

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Química de Araraquara

Estudo comparativo dos constituintes químicos
de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e do
medicamento "V"

Miriam Verginia Lourenço

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Tese apresentada ao Instituto de Química de
Araraquara da Universidade Estadual Paulista para
obtenção do título de Doutor em Química,
área de concentração: Química analítica

Araraquara – SP
2001

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi Santiago da Silva

Instituto de Química de Araraquara - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Prof. Dr. Wagner Vilegas

Instituto de Química de Araraquara - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

MIRIAM VERGINIA LOURENÇO

1. Dados pessoais

- 1.1. **Nascimento:** 11/12/63
- 1.2. **Nacionalidade:** Brasileira
- 1.3. **Naturalidade:** Leme – SP
- 1.4. **Estado Civil:** solteira
- 1.5. **Filiação – Pai:** Antonio Lourenço
Mãe: Maria Ap. Franco Lourenço
- 1.6. **Profissão:** Engenheira Química
- 1.7. **Documento de Identidade:** 16.389.128
- 1.8. **Cadastro de Pessoa Física:** 035.823.778-57
- 1.9. **Endereço:** Rua José Veríssimo, 860 – Ribeirão Preto - SP

2. Formação Acadêmica

- 2.1. Engenheira Química, curso de Engenharia Química pela Universidade de Ribeirão Preto, concluído em setembro de 1992.
- 2.2. Mestrado em Química, Área de concentração: Química Analítica realizado no Instituto de Química de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, concluído em 22 de setembro de 1995, menção distinção e louvor.
- 2.3. Doutorado em Química, Área de concentração: Química Analítica, realizado no Instituto de Química de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, concluído em 18 de julho de 2001, menção distinção.

3. Trabalhos científicos publicados

Lourenço, M. V. ; Pereira, P. S.; Dias, D. A.; França, S. C. Enhancement of triterpenes contents in *Tabernaemontana catharinensis* suspension culture treated with biotic elicitors. **Bolletino Chimico Farmaceutico**, v.138, p.76, 1999.

França, S. C.; Lourenço, M. V.; Roberto, P. G.; Januário, A. H. Root culture of *Physalis angulata* induced by *Agrobacterium rhizogenes* for production of secondary metabolites. **Acta Horticulturae**, v. 502, p. 389, 1999.

Pereira, A. M. S.; Araujo, A. R.; Bertoni, B.W.; Lourenço, M.V.; Apezato-Gloria, B.; Januário, A. H.; França, S. C. Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.60 ; p.47-53, 2000.

4. Trabalhos científicos submetidos a publicação

Carlos, I. Z.; Raddi, M. S. G.; Duó, S. R.; Devienne, K. F.; Lourenço, M. V.; Vilegas, W. Citotoxicity of the two furanocoumarins and their effects on the releasement of reactive nitrogen and oxygen intermediates by macrophages. **Biological Pharmacology Bulletin**.

Varanda, E. A.; Pozetti, G. L.; Lourenço, M. V.; Vilegas, W.; Raddi, M. S. G. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the *Salmonella*/microsome assays and chromosomal aberrations in CHO cells. **Journal of Ethnopharmacology**.

Dedico:

A minha mãe *Maria Aparecida* que
jamais deixou de acreditar em mim e
mesmo tendo partido me deixou
seu exemplo e amor.

A meu pai *Antonio* que também partiu
mas sei que olha por mim.

A meus filhos *Julia e Arthur* que chegaram
no desenvolvimento deste trabalho
e deram mais brilho à minha vida.

Agradecimentos

A *Deus* pela vida e por tudo que nela existe

A minha irmã *Luciana* pois sem sua ajuda jamais teria conseguido.

Ao *Rubens* por me apoiar no caminho que decidi seguir.

Aos meus irmãos *Sônia, Ana e Marcos* por acreditarem em mim.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas

que não foi apenas orientador mas amigo.

Passando sempre seus conhecimentos

de forma a enriquecer os meus.

Muito obrigada pelo convívio

durantes todos esses anos.

A Profa. Dra. Suzelei de Castro França

pela oportunidade, amizade, confiança

e por me ensinar a pesquisar e

transmitir conhecimentos.

A Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda pela colaboração nesse trabalho e principalmente pela amizade.

A Profa. Dra. Stella Maria G. Raddi pela contribuição nesse trabalho e também pela amizade.

Aos amigos Fábio, Roberta e Lourdes que embora o tempo de convivência tenha sido curto foi suficiente para alicerçar uma amizade.

Ao Alberto Alécio por ser amigo e por me ajudar sempre.

Ao Prof Dr. Nivaldo Borella pelas análises por RMN.

Aos funcionários da seção de pós-graduação do IQ pela atenção e prestatividade durante todos esses anos.

A Profa. Dra. Janete Vilegas pelas análises por CG-EM.

Aos amigos da Unidade de Biotecnologia Vegetal da UNAERP pelos bons momentos e incentivo, especialmente à Patrícia, Leonice e Paulo pelos momentos de descontração.

A Priscila pela correção das referências.

A UNAERP pela oportunidade.

A CAPES pela bolsa concedida.

Sumário

Sumário de figuras	iv
Sumário de tabelas	vi
Sumário de esquemas	viii
Lista de abreviaturas	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
1- Introdução	01
Plantas Medicinais	01
<i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul	02
As furanocumarinas	06
Citotoxicidade das furanocumarinas	09
O vitiligo	11
Ensaio biológicos	17
Análise química de produtos naturais vegetais	19
2- Objetivos	22
3- Materiais e métodos	23
3.1- Materiais e equipamentos utilizados	23
3.1.1- Materiais utilizados	23
3.1.2- Solventes utilizados	23
3.1.3- Equipamentos utilizados	23
3.2- Material vegetal	25
3.3- Avaliação do rendimento das extrações	27
3.4- Extratos e frações	27
3.5- Análises qualitativas	32
3.5.1- Análises por CG/EM	32
3.5.2- Análises por CLAE/DAD	32
3.6- Análises quantitativas	33

3.6.1-	Quantificação de psoraleno e bergapteno no córtex das raízes (CRM e CRHL) e no medicamento "V" (VM e CHL)	33
3.6.1.1-	Determinação da curva de calibração de psoraleno	33
3.7-	Estudo dos constituintes majoritários dos extratos CRM (córtex das raízes) e FM (folhas)	34
3.7.1-	Isolamento de psoraleno e bergapteno do extrato CRM	34
3.7.2-	Fracionamento do extrato CRM por CCCG (cromatografia em contra corrente por gotejamento)	35
3.7.3-	Fracionamento do extrato FM por CPG (cromatografia de permeação em gel)	36
3.7.3.1-	Purificação da fração FM7 por CLAE preparativo	37
3.7.3.2-	Identificação de Bg ₃ e Bg ₄	38
3.8-	Ensaio biológicos	39
3.8.1-	Ensaio de citotoxicidade	39
3.8.1.1-	Procedimento	39
3.8.1.2-	Técnica do MTT-tetrazólio	40
3.8.1.3-	Determinação do índice citotóxico (IC ₅₀)	40
3.8.2-	Ensaio de mutagenicidade	40
3.8.2.1-	Preparo do inóculo de <i>S. typhimurium</i>	42
3.8.2.2-	Confirmação dos genótipos das linhagens de <i>S. typhimurium</i>	42
	a) auxotrofia para histidina	42
	b) mutação <i>rfa</i>	43
	c) Plasmídeo pKM101	43
	d) Deleção <i>uvrB</i>	43
	e) Taxa de reversão espontânea	44
3.8.2.3-	Sistema de ativação metabólica	44
3.8.2.4-	Procedimento do ensaio (Maron & Ames, 1983)	45
4-	Resultados e Discussão	46
4.1-	Avaliação do rendimento das extrações	46
4.2-	Análises qualitativas	47

4.2.1- CG/EM	47
4.2.2- CLAE/DAD	54
4.3- Análises quantitativas	72
4.3.1-Quantificação de psoraleno e bergapteno nos extratos do córtex das raízes (CRM e CRHL) e do medicamento "V" (VH e VHL)	73
4.4- Identificação das substâncias isoladas dos extratos CRM e FM	75
4.4.1- Extrato CRM	76
4.4.2- Extrato FM	81
4.5- Ensaio biológico	97
4.5.1- Ensaio de citotoxicidade	97
4.5.2- Ensaio de mutagenicidade	99
5- Conclusão	107
6- Considerações finais e perspectivas futuras	110
7- Referência Bibliográfica	111

