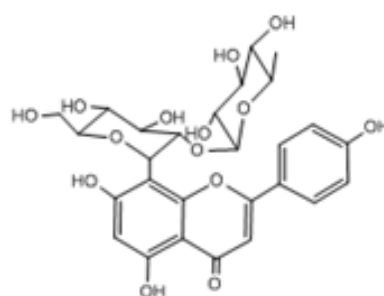
ácido elágico



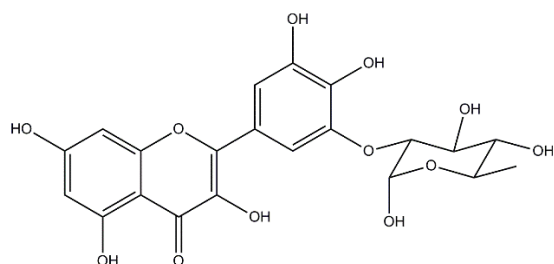
corilagina



quercetina-O-ramnosídeo



vitexina-O-ramnosídeo



miricetina-O-ramnosídeo

5.5 Avaliação da ação do extrato aquoso e das frações de *P. niruri* sobre a formação de cristais de oxalato de cálcio *in vitro*

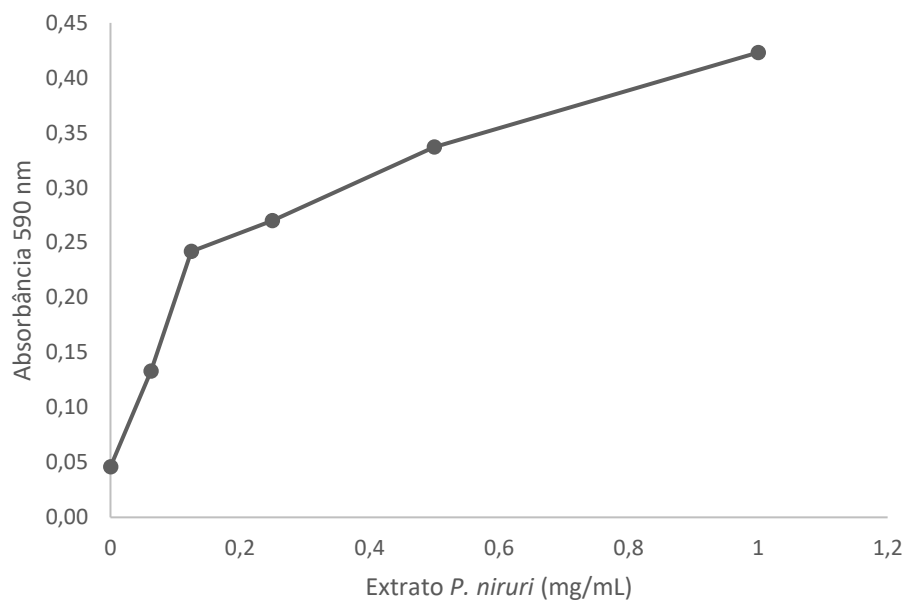
Muitos fatores estão envolvidos na patogênese da urolitíase. É sabido que é necessário a presença de um meio supersaturado na urina para precipitar CaOx, o qual pode agir como facilitador da formação de cristais, mas esse evento pode não ser suficiente para formar um cristal (“pedra”). A urina é uma solução normalmente supersaturada e apenas alguns indivíduos são propensos a esta doença. Na maioria das vezes, a urina não forma cristais no trato urinário, para ocorrer a formação desses cálculos renais é necessário que aconteça nucleação, crescimento e agregação de cristais (BARROS et al., 2003; BARROS et al., 2006; LIESKE et al., 1999). Estudos apontam que substâncias de *P. niruri* podem interferir nessas etapas de formação do cálculo renal e essas propriedades podem estar intimamente ligadas à prevenção da formação das “pedras” e inibição do crescimento das mesmas, propiciando sua excreção (BOIM et al., 2010).

As condições do ensaio de formação de cristais de oxalato de cálcio foram otimizadas, utilizando o estudo realizado por Barros et al. (2003).

Foram testadas diferentes concentrações de extrato aquoso de *P. niruri* (0,0625; 0,125; 0,250; 0,500 e 1,0 mg/mL) e os dados estão apresentados nas Figuras 15 a 19. O ensaio consiste na análise dos cristais obtidos imediatamente após cristalização. A análise semiquantitativa do número de cristais é estimada pela determinação da turbidez do meio reacional comparado nos tempos 0 e 90 min. Após a cristalização (90 min), alíquotas de 100 µL foram colocadas em placas de 96 poços e a absorbância foi determinada em 590 nm. É possível observar turbidez na urina em que foi adicionado o oxalato de sódio, no tempo 0 da reação, o que indica o início do processo de cristalização.

A Figura 17 mostra que a absorbância do meio reacional aumentou com a utilização de concentrações crescentes do extrato de *P. niruri*. Segundo Barros et al., (2003) o índice de turbidez está relacionado diretamente com a redução da área dos cristais, o que pode ser observado nas Figura 21, correlacionado também com um aumento do número de cristais de oxalato de cálcio quando utilizadas concentrações maiores do extrato de *P. niruri* (Figura 20).

Figura 17. Indução da cristalização de CaOx pela adição de NaOx em urina humana, monitorada pela absorbância (590 nm), na presença de soluções de concentrações crescentes de extrato de *P. niruri* (0,0625; 0,125; 0,25; 0,50 e 1,00 mg/mL).



As Figuras 18 e 19 representam o número de cristais de oxalato de cálcio na ausência e na presença de extrato de *P. niruri* (0,0625; 0,125; 0,250; 0,500 e 1,0 mg/mL) em urina humana, os quais foram contados manualmente, utilizando um processador de imagens (Image J).

Figura 18. Microscopia ótica de cristais de CaOx na ausência e presença extrato de *P. niruri* em diferentes concentrações (0,0625; 0,125; 0,25, 0,50 mg/mL).

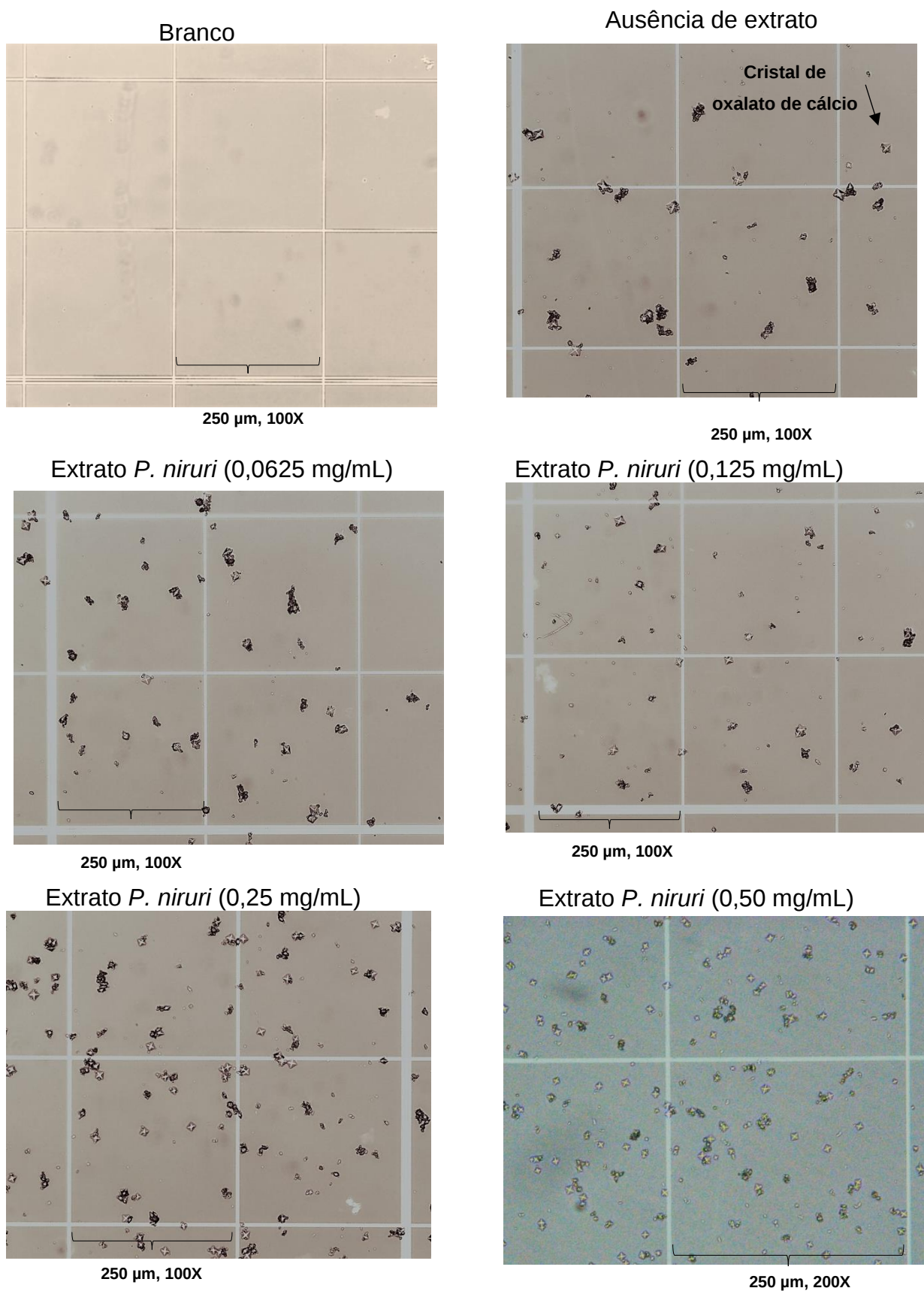
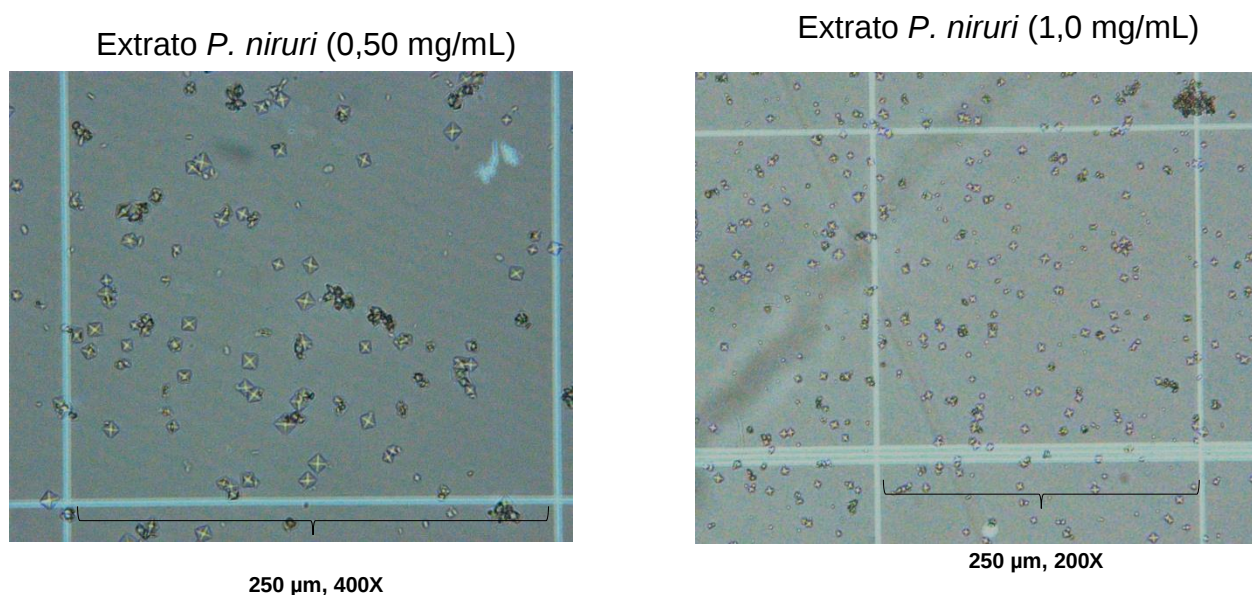


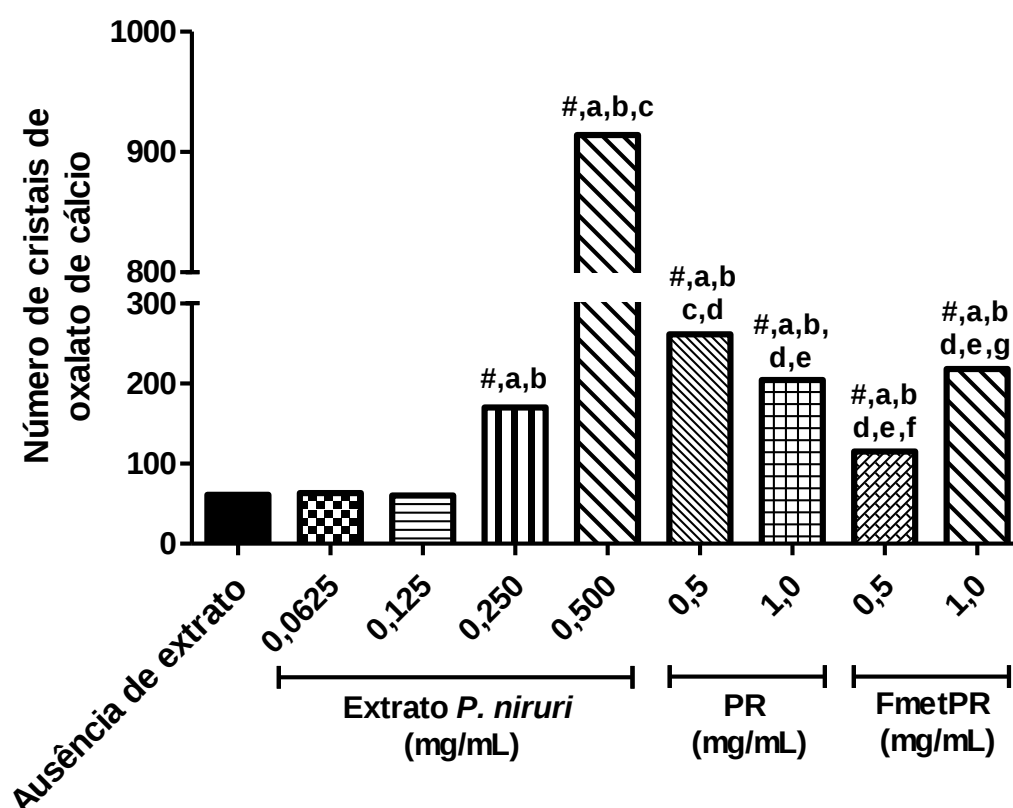
Figura 19. Microscopia ótica de cristais de CaOx na presença extrato de *P. niruri* em diferentes concentrações (0,50 e 1,0 mg/mL).