Sumário de figuras

Figura 1	<i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul	04
Figura 2	Cumarinas encontradas no gênero <i>Brosimum</i>	05
Figura 3	Estrutura básica das cumarinas	06
Figura 4	Cicloadutos de furanocumarinas com a base púrica timina	08
Figura 5	Regiões da perna (joelhos) afetada por vitiligo	12
Figura 6	Queimaduras de pele causadas por psoralenos	14
Figura 7	Espectros no UV do psoraleno e bergapteno	21
Figura 8	Dois indivíduos de <i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul	26
Figura 9	CG/EM de extrato hexânico do córtex das raízes (CRHx)	50
Figura 10	CG/EM de extrato hexânico do medicamento "V"(VHx)	51
Figura 11	CG/EM de extrato CHCl ₃ de córtex das raízes (CRC)	52
Figura 12	CG/EM de extrato CHCl ₃ deo medicamento "V" (VC)	53
Figura 13	CLAE de extrato metanólico do córtex da raízes (CRM)	55
Figura 14a	Espectros no UV do córtex da raiz e do padrão de psoraleno	56
Figura 14b	Espectros no UV do córtex da raiz e do padrão de bergapteno	56
Figura 15	CLAE de extrato metanólico de folhas (FM)	57
Figura 16	CLAE de extrato metanólico de galhos (GM)	58
Figura 17	CLAE de extrato metanólico de cerne das raízes (CM)	59
Figura 18	CLAE de extrato metanólico do látex (LM)	60
Figura 19	CLAE de extrato metanólico do medicamento "V" (VM)	61
Figura 20	Espectro no UV do com tr=6,27 min e do padrão do fator PP	62
Figura 21	CLAE do extrato aquoso liofilizado do córtex das raízes (CRHL)	65
Figura 22	CLAE da fração CHCl ₃ do córtex das raízes (Fr.CRHC)	66
Figura 23	CLAE da fração n-BuOH do córtex das raízes (Fr.CRHB)	67
Figura 24	CLAE do extrato aquoso liofilizado do medicamento "V" (VHL)	68
Figura 25	CLAE da fração CHCl ₃ do medicamento "V" (Fr.VHC)	69
Figura 26	CLAE da fração n-BuOH do medicamento "V" (Fr.VHB)	70
Figura 27	Curva de calibração de psoraleno	73

Figura 28	RMN ¹ H da mistura psoraleno/bergapteno	78
Figura 29	RMN ¹ H de (+)-(2'S,3'R)-3-hidroximarmesina	79
Figura 30	RMN ¹³ C de (+)-(2'S,3'R)-3-hidroximarmesina	80
Figura 31	5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona (Bg ₃)	82
Figura 32	5,7,3',4'-tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol (Bg ₄)	82
Figura 33	Espectro no UV do pico com tr=12,57min do extrato metanólico das folhas e de Bg ₃	83
Figura 34	Espectro no UV do pico com tr=16,25min do extrato metanólico das folhas e de Bg ₄	83
Figura 35	ES/EM de 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona (Bg ₃) (modo positivo)	86
Figura 36	ES/EM de 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona (Bg ₃) (modo negativo)	86
Figura 37	ES/EM de 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol (Bg ₄) (modo positivo)	87
Figura 38	ES/EM de 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol (Bg ₄) (modo negativo)	87
Figura 39	RMN ¹ H de 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona (Bg ₃)	89
Figura 40	Espectro de gHMBC de 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona (Bg ₃)	90
Figura 41	Espectro de gHBQC de 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona (Bg ₃)	91
Figura 42	RMN ¹ H de 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol (Bg ₄)	92
Figura 43	Espectro de gHMBC de 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol (Bg ₄)	93
Figura 44	RMN ¹³ C de 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol (Bg ₄)	94

Sumário de tabelas

Tabela 1	Exemplos de plantas contendo cumarinas	07
Tabela 2	Concentração das soluções usadas para obtenção de curva de calibração de psoraleno	34
Tabela 3	Seqüência de eluição da fase móvel e coleta de frações no isolamento de psoraleno e bergapteno do córtex das raízes	35
Tabela 4	Controles positivos usados nos ensaios de mutagenicidade com linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>	41
Tabela 5	Massas e resíduos secos e porcentagens provenientes das extrações metanólicas do córtex das raízes	46
Tabela 6	Fragmentos relevantes obtidos por CG/EM dos extratos CHCl ₃ do córtex das raízes	49
Tabela 7	Concentrações das soluções-padrão de psoraleno e áreas correspondentes da curva de calibração	72
Tabela 8	Massas e porcentagem de psoraleno e bergapteno nos extratos do córtex das raízes (CRM e CRHL) e do medicamento "V" (VM e VHL)	74
Tabela 9	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H do Psoraleno e do Bergapteno (CDCl ₃)	76
Tabela 10	Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C de (+)-(2'S,3'R)-3-hidroxiarmesina (DMSO-d ₆)	77
Tabela 11	Fragmentos de EM relevantes de Bg ₃ e Bg ₄ (PI 100V modo positivo)	84
Tabela 12	Fragmentos de EM relevantes de Bg ₃ e Bg ₄ (NI 70V modo negativo)	84
Tabela 13	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C de Bg ₃ e Bg ₄ (DMSO-d ₆)	88
Tabela 14	Índices citotóxicos (IC ₅₀) obtidos através da técnica de MTT-tetrazólio (MTT) para extratos do vegetal <i>B. gaudichaudii</i> e do medicamento "V"	98

Tabela 15	Atividade mutagênica dos extratos aquoso e metanólico e da fração n-BuOH do córtex das raízes de <i>B. gaudichaudii</i> em linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>	101
Tabela 16	Razão de mutagenicidade para extratos e frações do córtex das raízes de <i>B. gaudichaudii</i> em linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>	102
Tabela 17	Atividade mutagênica dos extratos aquoso e metanólico e da fração n-BuOH do medicamento "V" em linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>	103
Tabela 18	Razão de mutagenicidade para extratos e frações do medicamento "V" em linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>	104

Sumário de Esquemas

Esquema 1	Extratos e frações obtidos do vegetal <i>B. gaudichaudii</i>	29
Esquema 2	Extratos e frações obtidos do medicamento "V"	30
Esquema 3	Análises realizadas em extratos e frações do vegetal <i>B. gaudichaudii</i>	31
Esquema 4	Análises realizadas nos extratos e frações do medicamento "V"	31
Esquema 5	Isolamento dos flavonóides do extrato de folhas (FM) de <i>B. gaudichaudii</i>	38

Lista de abreviaturas

BAW	n-butanol:ácido acético:água
CCCG	Cromatografia em contra corrente por gotejamento
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CG	Cromatografia gasosa
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
CLAE/RMN	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à ressonância magnética nuclear
CLAE/UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta
CLAE/DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector com arranjo de foto diodo
CPG	Cromatografia de permeação em gel
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EM	Espectrometria de massas
ES/EM	Espectrometria de massas Electrospray
Fig.	Figura
MeOH	Metanol
n-BuOH	n-butanol
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
tr	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
DNA	Ácido desoxirribonucléico

RNA	Ácido ribonucléico
"V"	Denominação codificada do nome fantasia do medicamento usado
NP/PEG	Natural Product/Polietilene-glicol

Lista de abreviaturas de extratos e frações

FHx, FC, FM	extratos hexânico, clorofórmico e metanólico de folhas
GHx, GC, GM	extratos hexânico, clorofórmico e metanólico de galhos
CRHx, CRC, CRM:	extratos hexânico, clorofórmico e metanólico de córtex das raízes
CRH, CRHL	extrato aquoso e extrato aquoso liofilizado do córtex das raízes
Fr.CRHC,	fração clorofórmica obtida da partição do extrato aquoso do córtex das raízes (CRH) com CHCl ₃
Fr.CRHB	fração n-butanólica obtida da partição do extrato aquoso do córtex das raízes (CRH) com n-BuOH
LM	extrato metanólico do látex
CeHx, CeC e CeM	extratos hexânico, clorofórmico e metanólico do cerne das raízes
VHx, VC, VM	extratos hexânico, clorofórmico e metanólico do medicamento "V"
VH e VHL	extrato aquoso e aquoso liofilizado do medicamento "V"
Fr.VHC,	fração clorofórmica obtida da partição do extrato aquoso do medicamento "V" (VH) com CHCl ₃
Fr. VHB	fração n-butanólica obtida da partição do extrato aquoso do medicamento "V" (VH) com n-BuOH

RESUMO

Brosimum gaudichaudii Trécul é uma planta medicinal utilizada na medicina tradicional no tratamento de doenças de pele, assim como o vitiligo. As furanocumarinas lineares psoraleno e bergapteno são os principais compostos responsáveis por esse efeito.

O medicamento “V” produzido a partir do vegetal *Brosimum gaudichaudii* é usado pela população no tratamento do vitiligo, por ser alegado que o mesmo contém bergapteno. Entretanto, nada é conhecido a respeito do conteúdo de bergapteno nesse medicamento. Além disso, o uso de furanocumarinas tem sido relacionado ao aumento na incidência de câncer de pele e outras desordens assim como mutação gênica e aberrações cromossômicas em humanos.

Este trabalho reporta análises qualitativas e quantitativas do vegetal *B. gaudichaudii* e do medicamento “V” por CLAE-DAD e CG-EM. As análises mostraram que as furanocumarinas estão presentes em maiores quantidades no córtex das raízes do vegetal, e que o medicamento “V” contém derivados de ácidos graxos e apenas pequenas quantidades de psoraleno e bergapteno.

De acordo com a composição do extrato polar de *B. gaudichaudii* e do medicamento “V”, os flavonóides 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona e 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol foram identificados no extrato metanólico das folhas de *B. gaudichaudii*, mas estão ausentes no medicamento “V”.

Ensaio biológico para mutagenicidade mostraram que os extratos aquoso e metanólico do córtex das raízes do vegetal são mutagênicos enquanto que os do medicamento não apresentam mutagenicidade.

Ensaio citotóxico preliminar mostrou que os extratos metanólicos do córtex das raízes e do medicamento “V” são mais citotóxicos que seus respectivos extratos aquosos.

Concluindo, o vegetal *Brosimum gaudichaudii* e o medicamento “V” mostraram apresentar várias diferenças não somente em suas composições químicas mas também nas propriedades biológicas avaliadas nesse estudo.

Abstract

Brosimum gaudichaudii Trécul is a medicinal plant that has been used in traditional medicine to treat skin diseases such as vitiligo. The linear furanocoumarins psoralen and bergapten are the main compounds responsible for this effect.

Drug "V" produced from *B. gaudichaudii* has been used by the population for the treatment of vitiligo because its alleged content of bergapten. However, nothing is known about the bergapten content in drug V. Furthermore, the use of furanocoumarins has been linked to a higher incidence of skin cancer and other disorders such as gene mutations and chromosomal aberrations in humans.

This work reports the qualitative and quantitative analyses of *B. gaudichaudii* and drug "V" by HPLC and CG-MS. The analyses showed that furanocoumarins are present in large amounts in the root bark of the plant, and that drug "V" contains fatty acid derivatives and only small amounts of psoralen and bergapten.

Concerning the polar composition of *B. gaudichaudii* and drug V, the flavonoids 5,7,3',4'-tetrahydroxy-6-C-glucopyranosyl flavone and 5,7,3',4'-tetrahydroxy-3-O- β -galactopyranosyl flavonol were identified in the methanolic extract of *B. gaudichaudii* leaves, but are absent in drug "V". .

Biological assays showed that the aqueous and methanolic extracts of the root bark of the plant are mutagenic, while drug "V" does not show mutagenicity.

Preliminary cytotoxic assays showed that methanolic extracts of the root bark and of drug "V" are more cytotoxic than their respective aqueous extracts.

In conclusion, *B. gaudichaudii* and drug "V" seems to present several differences not only in their chemical composition but also in the biological properties evaluated in this study.

1- INTRODUÇÃO

PLANTAS MEDICINAIS

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Os produtos encontrados na natureza revelam uma grande diversidade em termos de estruturas e propriedades físico-químicas e biológicas (Wall & Wani, 1996).

O uso de plantas medicinais está cada vez mais difundido, não só no Brasil, como também em outros países, especialmente na Europa. Grande parte das espécies vegetais utilizadas pela população brasileira não possui ação farmacológica comprovada, estudo químico realizado e nem mesmo estudos toxicológicos (Bacchi, 1996).

Apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foi estudada em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies foram estudadas em suas propriedades medicinais (Garcia *et al.*, 1996). Destas, 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde para comercialização (Ortega *et al.*, 1989).

Estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões de faturamento em 1996 da indústria farmacêutica nacional sejam originados de medicamentos derivados de plantas (Garcia *et al.*, 1996).

Atualmente de cada 20 medicamentos vendidos nas farmácias do país, um é fitoterápico, sendo que somente alguns tem ação cientificamente comprovada (Revista Época, 2001).

Segundo a legislação, um medicamento fitoterápico é um medicamento farmacêutico obtido por processos tecnologicamente adequados, empregando-se exclusivamente matérias primas vegetais, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (Brasil, 2000).

A RDC-17 de 24/02/2000 dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e cita que, em virtude da definição de medicamento fitoterápico nesta Resolução e da necessidade de reavaliar os medicamentos registrados até 31/01/95 de forma que atendam aos critérios atuais de segurança, eficácia e qualidade. Os medicamentos que até 31/01/2001 não apresentarem os estudos sobre toxicidade do medicamento fitoterápico as bulas e rótulos dos mesmos deverão conter os seguintes dizeres: "MEDICAMENTO EM ESTUDO PARA AVALIAÇÃO CIENTÍFICA DA TOXICIDADE E DAS INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS".

Por esses motivos, é imprescindível que se realizem estudos interdisciplinares que comprovem a ação de extratos e dos princípios ativos presentes no vegetal assim como sua toxicidade. Este é o caso de *Brosimum gaudichaudii* que descreveremos a seguir.

***Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae)**

A família Moracea possui cerca de 70 gêneros e 3000 espécies distribuídas largamente nos trópicos, subtropicais e em regiões temperadas. No Brasil ocorrem 257 espécies desta família. Essa família é composta por árvores, arbustos ou ervas, geralmente lactescentes, monóicos ou dióicos. Ocorre um grande dimorfismo entre as folhas de indivíduos jovens e adultos (Carauta, 1996).

Os gêneros da família Moraceae são *Sorocea*, *Clarisia*, *Maclura*, *Pseudolmedia*, *Helicostylis*, *Naucleopsis*, *Brosimum*, *Dorstenia*, *Ficus*, *Coussapoa*, *Pourouma* e *Cecropia* (Carauta, 1996).

O gênero *Brosimum* (Moraceae) compreende cerca de 13 espécies que ocorrem na América tropical. Porém, apenas duas espécies vêm sendo mais estudadas fitoquimicamente, *B. gaudichaudii* e *B. rubescens* (Torres *et al*, 1997).

Brosimum gaudichaudii (Fig.1) é uma espécie nativa do cerrado brasileiro, com uma ampla distribuição por todo o Brasil central. É comumente conhecido no Brasil como “mama-cadela” ou algodão (Martins, 1995). Floresce de junho a outubro e seus frutos, que são utilizados como goma de mascar, estão maduros e prontos para colheita de setembro a novembro. As cascas da raiz desta Moraceae são usadas na medicina popular na forma de chá para o tratamento do vitiligo (Vilegas & Pozetti, 1993).

Estudos preliminares mostraram que os principais componentes de *B. gaudichaudii* são duas furanocumarinas, psoraleno e bergapteno (Pathak *et al*, 1989; Caffieri *et al*, 1989; McKeon, 1981), embora outras cumarinas como (+)2'S, 3'R-3-hidroximarmesina, xantiletina, luvangetina também já tenham sido isoladas dessa espécie (Vieira *et al*, 1999) (Fig. 2).

Outra espécie de *Brosimum* estudada quimicamente é o *Brosimum rubescens*. Esse apresenta em sua constituição xantiletina, brosiparina, luvangetina, 7-desmetilsuberosina e brosiprenina (5,6-di-C-prenil-8-hidroxi-7-metoxicumarina (Braz Filho *et al*, 1971). Mais recentemente, Shirota *et al* (1998) isolaram também palodesagretinas I e II de extratos de *B. rubescens* (Fig.2).



Fig. 1- *Brosimum gaudichaudii* Trécul

As cascas do caule de *Brosimum acutifolium* subespécie *acutifolium* são utilizadas na medicina popular, na região amazônica, como agente antiinflamatório e anti-reumático. Apresentam em sua constituição as flavanas 4'-hidroxi-7,8-(2'',2''-dimetilpirano)flavana, 4'-hidroxi-7,8-(3''-hidroxi-2'',2''-dimetilpirano)flavana, brosimina A, brosimina B, além de 3',7-diidroxi-4'-metoxiflavana, isobavachina, liquiritigenina, 4-hidroxi lonchocarpina, 4-hidroxi-isocordoina, isoliquiritigenina, coniferaldeído, siringaldeído, sitosterol e estigmasterol (Torres *et al*, 1997; Torres *et al*, 2000).