A partir da análise da Figura 18, é possível observar que com o aumento da concentração do extrato de *P. niruri* (0,25 e 0,50 mg/mL) houve um aumento progressivo do número de cristais de oxalato de cálcio, em comparação com a ausência do extrato de *P. niruri*. A concentração de 1,0 mg/mL de extrato não está apresentada pois a análise ficou prejudicada devido ao número excessivo de cristais, bem como a área extremamente reduzida, o que comprometeu a acurácia da medida de área. As concentrações 0,25 e 0,50 mg/mL apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle, bem como as concentrações 0,0625 e 0,125 mg/mL. Além do extrato, foram avaliados o produto reacional e sua fração metanólica obtidos a partir do ensaio de fluido gástrico simulado (FGS) sem enzimas. É possível observar que para o PR, o aumento da concentração (de 0,5 para 1,0 mg/mL) resultou em uma diminuição do número de cristais, resultado contrário ao desejado visto que com o aumento da concentração espera-se um aumento no número de cristais, sendo esses cristais menores, o que torna fisiologicamente favorável a eliminação. A concentração de 0,5 mg/mL do PR mostrou ser diferente estatisticamente das concentrações do extrato de *P. niruri* testadas (0,0625, 0,125, 0,25 e 0,125

mg/mL). Já as concentrações 1,0 mg/mL, do PR e a 0,5 e 1,0 mg/mL de FmetPR apresentaram diferença estatística quando comparadas com o controle e com as diferentes concentrações de extrato de *P. niruri* testadas, exceto para a concentração de 0,25 mg/mL de extrato de *P. niruri*, e também para a concentração de 1mg/mL da FmetPR. Analisando a FmetPR verificamos que com o aumento da concentração (de 0,5 para 1,0 mg/mL) houve um aumento do número de cristais. A FmetPR 1,0 mg/mL não apresentou diferença significativa quando comparada com a PR 1,0 mg/mL. Dessa maneira, pode-se verificar que a ação do extrato de *P. niruri* 0,50 mg/mL é significativamente maior que o PR e a FmetPR, visto que nessa concentração houve um aumento no número de cristais, resultando em um efeito benéfico e esperado.

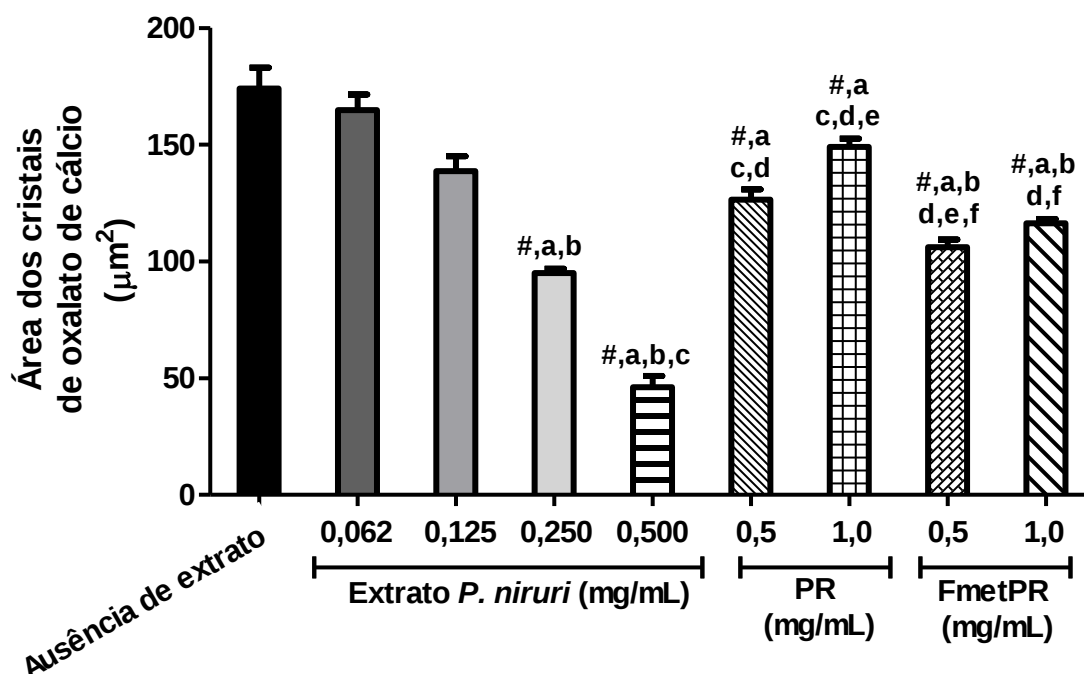
Figura 20. Número de cristais de oxalato de cálcio por contagem manual, na ausência e na presença de extrato de *P. niruri* (0,0625; 0,125; 0,250; 0,500 mg/mL) e frações obtidas a partir do FGS, PR e FmetPR (0,5 e 1,0 mg/mL) em urina humana.



Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média. As diferenças foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças vs ausência de extrato; a, diferenças vs 0,062 de extrato; b, diferenças vs 0,125 de extrato; c, diferenças vs 0,250 de extrato; d, diferenças vs 0,500 de extrato; e, diferenças vs 0,5 de PR; f, diferenças vs 1,0 de PR; g, diferenças vs 0,5 de FmetPR.

A Figura 21 representa a área média (μm^2) dos cristais de CaOx por contagem manual (Image J), na ausência e na presença de extrato de *P. niruri* (0,0625; 0,125; 0,250; 0,500 e 1,00 mg/mL), e nas frações obtidas a partir do FGS, PR e FmetPR (0,5 e 1,0 mg/mL) em urina humana. Observa-se uma diminuição significativa na área média dos cristais de CaOx na presença de 0,25 mg/mL e 0,50 mg/mL do extrato aquoso de *P. niruri* em relação ao controle (ausência de extrato). Para as concentrações 0,062 e 0,125 mg/mL houve redução significativa na área média dos cristais de CaOx, quando comparadas com o controle (ausência de extrato). A área média dos cristais de CaOx na presença de 0,25 mg/mL de extrato aquoso de *P. niruri* foi significativamente menor em relação a concentração 0,062 mg/mL. A concentração 0,50 mg/mL do extrato aquoso de *P. niruri* apresentou diferença significativa em relação as concentrações 0,0625; 0,125 e 0,250 mg/mL. É possível verificar diferença estatisticamente significativa na área média dos cristais de CaOx do PR de 0,5 mg/mL quando comparadas com o controle e com as concentrações 0,0625; 0,250 e 0,500 mg/mL de extrato aquoso de *P. niruri*. O mesmo comportamento pode ser observado com a PR 1,0 mg/mL, apresentando diferença significativa quando comparada com o controle e com as concentrações 0,0625; 0,250 e 0,500 mg/mL de extrato aquoso de *P. niruri*, além do PR (0,5 mg/mL). A FmetPR (0,5 mg/mL) apresentou diferença significativa comparada ao controle, bem como para as concentrações 0,0625; 0,125 e 0,500 mg/mL do extrato, e também da PR de 1,0 mg/mL. A concentração de 0,500 mg/mL de extrato aquoso de *P. niruri*, demonstrou reduzir significativamente a área dos cristais de oxalato de cálcio, propiciando a na facilidade de eliminação dos cristais da urina.

Figura 21. Área média das partículas analisadas por contagem manual, na ausência e presença de extrato de *P. niruri* (0,0625; 0,125; 0,250; 0,500 mg/mL) e frações obtidas a partir do FGS, PR e FmetPR (0,5 e 1,0 mg/mL) em urina humana.



Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média. As diferenças foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças vs ausência de extrato; a, diferenças vs 0,062 de extrato; b, diferenças vs 0,125 de extrato; c, diferenças vs 0,250 de extrato; d, diferenças vs 0,500 de extrato; e, diferenças vs 0,5 de PR; f, diferenças vs 1,0 de PR; g, diferenças vs 0,5 de FmetPR.

Nos APÊNDICES 1 e 2 estão contidas as Tabelas que representam a indução da cristalização de CaOx averiguada pela determinação da absorbância do controle, do extrato aquoso de *P. niruri* das frações obtidas a partir do FGS (PR e FmetPR), dos padrões ácido gálico e ácido elágico, e das frações de *P. niruri* (F1 a F14) obtidas por EFS. As imagens obtidas por microscopia ótica de cristais de CaOx na presença das frações do extrato de *P. niruri* em diferentes concentrações estão apresentadas nos APÊNDICES 3 ao 10.

Da mesma maneira que foi notada a variação na absorbância para as diferentes concentrações do extrato de *P. niruri* (Figura 17), pode-se observar que o aumento das diferentes concentrações das frações (F1 a F14), resultou no aumento da absorbância (APÊNDICE 2), exceto para a fração F14 (0,5 mg/mL).

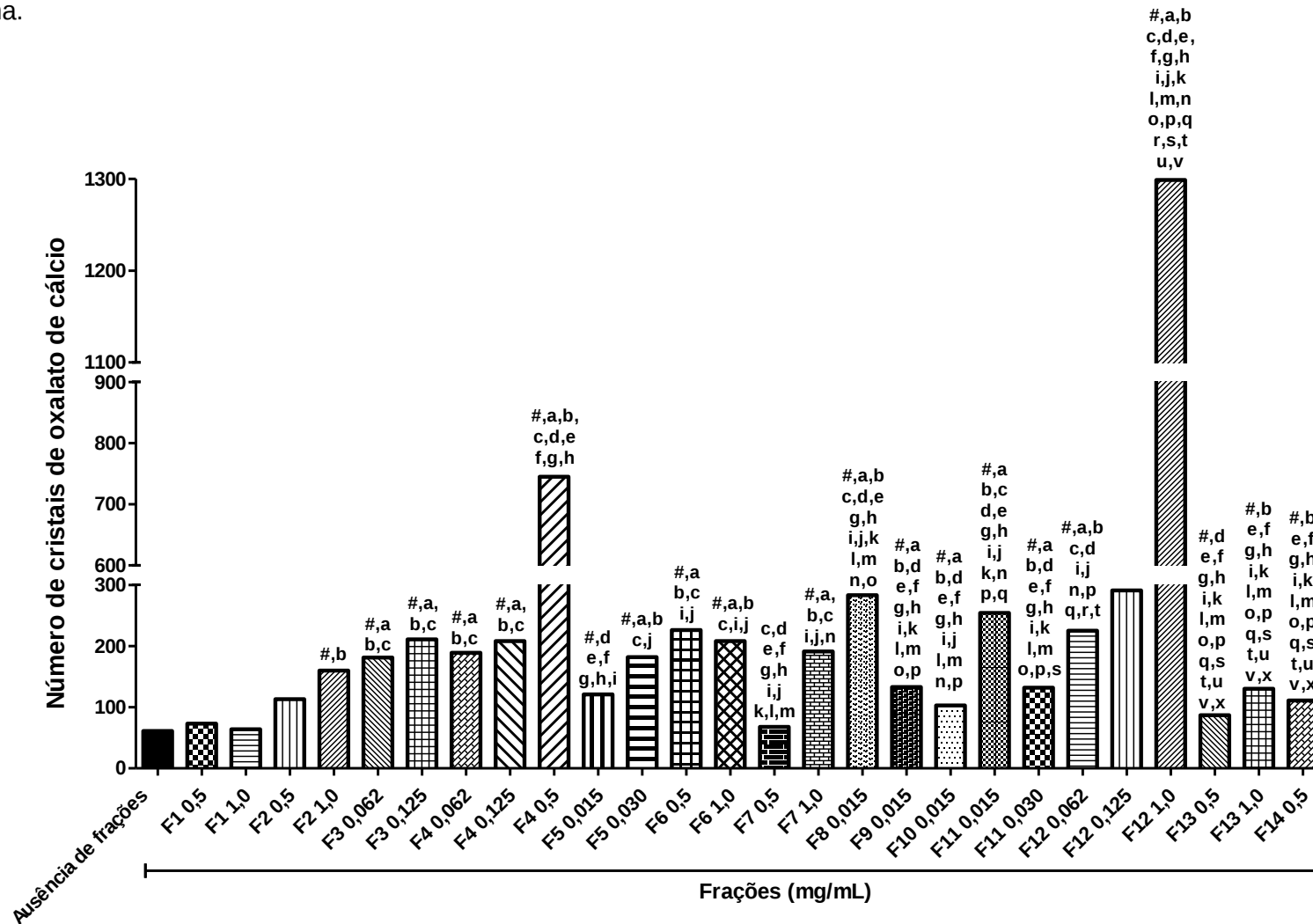
Considerando a turbidez do meio reacional, devido a formação dos cristais de CaOx, calculou-se também a transmitância, a fim de comparar com os resultados de absorbância. Nas análises por HPLC-PDA do extrato e das frações não foram observados picos com espectros no UV/Vis com absorbância em 590 nm, mostrando que não há interferentes nestas amostras para absorção em 590 nm.

A Figura 22 representa o número de cristais de oxalato de cálcio na ausência e na presença das frações de *P. niruri* (F1 a F14) obtidas por EFS, em urina humana, contados manualmente (Image J). As frações F1 (0,5 e 1,0 mg/mL) e F2 (0,5 mg/mL) não apresentaram diferença significativa em relação ao controle (ausência de frações). A fração F2 (1,0 mg/mL) apresentou diferença significativa em relação ao controle e a fração F1 (1,0 mg/mL), houve um aumento do número de cristais. As frações F3 (0,062 e 0,125 mg/mL) e F4 (0,062 e 0,125 mg/mL) apontaram diferença significativa quando comparadas ao controle, as frações F1 (0,5 e 1,0 mg/mL) e F2 (0,5 mg/mL). A fração F4 (0,5 mg/mL) mostrou diferença significativa quando comparada ao controle e as frações F1, F2, F3 nas duas concentrações testadas, além da F4 (0,062 e 0,125 mg/mL). A fração F5 (0,015 mg/mL) apresentou diferença estatística do controle, F2 (1,0 mg/mL), F3 (0,062 e 0,125 mg/mL) e F4 (0,062, 0,125 e 0,5 mg/mL). A fração F5 (0,030 mg/mL) apontou diferença significativa do controle, das frações F1 (0,5 e 1,0 mg/mL), F2 (0,5 mg/mL) e da fração F4 (0,5 mg/mL). A fração F6 (0,5 e 1,0 mg/mL) mostrou ser diferente estatisticamente do controle, das frações F1 (0,5 e 1,0 mg/mL), F2 (0,5 mg/mL), F4 (0,5 mg/mL) e F5 (0,015 mg/mL). A fração F7 (0,5 mg/mL) apresentou diferença significativa com as frações F1 (1,0 mg/mL), F2 (0,5 e 1,0 mg/mL), F4, F5, F6 em todas as concentrações testadas. A fração F7 (1,0 mg/mL) apresentou diferença significativa com o controle, e com as frações F1 (0,5 e 1,0 mg/mL), F2 (0,5 mg/mL), F4 (0,5 mg/mL), F5 (0,015 mg/mL) e F7 (0,5 mg/mL). A fração F8 mostrou ser estatisticamente diferente do controle e das frações F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 nas concentrações testadas, exceto para a F3 (0,125 mg/mL). Um destaque para a fração F12 (1,0 mg/mL) que exibiu ser diferente significativamente de todas as frações testadas.

Na Figura 22, é possível observar que as frações F4 (0,5 mg/mL) e F12 (1,0 mg/mL), apresentaram um número elevado de cristais de oxalato de cálcio, acima de 700 e 1200, respectivamente, indicando uma expressiva atividade dos componentes dessas frações frente a inibição do crescimento e agregação dos

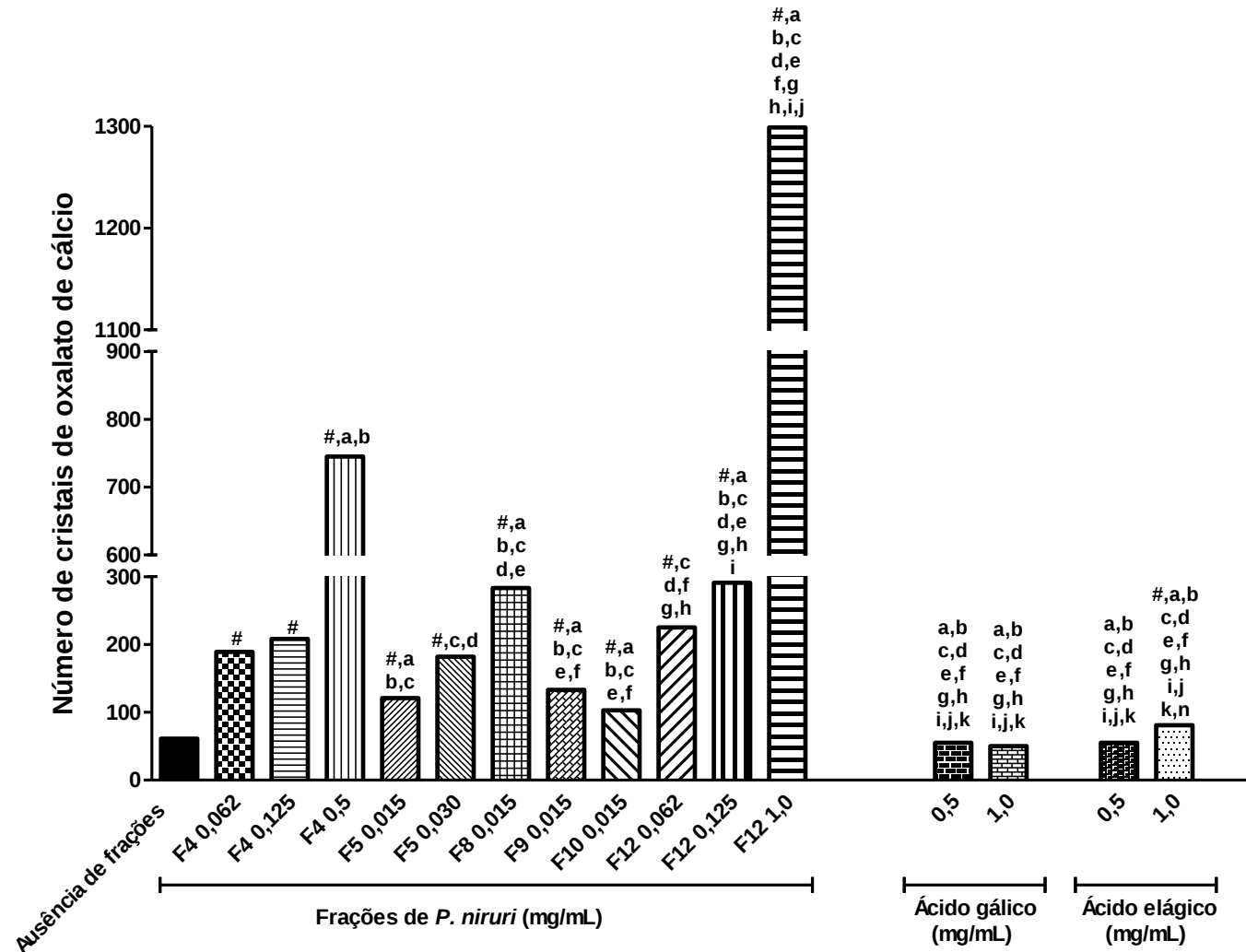
cristais na urina. Além delas as frações F5, F8, F9, F10 e F11 precisaram ser testadas com concentrações até 66 vezes menores (0,015 mg/mL) que a máxima analisada (1,0 mg/mL), pois as análises ficaram comprometidas devido ao número excessivo de cristais, bem como a área reduzida, fatores que comprometeram a resolução das imagens. Dentre as frações com pronunciada atividade selecionamos as frações F4 (0,062, 0,125 e 0,5 mg/mL), F5 (0,015 e 0,030 mg/mL), F8, F9 e F10 (0,015 mg/mL) e F12 (0,062, 0,125 e 1,0 mg/mL) para construção de um novo gráfico e foi realizada a comparação com os padrões ácido gálico (0,5 e 1,0 mg/mL) e ácido elágico (0,5 e 1,0 mg/mL). Na Figura 23 observa-se significativa atividade das frações frente aos padrões testados, apresentando um maior número de cristais, resposta almejada no ensaio. O ácido gálico (0,5 e 1,0 mg/mL) e ácido elágico (0,5mg/mL) não produziram aumento significativo no número de cristais, somente o ácido elágico (1,0 mg/mL) apresentou diferença significativa quando comparado ao controle. Além disso, mostraram diferença significativa quando comparadas as frações F4 (0,062, 0,125 e 0,5 mg/mL), F5 (0,015 e 0,030 mg/mL), F8, F9 e F10 (0,015 mg/mL) F12 (0,062, 0,125 e 1,0 mg/mL).

Figura 22. Número de cristais de oxalato por contagem manual, na ausência e na presença das frações (F1 a F14) do extrato de *P. niruri* obtidas por EFS, em urina humana.



Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. As diferenças foram consideradas com $p < 0,05$. # diferença vs ausência de frações de *P. niruri*; a diferença vs F1 (0,5 mg/mL); b diferença vs F1 (1,0 mg/mL); c diferença vs F2 (0,5 mg/mL); d diferença vs F2 (1,0 mg/mL); e diferença vs F3 (0,062 mg/mL), f diferença vs F3 (0,125 mg/mL), g diferença vs F4 (0,062 mg/mL), h diferença vs F4 (0,125 mg/mL), i diferença vs F4 (0,5 mg/mL); j diferença vs F5 (0,015 mg/mL), k diferença vs F5 (0,030 mg/mL), l diferença vs F6 (0,5 mg/mL); m diferença vs F6 (1,0 mg/mL); n diferença vs F7 (0,5 mg/mL); o diferença vs F7 (1,0 mg/mL); p diferença vs F8 (0,015 mg/mL), q diferença vs F9 (0,015 mg/mL), r diferença vs F10 (0,015 mg/mL), s diferença vs F11 (0,015 mg/mL), t diferença vs F11 (0,030 mg/mL), u diferença vs F12 (0,062 mg/mL), v diferença vs F12 (0,125 mg/mL), x diferença vs F12 (1,0 mg/mL).

Figura 23. Número de cristais de oxalato por contagem manual, na ausência e na presença das frações F4 (0,062, 0,125 e 0,5 mg/mL), F5 (0,015 e 0,030 mg/mL), F8, F9 e F10 (0,015 mg/mL) e F12 (0,062, 0,125 e 1,0 mg/mL) do extrato de *P. niruri* obtidas por EFS, em urina humana e dos padrões ácido gálico (0,5 e 1,0 mg/mL) e ácido elágico (0,5 e 1,0 mg/mL).

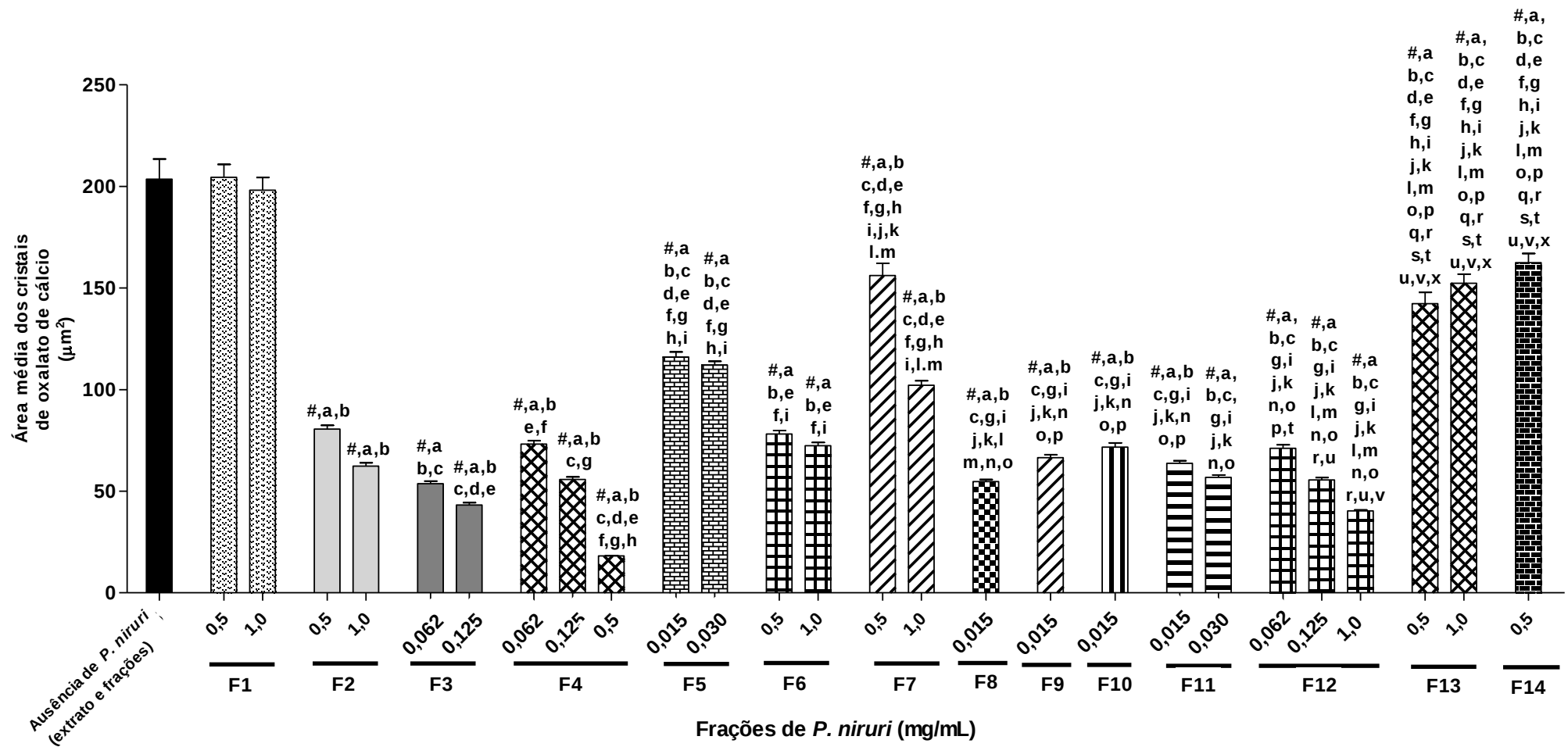


Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. As diferenças foram consideradas com $p < 0,05$. # diferença vs ausência de frações de *P. niruri*; a diferença vs F4 (0,062 mg/mL); b diferença vs F4 (0,125 mg/mL), c diferença vs F4 (0,5 mg/mL), d diferença vs F5 (0,015 mg/mL), e diferença vs F5 (0,030 mg/mL), f diferença vs F8 (0,015 mg/mL), g diferença vs F9 (0,015 mg/mL), h diferença vs F10 (0,015 mg/mL), i diferença vs F12 (0,062 mg/mL), j diferença vs F12 (0,125 mg/mL), k diferença vs F12 (1,0 mg/mL), l diferença vs ácido gálico (0,5 mg/mL), m diferença vs ácido gálico (1,0 mg/mL), n diferença vs ácido elágico (0,5 mg/mL).