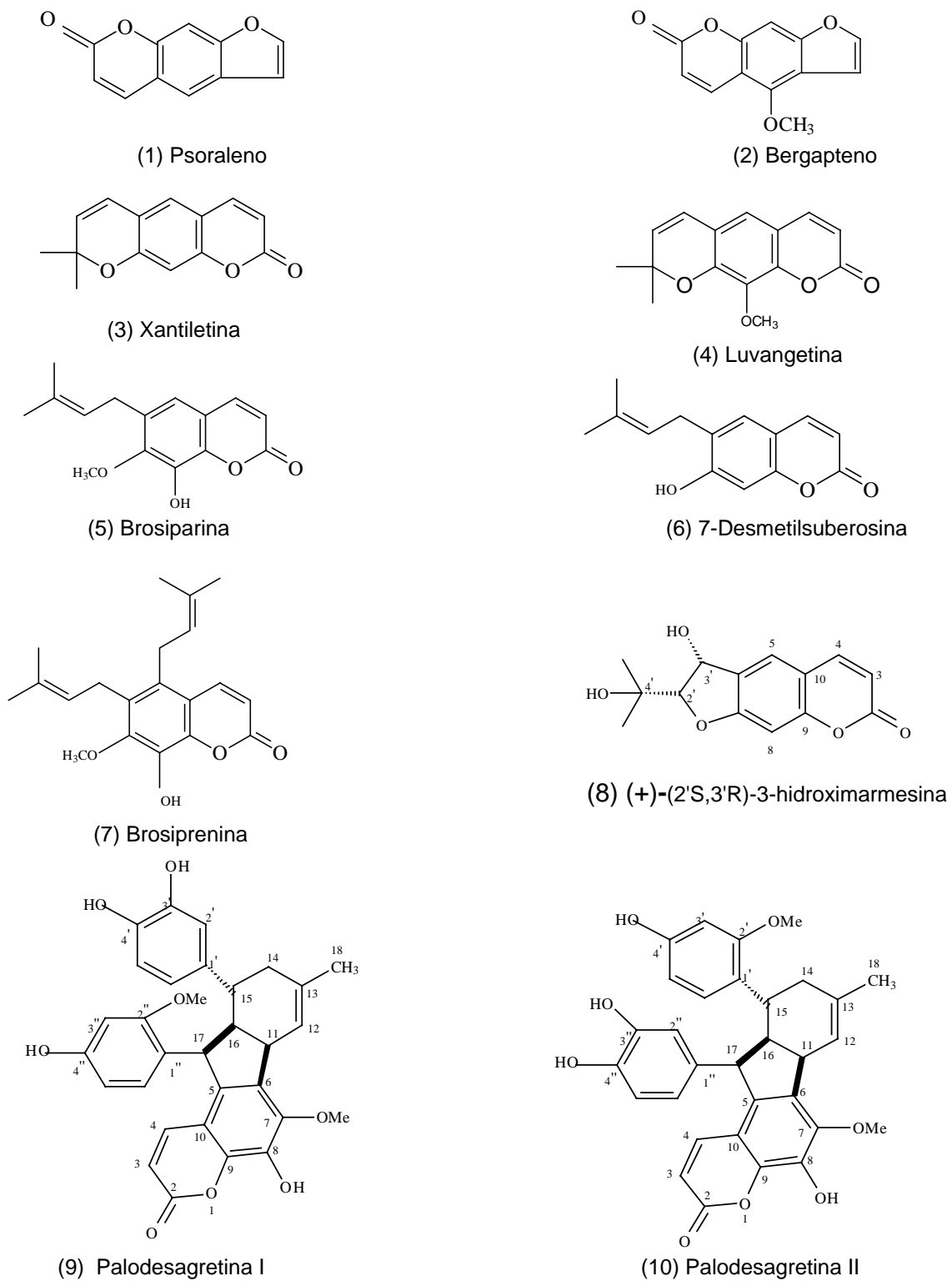
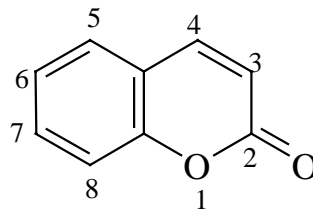


Fig. 2- Cumarinas encontradas no gênero *Brosimum*

AS FURANOCUMARINAS

As cumarinas são metabólitos secundários muito comuns presentes em plantas, mas também podem ser encontradas em fungos e bactérias, sendo que 800 diferentes estruturas já foram determinadas. Estruturalmente são lactonas do ácido *o*-hidroxi-cinâmico (2H-1-benzopirano-2-onas), sendo o representante mais simples a cumarina (1,2-benzopirano-4(1H)-ona) (Simões *et al*, 2000; Vilegas *et al*, 1994) (fig.3).



cumarina

Fig.3- Estrutura básica das cumarinas.

Dentro da classe de cumarinas encontram-se as furanocumarinas, que são substâncias que se constituem na condensação de um anel furânico com um núcleo cumarínico (Murray, *et al*, 1982).

As furanocumarinas lineares (ou psoralenos) são encontradas em várias plantas das famílias Umbelliferae, Rutaceae e Moraceae (Chouchi & Barth, 1994). Ocorrem ainda em plantas de outras famílias como, Amaranthaceae, Guttiferae, Leguminosae, Compositae, Cyperaceae, Dipsacaceae, Fabaceae, Goodeniaceae, Pittosporaceae, Rosaceae, Samydaceae, Solanaceae. Destacam-se algumas espécies comestíveis como aipo, salsa, frutas cítricas, figo e certas especiarias (Schlatter *et al*, 1991; Diawara & Trumble, 1997) (Tabela 1). Esses compostos são potentes agentes fotossensibilizantes, e possuem também efeitos

letais e mutagênicos. Alguns derivados cumarínicos possuem uma variedade de atividades biológicas, incluindo antibiótica, antiinflamatória, fitotóxica, inibição da germinação de sementes, inibição do crescimento de plantas e microrganismos, dermatites, danos ao fígado e carcinogênese (Chouchi & Barth, 1994).

Tabela I- Exemplos de plantas contendo cumarinas

Planta	Cumarina presente	Referência
<i>Apium graveolens</i> (Liliaceae)	Psoraleno, bergapteno, xantotoxina	Diawara <i>et al</i> , 1995
<i>Angelica archangela</i> L. (Umbelliferae)	bergapteno, isopimpinellina, imperatorina, xantotoxina, oxipeucedanina	Brown & El-Dakhakhny, 1970
<i>Ammi majus</i> L. (Umbelliferae)	Bergapteno, xantotoxina, imperatorina	Brown & El-Dakhakhny, 1970
<i>Ruta graveolens</i> L. (Rutaceae)	Psoraleno, bergapteno, xantotoxina	Brown & El-Dakhakhny, 1970
<i>Angelica dahurica</i> Boiss (Umbelliferae)	Cumarina, escopoletina, psoraleno, xantotoxina, bergapteno, imperatorina	Ola Bergendorf, 1997
<i>Dorstenia vitifolia</i> (Moraceae)	Bergapteno, pimpinellina, isopimpinellina	Cardoso, 2000.
<i>Helianthus tuberosus</i> (Compositae)	Aiapina, escopeltina	Cabello-Hurtado <i>et al</i> , 1998
<i>Ixeris laevigata</i> var. <i>oldhami</i> (Compositae)	Esculetina, esculina	Lu <i>et al</i> , 2000

Assim como outras cumarinas, as furanocumarinas são compostos que podem ser fotoativados. A faixa de comprimento de onda ultra-violeta A (UVA) efetiva para esta fotoreatividade está situada entre 320 e 400 nm. A adição da radiação UV-B não afeta a atividade.

Após a absorção de um fóton, as furanocumarinas formam um estado tripleto excitado, que pode reagir com moléculas, tais como as bases pirimídicas ou com o oxigênio no estado fundamental. Disso resulta a formação de oxigênio singleto ou oxirradicais tóxicos, como os radicais superóxido ou hidróxi. Essas moléculas podem reagir com DNA, RNA, proteínas e lipídios, ocasionando lesões nas células que os contém. As furanocumarinas têm especial habilidade em se ligar à bases pirimídicas do DNA (Fig.4) causando mutações (Diawara & Trumble, 1997).