As áreas médias dos cristais de CaOx (Figura 24) na presença das frações F2 a F14 apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (ausência de frações). A fração F4 (0,5 mg/mL) se mostrou diferente estatisticamente das frações F1 e F2 (0,5 e 1,0 mg/mL), F3 (0,062 e 0,125 mg/mL) e F4 (0,062 e 0,125 mg/mL), apresentando uma menor área média dos cristais de oxalato de cálcio. As frações F13 e F14 apresentaram diferença significativa em relação a todas as concentrações testadas inclusive o controle.

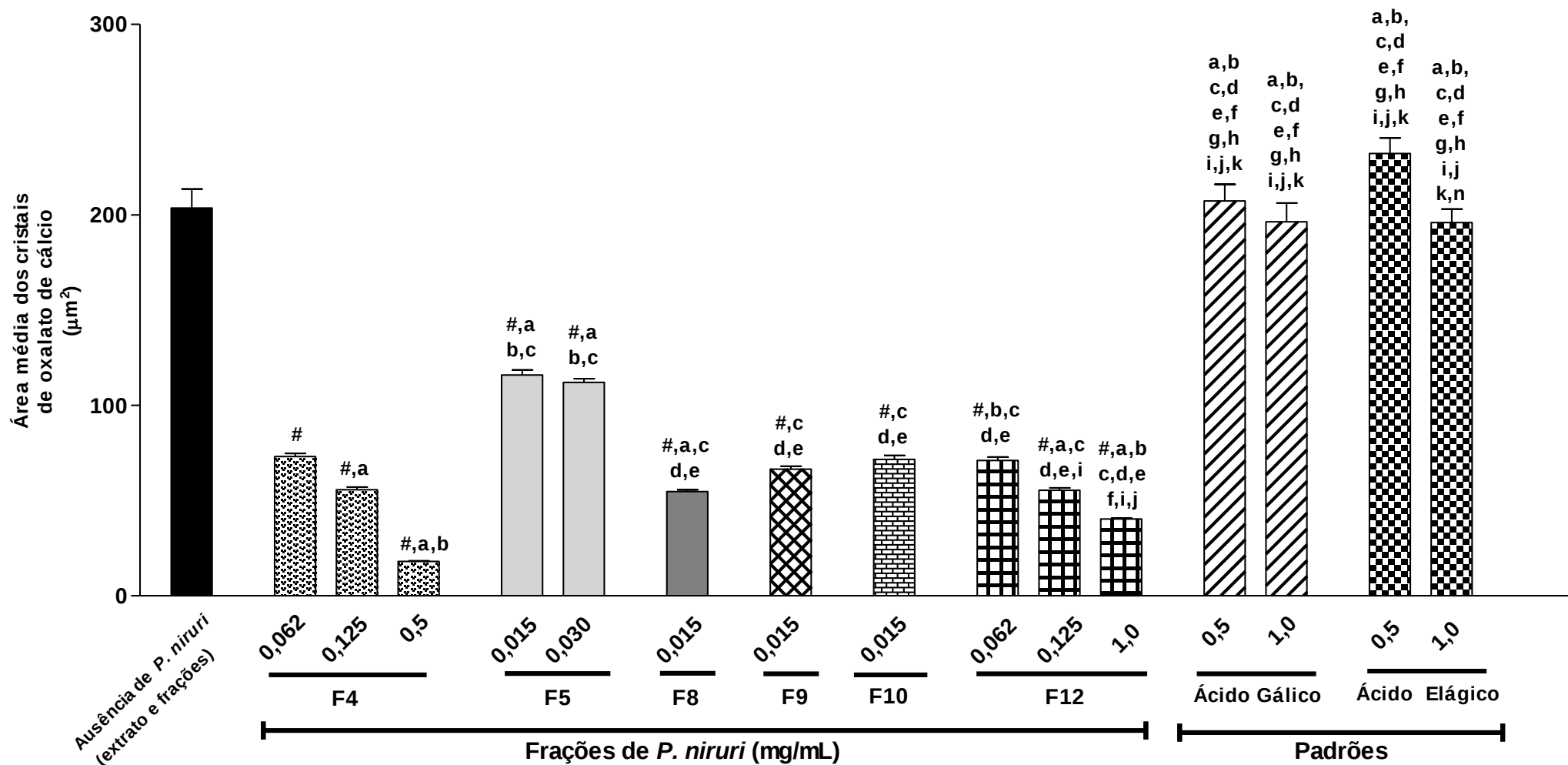
Considerando a análise da Figura 24, é possível observar que as frações F4 (0,5 mg/mL) e F12 (1,0 mg/mL), apresentaram uma menor área média dos cristais de CaOx, demonstrando uma atividade dos componentes dessas frações, considerando a inibição do crescimento e agregação dos cristais na urina, bem como a diminuição deles. Dentre as amostras avaliadas, as frações F5, F8, F9, F10 e F11 também demonstraram pronunciada atividade na ação de formação de cristais de CaOx pois, em concentrações aproximadamente 66 menores (0,015 mg/mL), diminuiu a área e aumentou o número dos cristais, quando comparado com as demais amostras testadas. A Figura 23 mostra algumas das frações com maior atividade, tais como: F4 (0,062, 0,125 e 0,5 mg/mL), F5 (0,015 e 0,030 mg/mL), F8, F9 e F10 (0,015 mg/mL) e F12 (0,062, 0,125 e 1,0 mg/mL) comparadas com os padrões ácido gálico (0,5 e 1,0 mg/mL) e ácido elágico (0,5 e 1,0 mg/mL), assim foi possível verificar significativa atividade das frações comparado aos padrões testados. O ácido gálico (0,5 e 1,0 mg/mL) e ácido elágico (0,5mg/mL) não tiveram efeito com relação a área média dos cristais quando comparados ao controle.

Figura 24. Área média das partículas analisadas por contagem manual, na ausência e presença das frações do extrato aquoso de *P. niruri* (mg/mL) a partir da EFS, em urina humana.



Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. As diferenças foram consideradas com $p < 0,05$. # diferença vs ausência de frações de *P. niruri*; a diferença vs F1 (0,5 mg/mL); b diferença vs F1 (1,0 mg/mL); c diferença vs F2 (0,5 mg/mL); d diferença vs F2 (1,0 mg/mL); e diferença vs F3 (0,062 mg/mL), f diferença vs F3 (0,125 mg/mL), g diferença vs F4 (0,062 mg/mL), h diferença vs F4 (0,125 mg/mL), i diferença vs F4 (0,5 mg/mL); j diferença vs F5 (0,015 mg/mL), k diferença vs F5 (0,030 mg/mL), l diferença vs F6 (0,5 mg/mL); m diferença vs F6 (1,0 mg/mL); n diferença vs F7 (0,5 mg/mL); o diferença vs F7 (1,0 mg/mL); p diferença vs F8 (0,015 mg/mL), q diferença vs F9 (0,015 mg/mL), r diferença vs F10 (0,015 mg/mL), s diferença vs F11 (0,015 mg/mL), t diferença vs F11 (0,030 mg/mL), u diferença vs F12 (0,062 mg/mL), v diferença vs F12 (0,125 mg/mL), x diferença vs F12 (1,0 mg/mL).

Figura 25. Área média das partículas analisadas por contagem manual, na ausência e na presença das frações F4 (0,062, 0,125 e 0,5 mg/mL), F5 (0,015 e 0,030 mg/mL), F8, F9 e F10 (0,015 mg/mL) e F12 (0,062, 0,125 e 1,0 mg/mL) do extrato de *P. niruri* obtidas por EFS, em urina humana e dos padrões ácido gálico (0,5 e 1,0 mg/mL) e ácido elágico (0,5 e 1,0 mg/mL).



Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. As diferenças foram consideradas com $p < 0,05$. # diferença vs ausência de frações de *P. niruri*; a diferença vs F4 (0,062 mg/mL); b diferença vs F4 (0,125 mg/mL), c diferença vs F4 (0,5 mg/mL), d diferença vs F5 (0,015 mg/mL), e diferença vs F5 (0,030 mg/mL), f diferença vs F8 (0,015 mg/mL), g diferença vs F9 (0,015 mg/mL), h diferença vs F10 (0,015 mg/mL), i diferença vs 12 (0,062 mg/mL), j diferença vs F12 (0,125 mg/mL), k diferença vs F12 (1,0 mg/mL), l diferença vs ácido gálico (0,5 mg/mL), m diferença vs ácido gálico (1,0 mg/mL), n diferença vs ácido elágico (0,5 mg/mL).

Os resultados referentes aos números e área média dos cristais de CaOx devem estar relacionados diretamente com a diferença da composição das frações na ação sobre o processo de formação de cristais de CaOx, tanto no aumento do número de cristais quanto na diminuição da área média desses cristais.

Barros et al. (2003) mostraram que o extrato aquoso de *P. niruri* analisado na concentração de 0,25 mg/mL apresentou aumento dos cristais pequenos (5,0-7,5 μ m) quando equiparado com o controle (ausência de extrato).

A análise dos resultados da formação de cristais de CaOx comparados com as análises químicas das frações, as quais apontaram presença de flavonoides nas frações F4, F5, F10, F11 e F12 confirmaram estudos anteriores que indicam os flavonoides como uma das classes de metabólitos secundários responsáveis por essa atividade (ALBRECHT, 2014).

Albrecht (2014) avaliou a quercetina como padrão e obteve o melhor resultado comparado ao extrato bruto seco de *P. niruri* e sua fração aquosa, emulsão e *n*-butanol. Este mesmo estudo também avaliou o ácido gálico, o qual não apresentou aumento significativo do número de cristais na concentração avaliada, dessa maneira Albrecht (2014) sugeriu que não só os flavonoides e/ou a corilagina podem ser os responsáveis pela ação na formação de cristais de oxalato de cálcio.

6 CONCLUSÃO

Mediante o proposto inicialmente nesse trabalho os resultados obtidos possibilitaram concluir que o método de CCD utilizado mostrou-se apropriado para a análise qualitativa de flavonoides e de taninos nas frações do extrato aquoso de *P. niruri*. Ao fracionarmos o extrato obtivemos quatorze frações, a maioria concentrada em taninos ou em flavonoides.

Através das análises por UPLC-QToF-MS/MS e UPLC-PDA foram identificadas 18 substâncias no extrato de partes aéreas de *P. niruri*, sendo 4 com o uso de padrões e 14 tentativamente com base nos espectros de massas e UV, incluindo 7 taninos hidrolisáveis e 4 flavonoides glicosilados (2 flavonas e 2 flavonóis), além de ácido gálico e ácido elágico. Com os resultados obtidos por HPLC-PDA, o método foi adequado para se obter os perfis cromatográficos do extrato e do produto reacional do FGS, a fim compará-los quanto a sua complexidade em termos de tempos de retenção dos picos e componentes majoritários (maior área ou altura dos picos), além de verificar a eficiência da EFS e obter o perfil químico das frações.

Com os resultados obtidos, é possível inferir que o extrato aquoso de *P. niruri* sofreu degradação em meio FGS. Comparando-se os cromatogramas do extrato antes e após a degradação em FGS, é possível verificar que algumas substâncias foram parcialmente consumidas ou apresentaram menor intensidade relativa dos picos, especificamente os taninos hidrolisáveis que são mais suscetíveis à hidrólise ácida do que os flavonoides O-glicosilados por conterem ligações éster. Esses resultados mostram que os taninos hidrolisáveis podem sofrer degradação ao passarem pelo meio estomacal.

Na avaliação da ação sobre a cristalização de CaOx, os dados sugerem que há interferência do extrato de *P. niruri* na inibição do crescimento dos cristais, assim como na agregação dos mesmos. Com os resultados apresentados pelas frações, podemos inferir que as frações F4 e F12 apresentaram pronunciada atividade referente a formação de cristais de CaOx *in vitro*. E que as frações F5, F8, F9, F10 e F11 também apresentaram tal atividade, pois em concentrações aproximadamente 66 menores (0,015 mg/mL), diminuíram a área dos cristais e aumentaram o número desses cristais, sendo esse efeito fisiologicamente favorável a eliminação dos cristais de CaOx na urina. Os resultados referentes a formação de cristais CaOx quando comparados às

análises químicas das frações que apontaram a presença de flavonoides nas frações F4, F5, F10 e F12, corroboram com estudos anteriores que indicam os flavonoides como uma classe de metabólitos secundários responsáveis por este tipo de atividade. Considerando ainda que ácido gálico e ácido elágico, produtos de degradação dos taninos hidrolisáveis não apresentaram ação, o papel dos flavonoides fica evidenciado nesta ação. A ação das urolitinas, produtos de metabolização do ácido elágico pela microbiota intestinal, não pode ser descartada, já que estes metabólitos são absorvidos pelo intestino e alcançam a corrente sanguínea e o sistema urinário.

Desta forma, a padronização do extrato aquoso de *P. niruri* deve ser estabelecida em termos da concentração dos flavonoides glicosilados e, possivelmente, também dos taninos hidrolisáveis, cuja ação dos metabólitos não pode ser descartada.