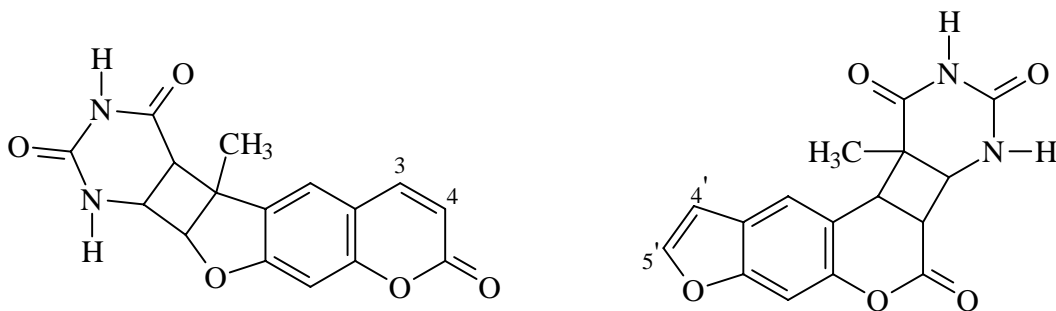


Fig. 4- Cicloadutos de furanocumarinas com a base púrica timina

As furanocumarinas têm sido usadas desde tempos remotos no tratamento de doenças da pele como a psoríase, condições de despigmentação da pele (como leprose, vitiligo e leucodermia), micoses fúngicas, dermatites polimorfas e eczema. Embora a utilização de plantas contendo furanocumarinas para propósitos medicinais datem de 2000 a.C., atualmente o aumento no uso destas substâncias na medicina tem sido ligado à alta incidência de câncer de

pele e outras desordens, assim como trocas entre cromátides irmãs, mutação gênica e aberrações cromossômicas em humanos (Diawara & Trumble, 1997).

CITOTOXICIDADE DAS FURANOCUMARINAS

Grande parte da população mundial acredita que um produto por ser natural não apresente efeitos colaterais ou tóxicos. Após análise biológica de 1.200 espécies vegetais com atividade hipoglicemiante, Marles & Farnsworth (1995) verificaram que 290 espécies poderiam ser consideradas tóxicas, ou seja, quase 25% delas.

A habilidade de as furanocumarinas se ligarem ao DNA, a reatividade e a capacidade de danificar lipídios, proteínas, RNA e DNA, constituem a base de sua toxicidade para vários organismos, incluindo mamíferos, insetos e outros artrópodes, nematóides, vírus, bactérias e sobretudo plantas e fungos (Diawara & Trumble, 1997).

A maioria das manifestações de toxicidade das furanocumarinas aos animais superiores envolve as fitofotodermatites, uma reação epidérmica sintomatizada por erupções, pigmentação, eritema e potencial formação de vesículas. As substâncias químicas responsáveis por esses sintomas são as furanocumarinas psoraleno, 5-metoxipsoraleno (bergapteno) e 8-metoxipsoraleno (xantotoxina) (Diawara & Trumble, 1997).

Essas manifestações podem ser vistas simplesmente no ponto de contato da pele com materiais contendo alta concentração de furanocumarinas ou no corpo todo do indivíduo, dependendo se foi somente o contato dérmico ou uma ingestão, respectivamente. Assim, as furanocumarinas podem atingir a pele por contato direto com vegetais que as contém ou pelo transporte do sangue para a pele após ingestão. A maioria dos humanos mostra pouca reação, ou pelo

menos os sintomas não são visíveis na ausência da exposição à radiação UVA (Diawara & Trumble, 1997).

O limiar para toxicidade de furanocumarinas em humanos foi determinado como 18 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco de planta (salsa) para desenvolvimento de dermatite aguda e de 7 - 9 $\mu\text{g/g}$ para exposições repetidas ou crônicas. Isso pode variar para diferentes regiões do corpo (Diawara & Trumble, 1997).

Dermatites de contato e fotodermatites têm sido descritas em colhedores e cortadores de salsa que têm sido expostos a uma combinação de luz solar e superfícies cortadas de salsa, o mesmo acontecendo com trabalhadores no cultivo de aipo (Beier & Nigg, 1994).

A literatura alerta quanto ao uso indiscriminado de plantas contendo psoralenos, relatando severa dermatite fototóxica em pacientes que usaram uma solução contendo os frutos de *Ammi majus* em combinação com exposição solar (Devienne, 2000). Maurice & Cream (1989) relatam os perigos do uso de ervas, enfatizando as reações de fotossensibilidade ocorrida em pacientes após a utilização de produto a partir de *Psoralea corylifolia*.

Relatos anteriores comprovaram que as furanocumarinas são mutagênicas e também carcinogênicas, sendo que bioensaios *in vitro* com bactérias e células de mamíferos demonstraram que elas são também letais. Beier (1990) reportou a morte de uma mulher de 46 anos devido a complicações de queimaduras severas que a paciente recebeu em um salão de bronzamento enquanto estava sob tratamento com psoraleno. A Organização Mundial da Saúde reconhece esses psoralenos como agentes causais de câncer de pele em humanos. Além disso, estes compostos podem interagir com outros medicamentos: as furanocumarinas induzem atividades hipotérmica e

anticonvulsiva em combinação com várias drogas quando injetadas em ratos (Diawara & Trumble, 1997).

Embora já tenha sido comprovado através de bioensaios em laboratório que as formas sintéticas do 5-metoxipsoraleno (bergapteno) e 8-metoxipsoraleno (xantotoxina) são tóxicas para vários animais elas ainda são as drogas mais amplamente prescritas em fotoquimioterapia de pele (Chandler *et al*, 1999).

O VITILIGO

Dentre os distúrbios cutâneos de maior importância e interesse tratados com psoralenos estão o vitiligo e a psoríase. O vitiligo é uma doença na qual a pele perde a pigmentação devido à destruição dos melanócitos. Áreas da pele tornam-se brancas (Fig.5). Cerca de 1 a 2% da população geral tem vitiligo, o que a torna uma doença muito comum. Sua incidência é maior em pessoas com problemas de tireóide ou outras doenças metabólicas, mas muitas pessoas que têm vitiligo estão em boa condição de saúde. As causas reais do vitiligo ainda não são totalmente conhecidas. Alguns pesquisadores sugerem que o organismo pode desenvolver um tipo de alergia às suas próprias células de pigmento; outros acreditam que as células podem se destruir durante o processo de produção de pigmentos (Porter & Beuf, 2000).

Embora a etiologia do vitiligo ainda não esteja completamente elucidada (Raman *et al*, 1996), acredita-se que a maioria das manchas de vitiligo não contenha melanócitos. Os melanócitos são células originadas na crista neural, localizadas na camada basal. Os neurônios se localizam nesta crista neural. Portanto, a origem dos neurônios está próxima à dos melanócitos. Os melanócitos são encontrados na pele, nas mucosas, nos pêlos, na retina, na úvea e nas leptomeninges. O número de melanócitos varia de um ponto a outro do

revestimento cutâneo. Por isso é que podemos facilmente observar as diferentes variedades de tonalidade da cor da pele em qualquer indivíduo independente de sua cor branca ou negra. A cor da pele é originada de substâncias denominadas pigmentos melânicos, como a melanina.



Fig.5 - Regiões da perna (joelhos) afetadas por vitiligo (Porter & Beuf, 2000).

Estes pigmentos melânicos servem para proteger a epiderme e as camadas profundas da pele de agressão externa, em particular os raios ultravioleta. Eles são produzidos pelas células situadas na camada profunda da epiderme, os melanócitos, que cobrem as diferentes camadas da epiderme com seus pigmentos protetores. Quanto mais espessos os melanócitos, mais eles produzirão os pigmentos fotoprotetores. Estes pigmentos protetores, ou melanina, são numerosos, mas são geralmente divididos em 2 grupos: as feomelaninas vermelhas ou amarelas e as eumelaninas, que são marrons ou negras. As eumelaninas protegem melhor dos raios ultravioleta do sol. Quanto mais a epiderme é escurecida, mais a pele está protegida. A ausência de melanina faz

com que a pele torne-se desprotegida contra os raios solares, tornando as áreas vermelho rosáceas, ocasionado queimaduras com maior facilidade.

As pessoas com vitiligo possuem uma pele muito sensível aos raios solares. As zonas de pele despigmentadas não possuem barreira contra os raios solares, e correm o risco de terem melanoma.

A mais recente estratégia para o tratamento dessa doença centra-se em restaurar os melanócitos da pele afetada para que a epiderme tenha uma morfologia normal. Entretanto, também foi proposto que os melanócitos que já perderam sua habilidade para sintetizar a melanina possam estar presentes nas manchas. Desta forma, a repigmentação da pele poderia teoricamente ser obtida (a) promovendo a transferência de melanócitos de dentro e dos bulbos foliculares para as manchas de vitiligo pela estimulação da sua taxa de proliferação e capacidades migratórias, (b) pela ativação de melanócitos dopa-negativo, aumentando assim a síntese de melanossomo e a produção de melanina (Raman *et al*, 1996).

Os tipos mais freqüentes de tratamento do vitiligo compreendem desde o uso de protetores solares até o uso de corticoesteróides, fotoquimioterapia (tratamento usando psoralenos seguido de radiação UVA) e despigmentação entre outros.

Uma das terapias mais empregadas no caso das doenças de pele é a fotoquimioterapia, que envolve a ação combinada de drogas cumarínicas com a luz ultra-violeta A (UVA) de comprimento de onda longo (Chandler *et al*, 1999). No caso de tratamento tópico, utilizam-se formulações em creme, pomada ou gel, com psoralênicos em doses de 0,001 a 1%. Em alguns casos, deve-se diluir 1:1000 ou 1:10000 para evitar reações intensas, e são aplicadas nas manchas duas vezes por semana, seguido de banhos progressivos de radiação ultra-violeta A por períodos de 4-6 meses. Na medicação sistêmica, o psoralênico é ingerido

na dose de 0,5-0,8 mg/Kg duas vezes por semana, duas horas antes da exposição à radiação ultra-violeta A (Steiner, 1998).

Esta terapia deve ser realizada com precaução, principalmente no que se refere ao tempo de exposição aos raios UV, pois crianças sob tratamento com óleo de psoraleno seguido de exposição solar sem supervisão adequada sofreram intensas queimaduras na pele (Fig.6) (Al-Qattan, 2000).

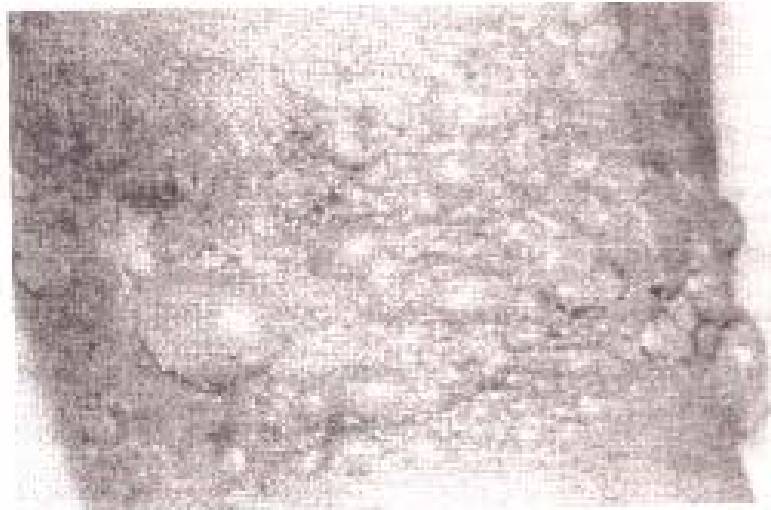


Fig.6 - Queimaduras de pele causadas por psoralenos

Com relação ao mecanismo de ação no tratamento de vitiligo, a atividade combinada da luz UV com a furanocumarina provoca aumento na produção de melanina. Já no caso da psoríase, a ligação do fotossensibilizante com a base pirimídica do DNA diminui a proliferação celular, aumentada na psoríase (Kuster *et al*, 1994; Pozetti, 1988).

Vários tipos de medicamentos têm sido usados no controle das doenças de pele, sendo que a maioria deles apresenta na sua composição extratos vegetais. Como exemplo podemos citar a emulsão de metoxisalen (Kata *et al*, 2000), o extrato aquosos dos frutos de *Piper nigrum* que na concentração de 0,1 mg/mL estimularam cerca de 300% do crescimento de melanócitos de rato em cultura (Lin *et al*, 1999), e ainda o extrato das raízes de *Angelica sinensis* que por ser indicado pela medicina chinesa tradicional como agente tonificante do sangue tem também sido indicado no tratamento do vitiligo (Raman *et al*, 1996).

Dentre os medicamentos comerciais utilizados no Brasil, um deles, aqui denominado “V”, está no mercado há cerca de 20 anos, sendo indicado para o tratamento do vitiligo. Segundo o fabricante, sua composição baseia-se na “seiva bruta concentrada (400mg/comprimido) do vegetal *Brosimum gaudichaudii*”. De acordo com as informações técnicas do fabricante “o bergapteno - substância cristalina isolada da casca da raiz da Moraceae *B. gaudichaudii* - consiste de uma furanocumarina que possui ação fotossensibilizante aumentando a pigmentação da pele, justificando assim seu emprego no tratamento específico do vitiligo e nas discromias”. É relatado ainda que “uma análise preliminar deste produto mostrou não conter alcalóides, e que o bergapteno age nos melanócitos provocando a repigmentação das partes afetadas por vitiligo ou discromias, tanto por ação sistêmica, como por ação local”. O fabricante menciona a ausência de “efeitos colaterais e efeitos tóxicos imediatos ou tardios”. Como únicos cuidados na administração, o fabricante recomenda a não utilização do produto “durante a gravidez e aconselha que as mães não amamentem enquanto fizerem uso do mesmo”.

No comprimido do medicamento “V” consta ainda a presença de Cloridrato de Tiamina (vitamina B₁ 3,0 mg) e Cloridrato de Piridoxina (vitamina B₆ 3,0 mg) e da Nicotinamida (Fator PP 20,0 mg). O fabricante informa ainda que “a associação das vitaminas B1 e B6 tem capital importância, quer pela ação terapêutica de cada uma como também pela ação das mesmas em conjunto,

atuando como fator anti-neurítico). A presença da nicotinamida é justificada pela ação exercida como fator de integridade funcional da pele, da mucosa digestiva e do sistema nervoso central. O produto foi usado em clínicas especializadas, e o tempo de tratamento dependeu da resposta clínica de cada paciente, registrando-se em média um período de seis a dezoito meses, para a repigmentação”. A posologia indicada do medicamento “V” é de dois comprimidos pela manhã ou a critério médico.

Azambuja (1981) relata que, dentre 42 pacientes tratados com “V” (1 a 3 comprimidos/dia), associado à aplicação tópica do mesmo produto, exposição das lesões à luz solar de 1 a 2 horas após a ingestão dos comprimidos e associação de corticóides orais, quando da presença de lesões expansivas, 28,5% apresentaram cura completa ou 90% de melhora, 23,8% melhora apreciável e 11,9% com resultado regular, sendo que o tratamento foi insatisfatório ou nulo para os demais (35,6%). Entretanto, o mesmo autor conclui que a resposta final parece depender mais da capacidade do organismo de deter o processo de destruição dos melanócitos do que simplesmente da ação medicamentosa das drogas usadas, pois a recuperação considerada boa ocorreu, predominantemente, em pacientes com até 20 anos de idade.

Atualmente para que um medicamento fitoterápico possa ser registrado na Agência Nacional da Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde - a legislação exige alguns controles dentre eles o de qualidade química, tanto da matéria-prima vegetal como do produto fitoterápico, além de estudos de toxicidade, eficácia e indicações terapêuticas desses medicamentos (Brasil, 2000).

Para os medicamentos fitoterápicos registrados até 31/01/1995 também valem a nova lei de forma que, se for observada toxicidade ou for demonstrada a falta de eficácia deverão ser tomadas as medidas previstas na legislação vigente (Brasil, 2000).

ENSAIOS BIOLÓGICOS

Nas últimas décadas, a investigação da mutagenicidade de extratos vegetais tem sido estimulada, especialmente após alguns estudos que revelaram potencial mutagênico de plantas tradicionalmente utilizadas na medicina popular na forma de chás e tinturas.

Linhagens bacterianas vêm sendo utilizadas na avaliação da genotoxicidade de produtos químicos. O teste de Ames (*Salmonella/Mammalian Microssome Mutagenesis Assay*) foi o primeiro ensaio descrito para avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de substâncias químicas. Esse teste avalia a capacidade de determinados agentes induzir mutação gênica em diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* através da reversão do fenótipo histidina negativo (his-) para histidina positiva (his+) em sistemas com e sem ativação metabólica (Maron & Ames, 1983). As linhagens TA 100, TA 98 e TA 102 são utilizadas com maior frequência e detectam produtos químicos que causam mutações por deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) ou substituição dos pares de bases do DNA (*base pair*) (Maron & Ames, 1983).

Essas cepas de *S. typhimurium* possuem várias mutações no operon da histidina que são os alvos para mutação reversa, bem como mutações do tipo *rfa* que causa perda parcial da barreira de lipopolissacárides da parede bacteriana facilitando a difusão de moléculas grandes para o interior da célula, deleção do gene *uvrB* que causa deficiência no sistema de reparo por excisão do fator R plasmidial (plasmídeo pKM101) que confere resistência à ampicilina e contém os genes *muc AB*, cuja expressão causa estímulo no sistema de reparo susceptível ao erro ("error prone"). Essas mutações lhes conferem maior sensibilidade na detecção de diversos mutágenos.