7 REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, I. **Identificação de metabólitos secundários em extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* L. com ação no processo de formação de cristais de oxalato de cálcio.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2014.
- AMIN, Z. A., ALSHAWSH, M. A., KASSIM, M., ALI, H. M., ABDULLA, M.A, Gene expressional profiling reveals underlying molecular mechanism of hepatoprotective effect of *Phyllanthus niruri* on thioacetamide-induced hepatotoxicity in Sprague Dawley rats. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, n. 130, p. 160–170, 2013.
- ANJANEYULU, A. S. R.; JAGANMOHAN RAO, K. L. R. R.; SUBRAHMANYAM, C. Crystalline constituents of euphorbiaceae – XII: Isolation and structural elucidation of three new lignans from the leaves of *Phyllanthus amarus* Linn. **Tetrahedron**, v. 29, n.10, p. 1291–1298, 1973.
- BAGALKOTKAR, G.; SAGINEEDU, S. R.; SAAD M. S.; STANSLAS J. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 1559-1570, 2006.
- BAILLIE, T. A. et al. Drug metabolites in safety testing. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 182, n. 3, p. 188-196, 2002.
- BARROS, M.E.; SCHOR, N.; BOIM, M.A. Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization in vitro. **Urological research**, v. 30, n. 6, p. 374–397, 2003.
- 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.
- BIKRAM, S.; PAWAN, K.; ARAGHUNATH, S. T. An acyclic triterpene from *Phyllanthus amarus*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 7, p. 1980–1981, 1989.
- BOIM, M. A.; HEILBER, I. P.; SCHOR, N. *Phyllanthus niruri* as a promising alternative treatment for nephrolithiasis. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 36, n. 6, p. 657-664, 2010.
- BORGES, A.M.; CEOLIN, T.; BARBIERI, R.L.; HECK, R.M. La inserción de las plantas medicinales en la práctica de enfermería: un creciente desafío. **Enfermería Global**, v.18, 2010.

BRASIL. Decreto n. 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2006a. Seção 1, p. 2.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS/GM n. 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a política nacional de práticas integrativas e complementares (PNPIC) no SUS. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 mai. 2006b. Seção 1, p. 20.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Interministerial n. 2.960, de 09 de dezembro de 2008. Aprova o programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e cria o comitê nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 dez. 2008. Seção 1, p. 56.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. 5^a ed. Volumes 1 e 2. Brasília: Anvisa, 2010a.

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 e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 5 abr. 2010b. Seção 1, p.85.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da RDC n. 26, de 13 de Maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Poder executivo, Brasília, 13 mai. 2014.

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.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p.179-189, 2000.

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.

COLOMBO, R.; BATISTA, A. N. de L.; TELES, H. L.; SILVA, G. H.; BOMFIM, G. C. C.; BURGOS, R. C. R.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; PELÍCIA, C. R.; GUIMARÃES, F. M.; REIMBERG, M. C. H. Validated HPLC method for the standardization of *Phyllanthus niruri* (herb and commercial extracts) using corilagin as a phytochemical marker. **Biomedical Chromatography**, v. 23, n. 6, p. 573–80. 2009.

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, 2013a.

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, 2013b.

DA SILVA, N. C. **Comparação do perfil de metabólitos secundários em diferentes partes de *Phyllanthus niruri* L. (EUPHORBIACEAE)**. TCC. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2013.

DAUDON, M.; LETAVERNIER, E.; FROCHOT, V.; HAYMANN, J-P.; BAZIN, D.; D, JUNGERS, P. Respective influence of calcium and oxalate urine concentration on the formation of calcium oxalate monohydrate or dihydrate crystals. **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, p. 1504-1513, 2016.

DHAR, M. L., DHAR, M. M., DHAWAN, B. N., MEHROTRA, B. N., RAY, C. Screening of Indian plants for biological activity: Part I. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 6, p. 232–247, 1968.

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

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. ICH guideline M3 (R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. 2009. Disponível em <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002720.pdf> Acessado em: 20/junho/2018

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

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry – Safety Testing of Drug Metabolites. 2008. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079266.pdf>> Acessado em: 15/junho/2018.

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

GINJOM, I.; D'ARCY, B.; CAFFIN, N.; GIDLEY, M. Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. **Food Chemistry**, v. 125, p. 823-834, 2011.

GIRIBABU, N., RAO, P.V., KUMAR, K.P., MUNIANDY, S., SWAPNA REKHA, S., SALLEH, N. Aqueous extract of *Phyllanthus niruri* leaves displays in vitro antioxidant activity and prevents the elevation of oxidative stress in the kidney of streptozotocin-induced diabetic male rats. **Evidence- Based Complementary. And Alternative Medicine**, v. 2014, n. 834815, p. 1-10, 2014.

GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R. de M.B.; PAGOTTO, C.L.A. da C.; ZOCHER, D.H.T. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 3, n. 2, p. 97-102, 1998.

GUO, M.; ZHAO, B.; LIU, H.; ZHANG, L.; PENG, L.; QIN, L.; ZHANG, Z.; LI, J.; CAI, C.; GAO, X. A metabolomic strategy to screen the prototype components and metabolites of *shuang-huang-lian injection* in human serum by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, n. 241505, 2014.

GUPTA, D. R.; AHMED, B. Nirurin: a new prenylated flavanone glycoside from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 6, p. 958–963, 1984.

HASSARAJANI, S. A. e MULCHANDANI, N. B. Securinine type of alkaloids from

Phyllanthus niruri. **Indian Journal of Chemistry Section B – Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 801–803, 1990.

HOUSSAIN, R. A.; DICKEY, J. K.; ROSSER, M. P.; MATSON, J. A.; KOZZLOWSKY, M. R. A novel class of non-peptidic endothelin antagonists isolated from the medicinal herb *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 10, p. 1515–1520, 1995.

HUANG, Y. L.; CHEN, C. C.; OU, J. C. Isolintetralin – a new lignan from *Phyllanthus niruri*. **Planta Medica**, v. 58, n. 5, p. 473–474, 1992.

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

ISHIMARU, K.; YOSHIMATSU, K.; YAMAKAWA, T.; KAMADA, H.; SHIMOMURA, K.; Phenolic constituents in tissue cultures of *Phyllanthus niruri*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 2015–2018, 1992.

KAUR, N.; KAUR, B.; SIRHINDI G. Phytochemistry and Pharmacology of *Phyllanthus niruri* L.: A Review. *Phytotherapy Research*, v. 31, p. 980–1004, 2017.

KHANBABAEE, K; VAN REE, T. Tannins: Classification and definition. **Natural Product Reports**, v.18, n.6, p. 641–649, 2001.

KUHNERT, N.; JAISWAL, R.; ERAVUCHIRA, P.; EL-ABASSY, R.; VON DER KAMMER, B.; MATERNY, A. Scope and limitations of principal component analysis of high resolution LC-TOF-MS data: the analysis of the chlorogenic acid fraction in green coffee beans as a case study. **Analytical Methods**, v. 3, n. 1, p. 144–155, 2011.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, Article ID 162750, 2013.

KUMAR, S.; CHANDRA, P.; BAJPAI, V.; SINGH, A.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, D.K.; KUMAR, B. Rapid qualitative and quantitative analysis of bioactive compounds from *Phyllanthus amarus* using LC/MS/MS techniques. **Industrial Crops and Products**, n. 69, p. 143–152, 2015.

LIESKE, J. C.; DEGANELLO, S.; TOBACK, F. G. Cell–crystal interactions and kidney stone formation. **Nephron**, v. 81, n. 1, p. 8–17, 1999.

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.

LIPÍŇSKA, L.; KLEWICKA, E. SÓJKA, M. Structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v.13, n. 3, p. 289-299, 2014.

LLORENT-MARTÍNEZA, E. J.; SPÍNOLA, V.; GOUVEIA, S.; CASTILHO, P. C. HPLC-ESI-MSn characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa*. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 80-90, 2015.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativa e exótica**. 7 ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002, p. 215-216.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMNIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocioninas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R. W.; 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.

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.

MARTIUS, C.F.P., 1843. Systema Materiae Medicae Vegetabilis Brasiliensis, Lipsiae.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In.: Farmacognosia: da Planta ao medicamento. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Porto Alegre. Reimpressão: Artmed, 2017, p. 242.

KAWADA, M.; OHNO, Y.; RI, Y.; IKOMA, T.; YUUGETU H.; ASAI, T.; WATANABE, M.; YASUDA, N.; AKAO, S.; TAKEMURA, G.; MINATOBUCHI, S.; GOTOH, K.; FUJIWARA, H.; FUKUDA, K. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. **Anticancer Drugs**, v. 12, n. 10, p. 847–852.

MULCHANDANI, N. B.; HASSARAJANI, S. A. 4-methoxy-nor-securinine, a new alkaloid from *Phyllanthus niruri*. **Planta Medica**, v. 1, p. 104–105, 1984.

- MURUGAIYAH, V.; CHAN, K. L. Antihyperuricemic lignans from the leaves of K. **Planta Medica**, v. 72, p. 1262-1267, 2006.
- NARENDRA, K.; SWATHI, J.; SOWJANYA, K. M.; SATYA, K. *Phyllanthus niruri*: A Review on its Ethno Botanical, Phytochemical and Pharmacological Profile. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 9, p. 4681-4691, 2012.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.
- 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.
- NORDIN, B. E. C.; PEACOCK, M.; WILKINSON, R. Hypercalciuria and calcium stone disease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 1, p. 169-183, 1972.
- PAK, C.Y.C.; ADAMS-HUET, B.; POINDEXTER, J. R.; PEARLE, M. S.; PETERSON, R. D.; MOE, O. W. Relative effect of urinary calcium and oxalate on saturation of calcium oxalate. **Kidney International**, v. 66, p. 2032–2037, 2004.
- PANCHAGNULA, S. e SOMEPALI, V. Isolation, structure and synthesis of new diarylbutane lignans from *Phyllanthus amarus*: Synthesis of 5'-desmethoxy niranthin and an antitumor extractive. **Tetrahedron**, v. 47, n. 42, p. 8931–8940, 1991.
- PEARSON, P. G.; WIENKERS, L. C. **Handbook of Drug Metabolism**. 2^a Ed. Information Healthcare USA, p. 616, 2008.
- PEREIRA, R. M.; NASCENTES, C. C.; COSTA, L. M. Availability of Al, Cu, Fe, Mn, and Zn in Brazilian herbal teas. *Br J Anal Chem*, 06, p. 258–262; 2011.
- ROW, L. R., SRINIVASULU, C., SMITH, M., SUBBA RAO, G. S. R. New lignans from *Phyllanthus niruri* linn. **Tetrahedron Lett.** v. 5, p. 1557–1567, 1964.
- QUIAN-CUTRONE, J.; HUANG, S.; TRIMBLE, J.; LI, H.; LIN, P. F.; ALAM, M.; KLOHR, S. E.; KADOW, K. F. Nirurisode, a new HIV REV/RRE binding inhibitor from *Phyllanthus amarus*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 196–199, 1996.
- RICARDO, L. M.; PAULA-SOUZA, JULIANA.; ANDRADE, A.; BRANDÃO, M. G. L. Plants from the Brazilian Traditional Medicine: species from the books of the

Polish physician Piotr Czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 388–400, 2017.

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

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

SANTOS, 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.

SATYANARAYANA, P.; VENKATESWARLU, S. New seco and hydroxyl-lignans from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v.1, n. 1, p. 44-99, 1988.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMI, R.; DAUER, A.; AURA, A-M; SAURA-CALIXTO F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n. 2, p. 310-329, 2009.

SEWELL, R. D. E, RAFIEIAN-KOPAEI, M. The history and ups and downs of herbal medicine usage. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 3, n.1, p. 1-3, 2014.

SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades - degradações - modificações. São Paulo: Varela, 1996. Cap. 5: Deterioração e modificações químicas, físicas e enzimáticas de proteínas.

SHANKIL, N. A.; PANKAJ; KUMAR, J.; PANDEY, R. K.; SAXENA, D. B.; Nematicidal prenylated flavones from *Phyllanthus niruri*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 3, p. 759–764, 2008.

SILVA, M. J. A. D.; SALES, M. F. D. “*Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae) em Pernambuco, Brasil.” **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 79-98, 2007.

SIMIRGIOTIS, M. J.; QUISPE, C.; MOCAN, A.; VILLATORO, J. M.; ARECHE. C.; BÓRQUEZ, J.; SEPÚLVEDA, B.; ECHIBURU-CHAU. UHPLC high resolution orbitrap metabolomic fingerprinting of the unique species *Ophryosporus*

triangularis Meyen from the Atacama Desert, Northern Chile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 2, p. 179-187, 2017.

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

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Introduction to modern liquid chromatography. 3ª edição, New York: John Wiley & Sons, 2010. 912 p.

SOUSA, A. D.; SOARES T. H. R.; CANUTO, K. M.; RIBEIRO, P. R. V.; PEREIRA, R. C. A.; VIEIRA, R. F.; BRITO, E, S. Ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus amarus* and its composition evaluation by UPLC-QTOF. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 91-103, 2016.

SOUZA-MOREIRA, TATIANA M.; SALGADO, HÉRIDA R. N.; PIETRO, ROSEMEIRE C. L. R. O. Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.3, p. 435-440, 2010.

SPRENGER, R.D.F.; CASS, Q.B. Characterization of four *Phyllanthus* species using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1291, p. 97-103, 2013.

SUBEKI, S.; MATSUURA, H.; TAKAHASHI, K.; YAMASAKY, M.; YAMATO, O.; MAEDE, Y.; KATAKURA, K.; KOBAYASHI, S.; TRIMURNINGSIH, T.; CHAIRUL, C.; YOSHIHARA, T. Anti-babesial and antiplasmodial compounds from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 4, p. 537–539, 2005.

TOBISZEWSKI, M.; NAMIEŚNIKA, J.; PENA-PEREIRA, F. Environmental risk – based ranking of solvents by the combination of multimedia model and multi-criteria decision analysis. **Green Chemistry**, v. 19, p. 1034–1042, 2017.

TORRES, D. S. C.; CORDEIRO, I. A.; GIULIETTI, A. M. “O gênero *Phyllanthus* L. (Euphorbiaceae) na chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, p. 265-278, 2003.

UENO, H.; HORIE, S; NISHI, Y.; SHOGAWA, H.; KAWASAKI, M.; SUZUK, S.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; SHIMIZU, M.; OSHIWKI, M.; ORITA N.; Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. Geraniin, an angiotensinconverting enzyme inhibitor from "paraparai mi," *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 2, n. 51, p. 357-359, 1988.

UNANDER, D. W.; WEBSTER, G. L.; BLUMBERG, B. S. Records of usage or assays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). I. Subgenera Isocladus, Kirganelia,

Cicca and Emblica. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p. 233-264, 1990.

UNITED STATES PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY. ed. 34. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2015.

VERMAAK, A.; VILJOEN, A. M.; HAMMAN, J. H.; VAN VUUREN, S. F. The effect of simulated gastrointestinal conditions on the antimicrobial activity and chemical composition of indigenous South African plant extracts. **South African Journal of Botany**, v. 75, p. 594–599, 2009.

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.

YANG, B.; KORTESNIEMI, M.; LIU, P.; KARONEN, M.; SALMINEN, J. P. Analysis of hydrolyzable tannins and other phenolic compounds in emblic leafflower (*Phyllanthus emblica* L.) fruits by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 35, p. 8672-8683, 2012.

YEAP FOO, L. Amariinic acid and related ellagitannins from *Phyllanthus amarus*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 1, p. 217-224, 1995.

ZHANG, Y. J.; ABE, T.; TANAKA, T.; YANG, C.R.; KOUNO, I. Two new acylated flavanone glycosides from the leaves and branches of *Phyllanthus emblica*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin Journal**, v.50, n.6, p. 841-843, 2002.

ZHANG, X. International Regulatory Cooperation on Proper Use of Tradicional Medicine. Apresentação Oral em International Regulatory Cooperation on regulation of Herbal medicines (IRCH). 29 de março de 2006, Brasil.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTO, S. M. Flavonoides. In.: Farmacognosia: da Planta ao medicamento. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Porto Alegre. Reimpressão: Artmed, 2017, p. 229.

APÊNDICE 1

Tabela. Indução da cristalização de CaOx medida por densidade ótica (DO 590 nm), em urina humana, pela adição de NaOx na presença dos padrões ácido gálico e ácido elágico, do extrato aquoso de *P. niruri*, e das frações obtidas a partir do FGS, PR e FmetPR de *P. niruri*.

Amostras (mg/mL)	Antes da adição de NaOx (0 min)		Depois da adição de NaOx (90 min)	
	Absorbância	Transmitância	Absorbância	Transmitância
Controle	0,005	0,988	0,133	0,738
Ácido Gálico (0,5)	0,030	0,993	0,103	0,788
Ácido Gálico (1,0)	0,022	0,950	0,098	0,797
Ácido Elágico (0,5)	0,125	0,749	0,223	0,598
Ácido Elágico (1,0)	0,171	0,674	0,612	0,244
Ext. <i>P. niruri</i> (0,062)	0,002	0,995	0,133	0,736
Ext. <i>P. niruri</i> (0,125)	0,005	0,988	0,242	0,572
Ext. <i>P. niruri</i> (0,25)	0,003	0,993	0,400	0,398
Ext. <i>P. niruri</i> (0,5)	0,005	0,988	0,337	0,460
Ext. <i>P. niruri</i> (1,0)	0,005	0,988	0,423	0,377
PR (0,5)	0,040	0,912	0,130	0,741
PR (1,0)	0,010	0,977	0,123	0,753
FmetPR (0,5)	0,010	0,977	0,145	0,716
FmetPR (1,0)	0,017	0,961	0,147	0,712

APÊNDICE 2

Tabela. Indução da cristalização de CaOx medida por densidade ótica (DO 590 nm), em urina humana, pela adição de NaOx na presença das frações (F1 a F14) do extrato de *P. niruri*.

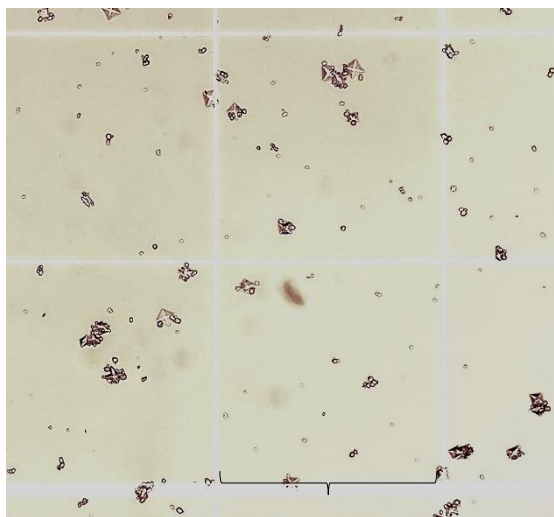
Amostras (mg/mL)	Antes da adição de NaOx (0 min)		Depois da adição de NaOx (90 min)	
	Absorbância	Transmitância	Absorbância	Transmitância
Controle	0,005	0,988	0,133	0,736
F 1 (0,5)	0,002	0,995	0,124	0,751
F1 (1,0)	0,000	1,000	0,127	0,746
F 2 (0,5)	0,004	0,99	0,168	0,679
F 2 (1,0)	0,000	1,000	0,196	0,636
F3 (0,0625)	0,000	1,000	0,131	0,739
F3 (0,125)	0,000	1,000	0,192	0,642
F3 (0,5)	0,006	0,986	0,323	0,475
F3 (1,0)	0,006	0,986	0,461	0,345
F4 (0,0625)	0,000	1,000	0,201	0,629
F4 (0,125)	0,000	1,000	0,207	0,620
F4 (0,5)	0,001	0,997	0,503	0,314
F4 (1,0)	0,005	0,988	0,623	0,238
F5 (0,015)	0,003	0,993	0,272	0,534
F5 (0,030)	0,017	0,961	0,286	0,517
F5 (0,5)	0,000	1,000	0,582	0,261
F5 (1,0)	0,005	0,988	0,661	0,218
F6 (0,5)	0,000	1,000	0,135	0,732
F6 (1,0)	0,003	0,993	0,192	0,642
F7 (0,5)	0,004	0,990	0,116	0,765
F7 (1,0)	0,005	0,988	0,186	0,651
F8 (0,015)	0,004	0,990	0,348	0,448
F8 (0,030)	0,001	0,997	0,392	0,405
F8 (0,5)	0,006	0,986	0,699	0,199
F8 (1,0)	0,018	0,959	1,006	0,098
F9 (0,015)	0,000	1,000	0,154	0,701
F9 (0,030)	0,000	1,000	0,47	0,338
F9 (0,5)	0,014	0,968	0,748	0,178
F9 (1,0)	0,037	0,918	0,89	0,128
F10 (0,015)	0,000	1,000	0,325	0,473
F10 (0,030)	0,000	1,000	0,429	0,372
F10 (0,5)	0,007	0,984	0,663	0,217
F10 (1,0)	0,023	0,948	0,904	0,124
F 11 (0,015)	0,000	1,000	0,15	0,707
F11 (0,030)	0,004	0,99	0,292	0,51

F11 (0,5)	0,023	0,948	0,603	0,249
F11 (1,0)	0,042	0,907	0,902	0,125
F12 (0,0625)	0,000	1,000	0,111	0,774
F12 (0,125)	0,021	0,952	0,357	0,439
F12 (0,5)	0,021	0,952	0,357	0,439
F12 (1,0)	0,015	0,966	0,456	0,349
F13 (0,5)	0,068	0,855	0,271	0,535
F13 (1,0)	0,106	0,783	0,265	0,543
F14 (0,5)	0,005	0,988	0,113	0,77
F14 (1,0)	0,009	0,979	0,094	0,805

APÊNDICE 3

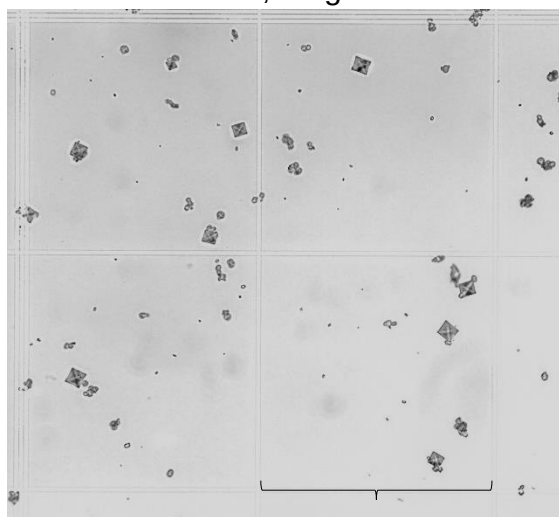
Figura. Microscopia ótica de cristais de CaOx na presença das frações F1 e F2 de *P. niruri* em diferentes concentrações (0,50 e 1,0 mg/mL)

F1 0,5 mg/mL



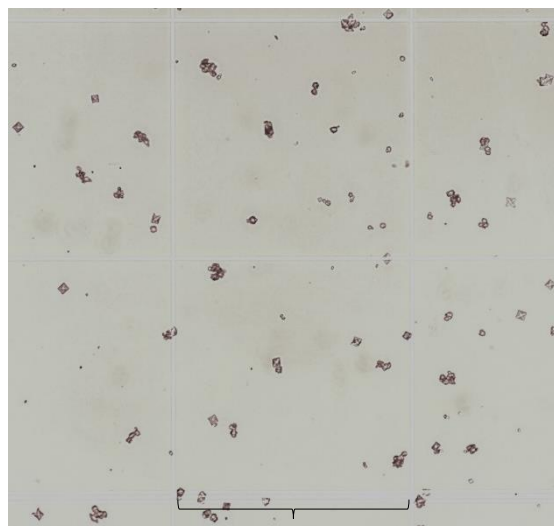
250 µm, 100X

F1 1,0 mg/mL



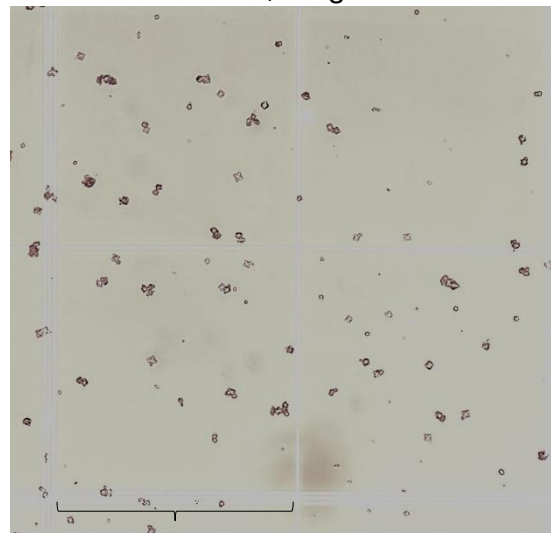
250 µm, 100X

F2 0,5 mg/mL



250 µm, 100X

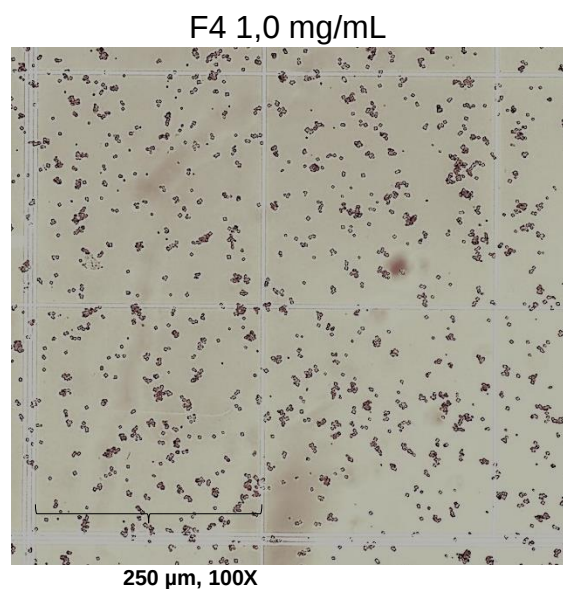
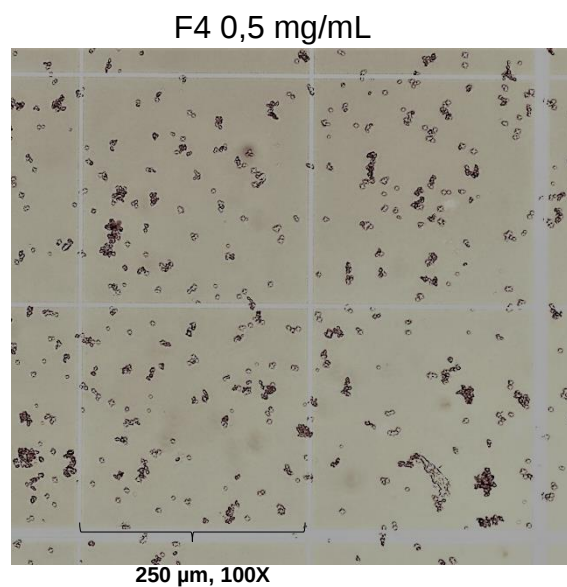
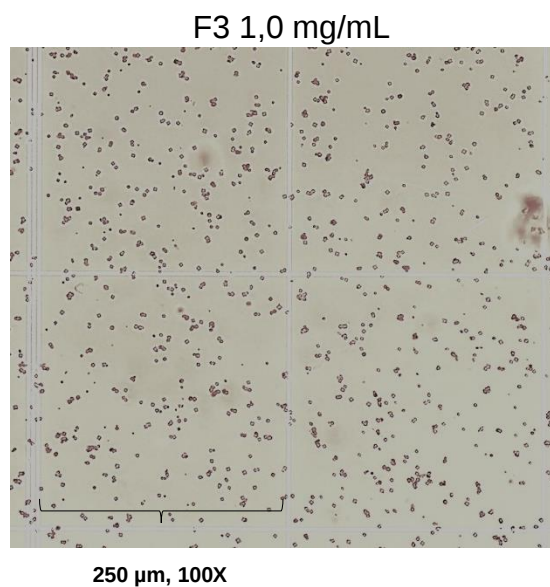
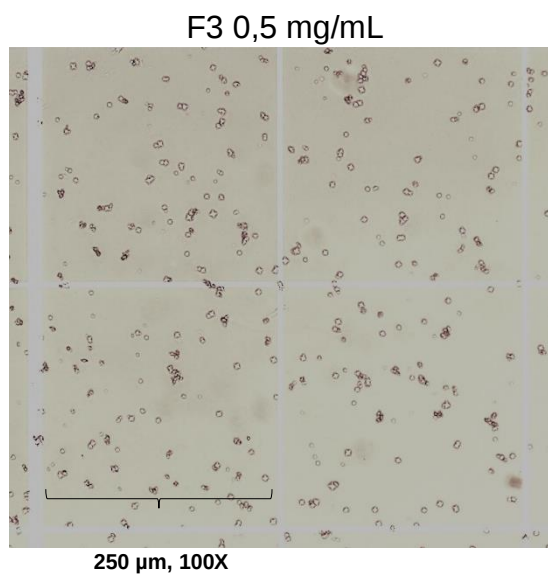
F2 1,0 mg/mL