Alguns produtos químicos necessitam ser metabolizados *in vivo* para que seus derivados apresentem atividade mutagênica. Sistemas de ativação metabólica são comumente utilizados para realização de testes *in vitro*, revelando se o composto teste necessita ser metabolizado para torna-se mutagênico (mutágeno indireto) ou se o mesmo tem ação direta sobre o material genético na sua forma original (mutágenos diretos), além de, em alguns casos, serem os responsáveis pela inativação total ou parcial de mutágenos diretos. O sistema composto por fração microssomal S₉ e cofatores é amplamente empregado para metabolização de substâncias químicas (Maron & Ames, 1983).

Os danos no DNA formados espontaneamente ou induzidos por substâncias químicas podem ser reparados e processados, mas muitos deles podem levar à formação de aberrações cromossômicas. Essas aberrações, dependendo do tempo de exposição ao agente, podem afetar a fidelidade da mensagem genética, levando a mudanças celulares irreversíveis e resultando em efeitos letais às células (Natarajan & Obe, 1984).

Métodos *in vitro* que medem o potencial citotóxico de drogas foram introduzidos na década de 80 e continuam sendo desenvolvidos para obtenção de *endpoints* citotóxicos mais sensíveis (Riddel *et al*, 1986). Os testes de citotoxicidade atualmente usados medem a concentração da substância que danifica componentes, estruturas ou vias bioquímicas celulares, além de permitirem extrapolação direta de dados quantitativos a situações análogas *in vivo* (Bacon *et al*, 1990; Freshney, 1994; Balls & Clothier, 1992).

Cerca de 20 diferentes critérios são utilizados na determinação da toxicidade geral. Células são expostas a diferentes concentrações da substância teste por um período de tempo e, posteriormente, o grau de inibição da viabilidade e/ou condições funcionais das células são avaliados. Os métodos mais utilizados são: análise histológica através de microscopia comum, número, morfologia,

crescimento, divisão e metabolismo celular, integridade de membrana, atividade mitocondrial, lisossomal e ribossomal (Barile, 1994).

Algumas técnicas para determinação da citotoxicidade utilizam substâncias que são incorporadas ou transformadas em produtos coloridos apenas por células vivas, mas não por células mortas ou pelo meio de cultivo. A formação destes produtos reflete o *endpoint* tóxico e quantifica o número de células viáveis, mostrando uma relação linear entre esses dois parâmetros (Wilson, 1992).

Os métodos colorimétricos são realizados em placas de microtitulação, leitura em espectrofotômetro multicanal automático e oferecem vantagens como simplicidade, rapidez, custo e segurança. A técnica desenvolvida por Mosmann (1983) baseia-se na quebra do sal de MTT-tetrazólio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio, o qual é reduzido em produto corado (formazana) por enzimas microssomais e, em menor parcela, pela enzima mitocondrial succinato-dehidrogenase. Essa reação ocorre exclusivamente em células vivas e a quantidade de formazana formada é proporcional ao número de células viáveis (Berridge *et al*, 1996; Vistica *et al*, 1991).

ANÁLISE QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS VEGETAIS

A química de produtos naturais representa, dentro da área de pesquisa com plantas medicinais, um ponto de grande importância e valor, na medida em que, por meio dos métodos utilizados nessa área pode-se realizar tanto o isolamento e a purificação de novos compostos quanto a correta determinação estrutural e posterior síntese total ou parcial. Os avanços nessa área são enormes, especialmente nas últimas décadas (Di Stasi, 1996).

A determinação da composição de extratos naturais é um trabalho árduo pois um extrato vegetal bruto é uma mistura muito complexa contendo algumas vezes centenas ou milhares de metabólitos diferentes (Hamburger & Hostettmann, 1991).

Os compostos de interesse freqüentemente estão presentes em baixas concentrações no vegetal, dificultando assim suas análises. O desenvolvimento de novas metodologias que simplifiquem e acelerem a triagem de misturas determinando os compostos presentes para os subsequentes estudos aumenta a eficácia das pesquisas com plantas (Quirke *et al*, 2000).

Desta forma, uma rápida detecção dos produtos naturais biologicamente ativos tem um papel estratégico nas investigações fitoquímicas de extratos vegetais brutos. Assim, para realizar uma triagem eficiente desses extratos, tanto os ensaios biológicos como análises por CLAE com vários métodos de detecção são utilizados (Hostettmann *et al*, 1997).

O acoplamento de diferentes tipos de detectores à técnica de CLAE , tais como arranjo de fotodiodo (CLAE/DAD) e à espectrometria de massas (CLAE/EM ou CLAE/EM/EM) produz informações estruturais importantes dos metabólitos sem a necessidade do isolamento da substância. A introdução de CLAE acoplado à ressonância magnética nuclear (CLAE/RMN) representa um complemento poderoso nos estudos que utilizavam CLAE/DAD/EM (Hostettmann *et al*, 1997).

As cumarinas podem ser encontradas em todas as partes de uma planta, freqüentemente como misturas. As cumarinas apresentam um espectro ultravioleta (UV) que é fortemente influenciado pela natureza e posição dos grupos substituintes. A utilização de um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplada a um detector com arranjo de fotodiodo (CLAE/DAD) possibilita detectar em pouco tempo a presença de tipos diferentes de cumarinas em extratos vegetais, sem a

necessidade de isolamento prévio (Kuster & Rocha, 2000). As furanocumarinas (psoralenos) apresentam quatro zonas de absorção no UV 205-225nm ($\log \varepsilon$ 4,0), 240-255nm(4,06-4,45), 260-270nm(4,18–2,26) e 298-316nm (3,85-4,13). O psoraleno apresenta bandas em 213, 245 e 296nm enquanto que o bergapteno em 222, 248-266 e 314 nm (Fig.7).

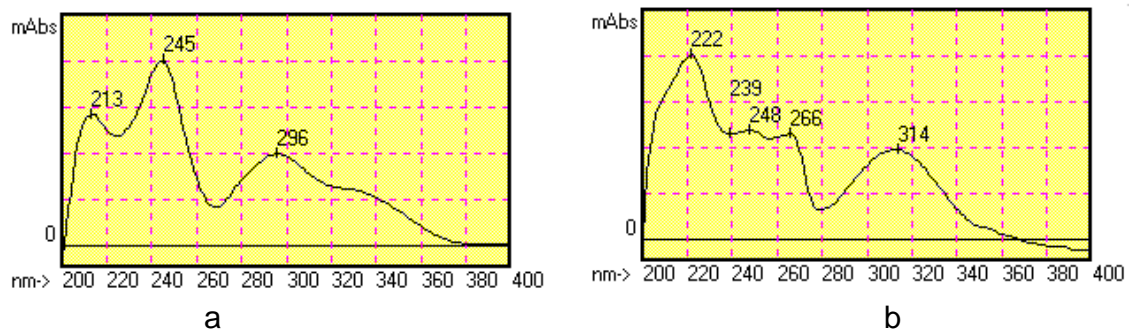


Fig. 7 - Espectros no UV do psoraleno (a) e bergapteno (b)

Inúmeros são os estudos de compostos cumarínicos em plantas. A determinação quantitativa de hidroxycumarinas em *Fraxinus ornus* (Nykolov *et al*, 1993), a caracterização de óleos contendo cumarinas e furanocumarinas em toranja (Schulz *et al*, 1992), análises simultâneas de compostos fenólicos (Borges *et al*, 1993), as cumarinas de *Angelica archangelica* (Harmala *et al*, 1990) e a determinação de cumarina e seus principais metabólitos em plasma humano (Sharifi *et al*, 1993), são apenas alguns dos trabalhos reportados utilizando-se CLAE/DAD.

CLAE também foi utilizada na verificação da presença da furanocumarina linear saxalina em folhas de salsa, assim como da graveolona encontrada em cultura de células em suspensão de salsa obtida por técnicas de cultura de tecidos vegetais (Beier *et al*, 1994). Ainda, seis cumarinas presentes no frutos de *Heracleum sphondylium* foram identificadas utilizando-se CG/EM (Bicchi *et al*, 1990).

2- OBJETIVOS

Investigar e estabelecer o perfil da composição química do vegetal *Brosimum gaudichaudii* Trécul e do medicamento "V". Avaliar a mutagenicidade e a citotoxicidade de extratos obtidos de *B. gaudichaudii* e do medicamento "V".

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Materiais e equipamentos utilizados

3.1.1- Materiais utilizados

Nas análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram utilizadas placas de sílica gel G F₂₅₄₋₃₆₆ da Aldrich com 0,1mm de espessura de adsorvente. Os padrões de psoraleno e bergapteno utilizados foram produzidos pela Sigma (USA)(99% de pureza).

3.1.2- Solventes utilizados

Os solventes orgânicos utilizados nas extrações, como eluentes nas análises e separações cromatográficas foram solventes de grau P.A. e aqueles empregados em CG/EM, CLAE/DAD e ES/EM grau HPLC (J.T.Baker, USA).