250 µm, 100X

APÊNDICE 4

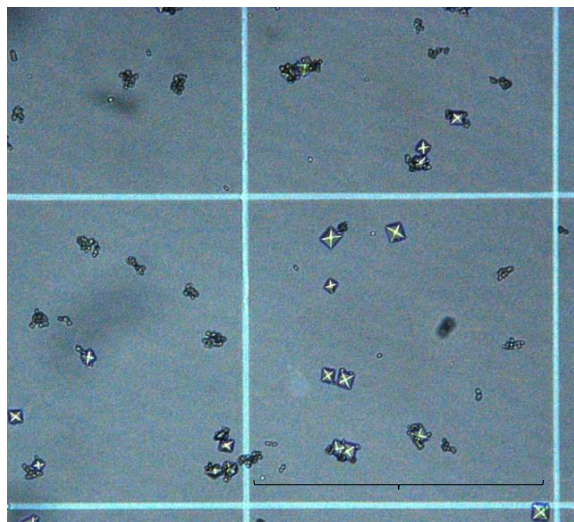
Figura. Microscopia ótica de cristais de CaOx na presença das frações F3 e F4 de *P. niruri* em diferentes concentrações (0,50 e 1,0 mg/mL).



APÊNDICE 5

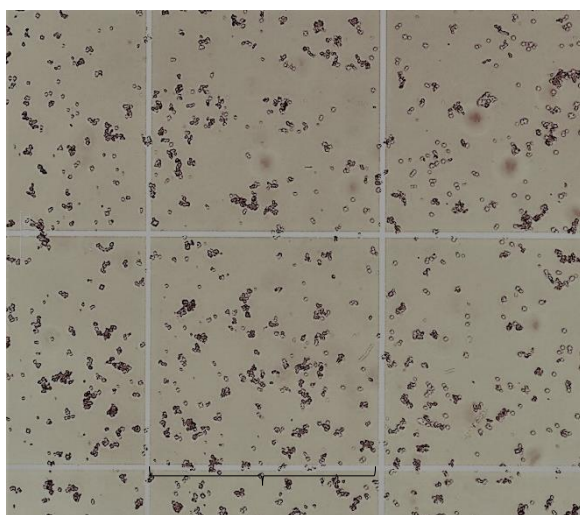
Figura. Microscopia ótica de cristais de CaOx na presença das frações F5 e F6 de *P. niruri* em diferentes concentrações (F5 0,015 e 1,0 mg/mL; F6 0,5 e 1,0 mg/mL).

F5 0,015 mg/mL



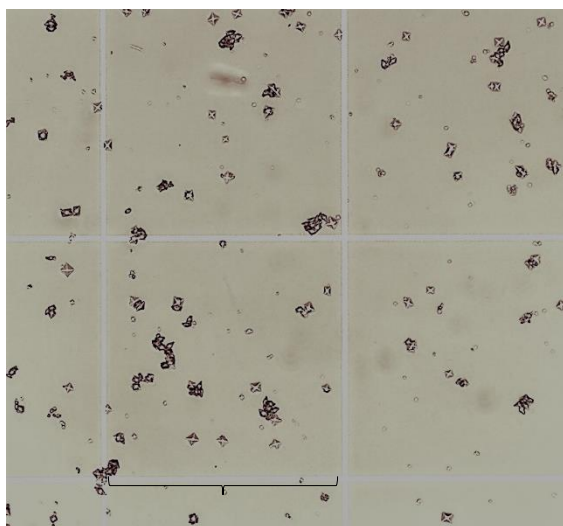
250 μm, 200X

F5 1,0 mg/mL



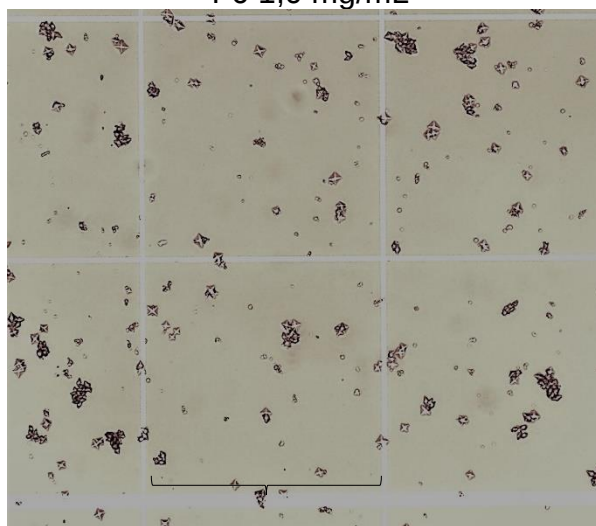
250 μm, 100X

F6 0,5 mg/mL



250 μm, 100X

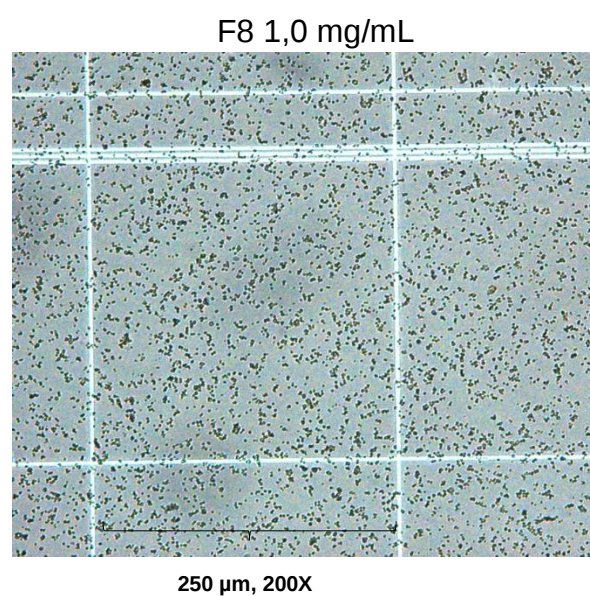
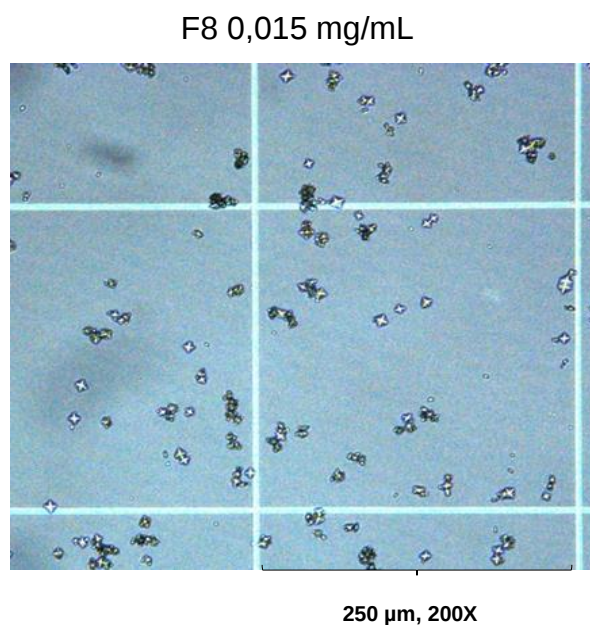
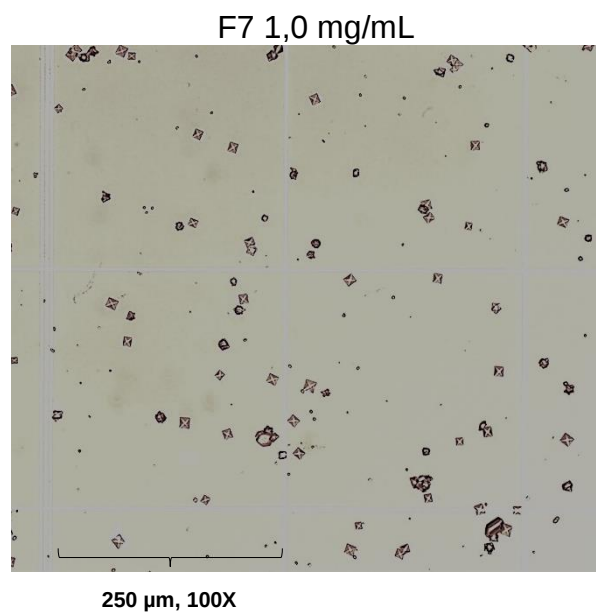
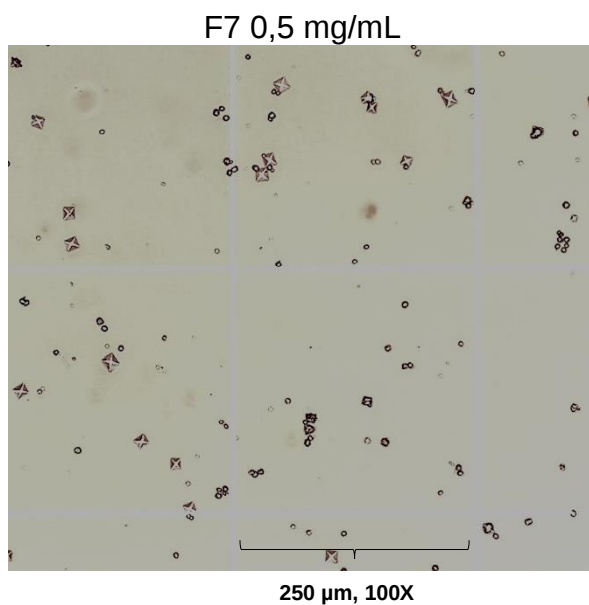
F6 1,0 mg/mL



250 μm, 100X

APÊNDICE 6

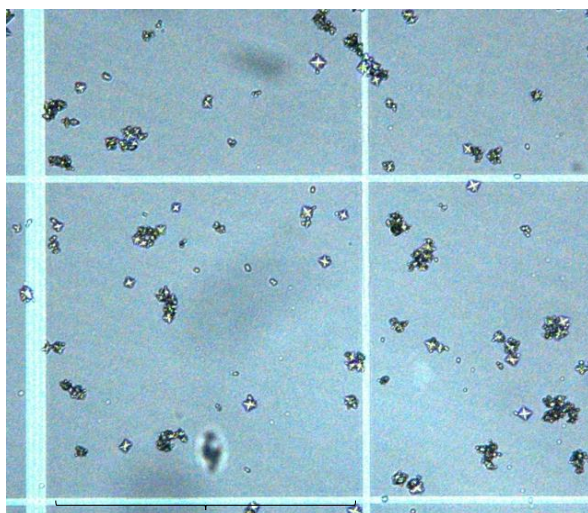
Figura. Microscopia ótica de cristais de CaOx na presença das frações F7 e F8 de *P. niruri* em diferentes concentrações (F7 0,5 e 1,0 mg/mL; F8 0,015 e 1,0 mg/mL).



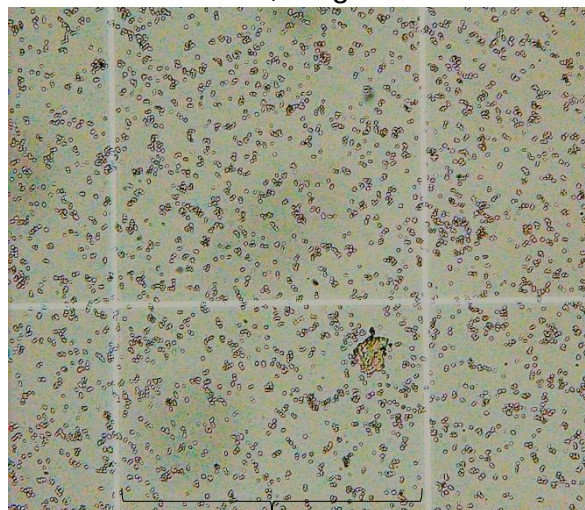
APÊNDICE 7

Figura. Microscopia ótica de cristais de CaOx na presença das frações F9 e F10 de *P. niruri* em diferentes concentrações (F9 0,015 e 1,0 mg/mL, F10 0,015 mg/mL e F11 0,015 mg/mL).

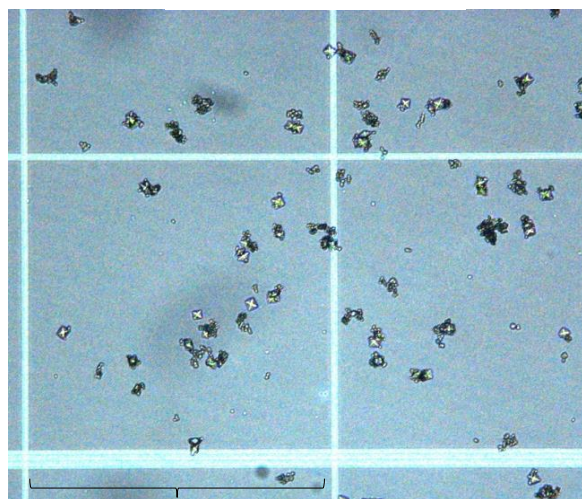
F9 0,015 mg/mL

250 μ m, 200X

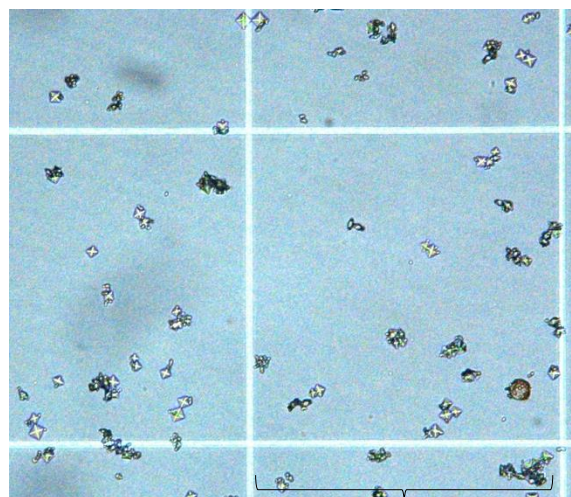
F9 1,0 mg/mL

250 μ m, 200X

F10 0,5 mg/mL

250 μ m, 200X

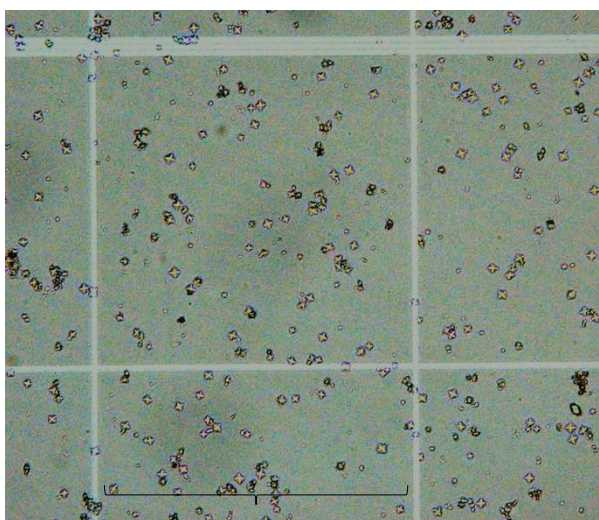
F10 1,0 mg/mL

250 μ m, 200X

APÊNDICE 8

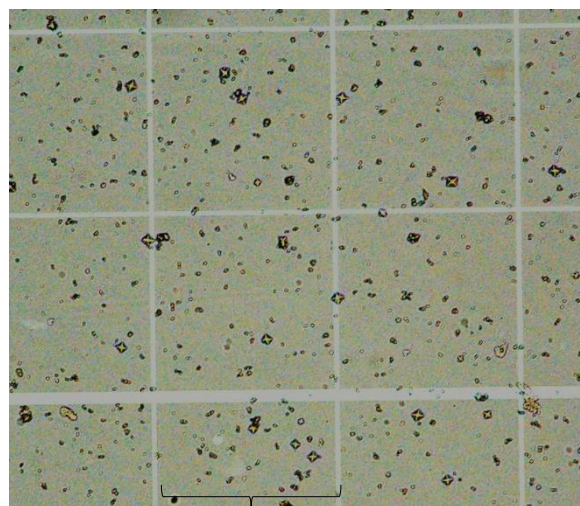
Figura. Microscopia ótica de cristais de CaOx na presença das frações F12 (1,0 mg/mL), F13 (0,5 e 1,0 mg/mL) F14 (0,5 mg/mL) de *P. niruri*.

F12 1,0 mg/mL



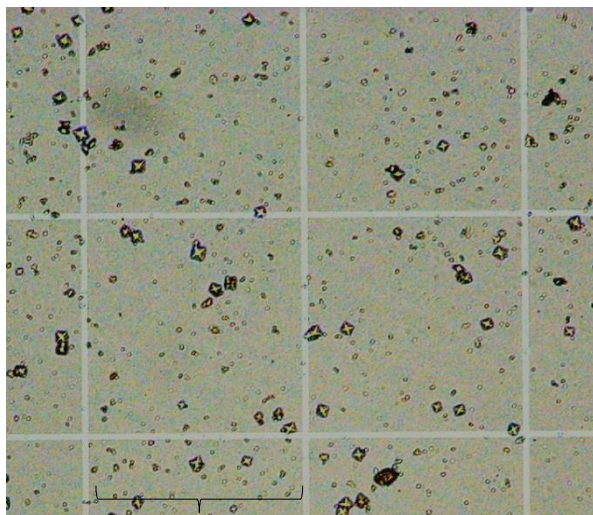
250 μm, 200X

F13 0,5 mg/mL



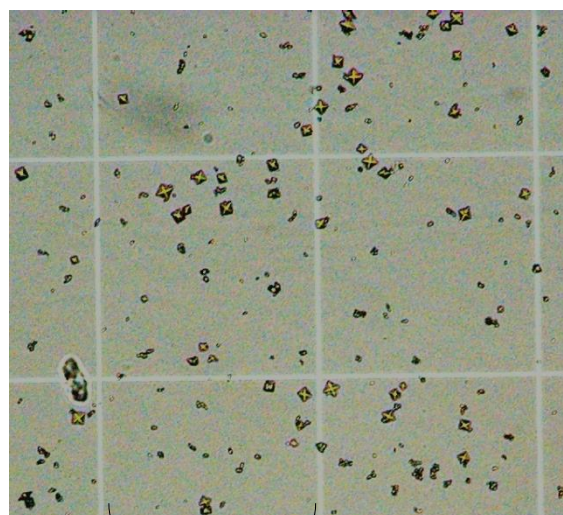
250 μm, 100X

F13 1,0 mg/mL



250 μm, 100X

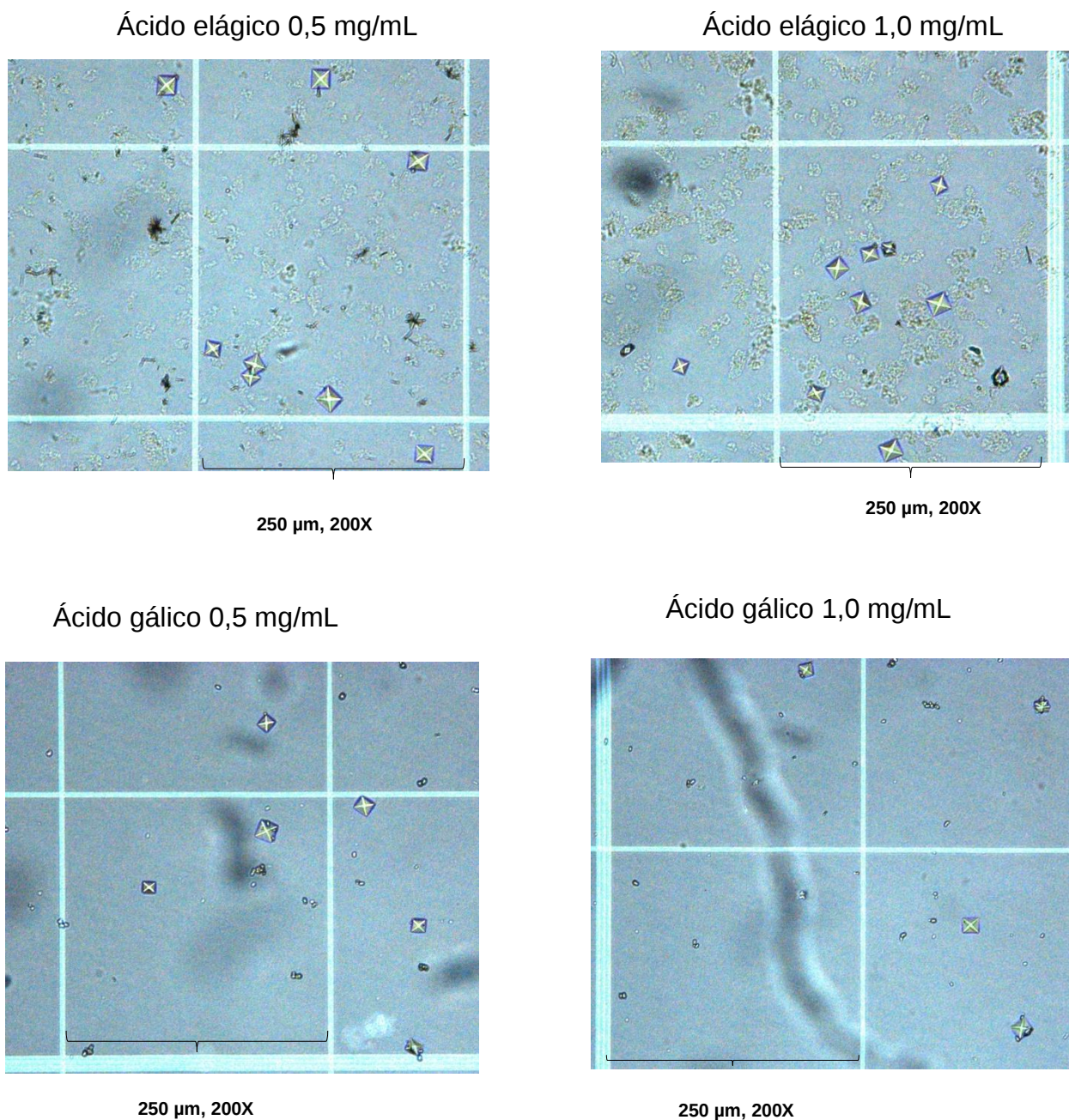
F14 0,5 mg/mL



250 μm, 100X

APÊNDICE 9

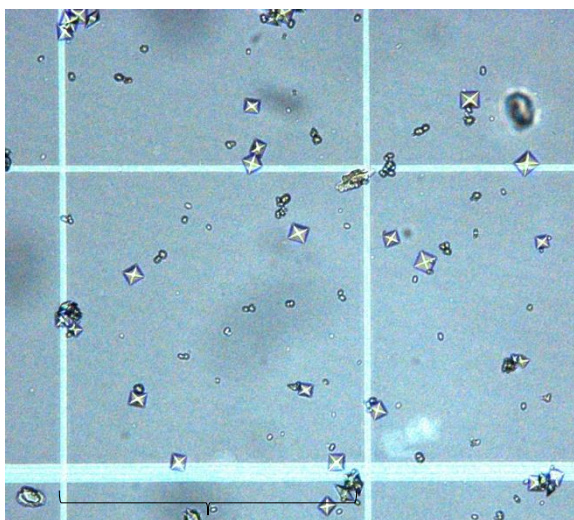
Figura. Microscopia ótica de cristais de CaOx na presença dos padrões ácido elágico e ácido gálico (0,5 e 1,0 mg/mL).



APÊNDICE 10

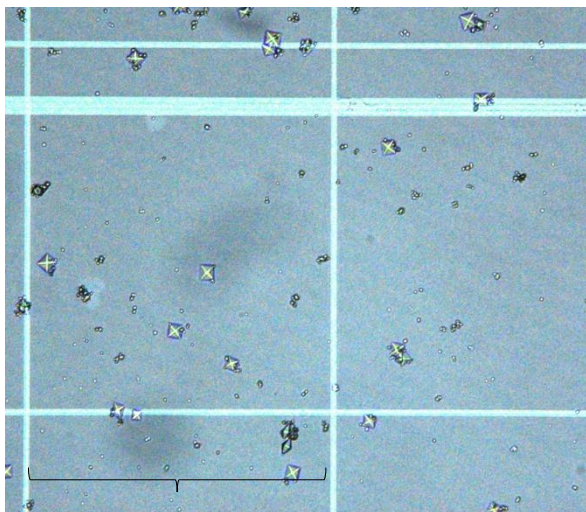
Figura. Microscopia ótica de cristais de CaOx na presença do PR de *P. niruri* (0,25 mg/mL) e FmetPR de *P. niruri* F13 (0,25 e 0,5 mg/mL).

PR de *P. niruri* 0,25 mg/mL



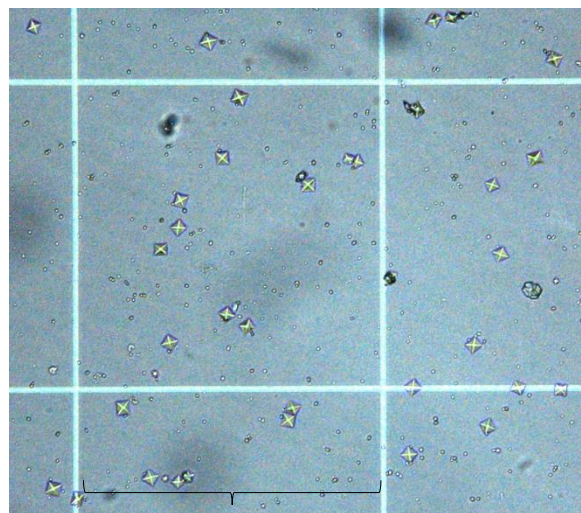
250 μm, 200X

FmetPR de *P. niruri* 0,25 mg/mL



250 μm, 200X

FmetPR de *P. niruri* 0,5 mg/mL



250 μm, 200X