3.1.3- Equipamentos utilizados

Ultra-som de mesa marca Thornton, capacidade 2,81 L, frequência 47 KHz;

Rotaevaporador e banho maria Fisaton.

Luz UV de comprimentos de onda 254 nm e 366 nm

Centrifuga Olidef CZ modelo CD4000

Balança analítica: Scientech A-210 (precisão 0,001g)

CCCG

O equipamento utilizado foi um DCC-300 Tokio Rikakikai com 300 colunas de 400mm x 2 mm (diâmetro interno).

CG/EM

Modelo: Hewlett Packard HP 5890 - HP 5970 MSD

Coluna: HP1 com comprimento de 25 m , diâmetro interno de 0,25mm e espessura do filme de 0,3 μ m.

CLAE/DAD

Modelo: Shimadzu LC-10 AD

Detector: arranjo de fotodiodo

Coluna: Supelcosil C-18 (250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno com partículas de 5 μ m)

CLAE/DAD PREPARATIVO

Modelo: VARIAN PRO STAR SYSTEM 210 pump

Detector: PROSTAR 330 PDA-UV

Coluna: Supelcosil C-18 (250 mm de comprimento x 10 mm de diâmetro interno e partículas de 5 μ m)

ES/EM

As análises por ES/EM foram feitas num espectrômetro FISIONS VG PLATFORM, ELETROSPRAY MODE. Foram feitas inserções diretas. As fragmentações foram realizadas no modo negativo utilizando -70V e no modo positivo +100V.

RMN

As análises por RMN foram realizadas no aparelho BRUKER AC200 (4,7 Tesla) 200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C e no aparelho VARIAN INOVA

500 SPECTROMETER (11,4 Tesla) 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . As amostras foram dissolvidas em DMSO deuterado (Aldrich).

3.2- MATERIAL VEGETAL

Dois indivíduos diferentes de *Brosimum gaudichaudii* Trécul foram coletados em quantidades que não colocaram em risco a sobrevivência das plantas. O primeiro material, um arbusto (cerca de 1,20m de altura), foi coletado nas proximidades do Campus da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista - UNESP – Araraquara, em julho de 1996. O outro indivíduo, uma arbórea (cerca de 3,0m de altura), foi coletado no município de Patrocínio Paulista-SP, na mesma época. A identificação foi realizada pelo Prof. Dr. Jorge Pedro Pereira Carauta da FEEMA - Jardim Botânico do Rio de Janeiro – RJ. As exsicatas dos dois materiais encontram-se catalogadas e depositadas no Herbário Alberto Castellanos (GUA) – Rio de Janeiro sob referências GUA 44781: *Brosimum gaudichaudii* Trécul arbórea coletada no município de Patrocínio Paulista – SP e GUA: 44782: *Brosimum gaudichaudii* Trécul arbusto coletado no município de Araraquara-SP (Fig.8).

De ambos os indivíduos, o material foi separado (folhas, galhos, córtex da raiz e cerne da raiz) e então seco em estufa com circulação de ar forçado a 50°C durante 24 horas, pulverizados e tamizados (partículas entre 0,5 e 1,0mm) e em seguida armazenados em frascos bem vedados, protegidos da luz.

O látex liberado pela planta após a retirada das folhas foi coletado em um frasco âmbar de 5 mL, que em seguida foi vedado e armazenado em freezer.



GUA 44781



GUA 44782

Fig. 8 - Dois indivíduos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul

O medicamento “V” foi comprado no comércio de Araraquara, sem a necessidade de receita médica. Foram adquiridas caixas contendo 30 comprimidos. Durante o desenvolvimento do trabalho foram utilizados comprimidos pertencentes a sete diferentes lotes que foram submetidos a extração e comparação dos perfis cromatográficos. Antes de cada extração os comprimidos foram triturados em almofariz.

Visando avaliar o perfil fitoquímico dos materiais dos dois indivíduos de *Brosimum gaudichaudii*, um estudo comparativo através de CCDC e CLAE

desses materiais foi realizado. Não houve diferença nos perfis químicos entre os dois indivíduos, de forma que os experimentos posteriores foram realizados somente com o indivíduo GUA 44782.

3.3- Avaliação do rendimento das extrações

Segundo dados da literatura MeOH é um bom solvente para extração de cumarinas (Murray, 1995). Por isso realizamos um teste preliminar utilizando diferentes relações soluto/solvente, visando determinar a mais adequada para a extração das cumarinas contidas no córtex das raízes de *Brosimum gaudichaudii*. Para tal, diferentes massas do pó da referida parte da planta foram utilizadas.

- 1,0 ; 2,0 e 5,0g do pó do córtex das raízes foram colocados, separadamente, em erlenmeyer de 250 mL e foram adicionados 100 mL de MeOH. As extrações foram realizadas em banho de ultra-som durante 30 minutos. Os experimentos foram feitos em triplicatas. Os extratos obtidos foram devidamente concentrados a vácuo em rotaevaporador e os resíduos secos pesados e submetidos a CCDC utilizando como fase móvel tolueno:eter etílico saturado com ácido acético 10% (Wagner et al, 1984).

3.4- Extratos e frações

Baseado nos resultados de rendimento obtidos das extrações diferenciadas (Tab.5, pag.46), adotou-se como padrão a relação de 1g de material vegetal para cada 100 mL de solvente extrator (1% m/v).

Inicialmente as diferentes partes da planta e os comprimidos do medicamento “V” foram submetidos à extração com hexano, clorofórmio, metanol e água separadamente (Esquemas 1 e 2).

Para isso, 1,000 g de cada material foi pesado em balança analítica e transferido para erlenmeyers, para o qual 100 mL de cada solvente foi adicionado separadamente a cada frasco. As extrações foram realizadas sob banho em ultrassom (40°C) durante 30 minutos.

Os extratos orgânicos obtidos foram devidamente concentrados a vácuo em rotaevaporador. Os resíduos secos foram pesados e o perfil químico de cada extrato verificado através de CCDC.

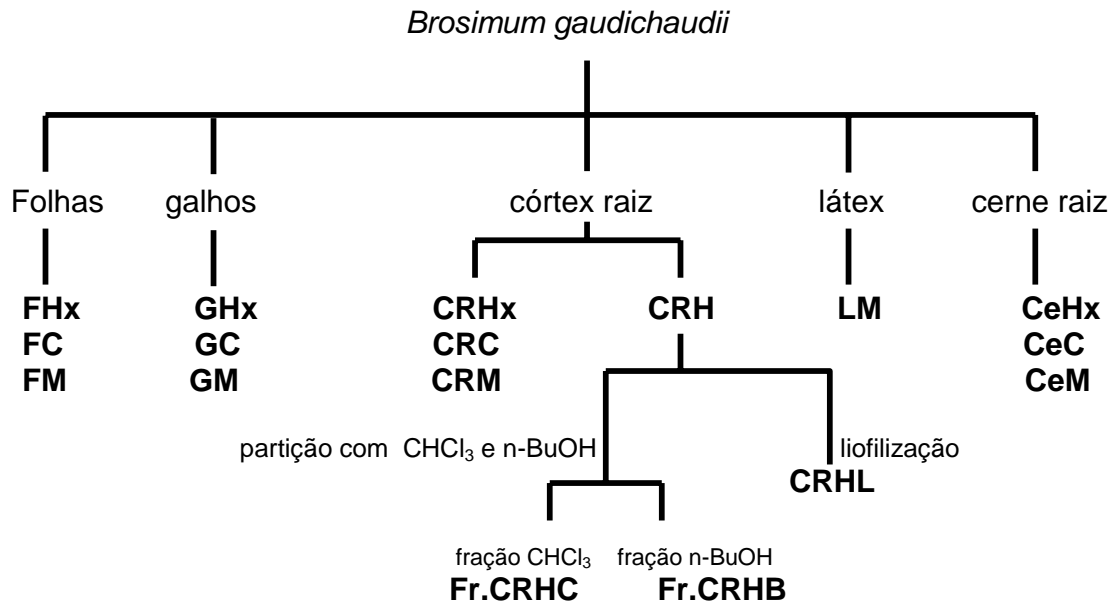
Os extratos aquosos foram liofilizados ou submetidos à partição líquido-líquido sequencial com CHCl_3 e n-BuOH e posteriormente analisados por CCDC.

Em funil de separação, ao extrato aquoso (200 mL) foram adicionados 50 mL de CHCl_3 . Após agitação, descanso e conseqüente separação das fases orgânica e aquosa, a fase orgânica foi coletada. O processo foi repetido duas vezes. Em seguida o mesmo procedimento foi feito utilizando desta vez 50 mL de n-BuOH. As fases clorofórmicas e n-butanólicas foram devidamente concentradas a vácuo e os resíduos secos pesados.

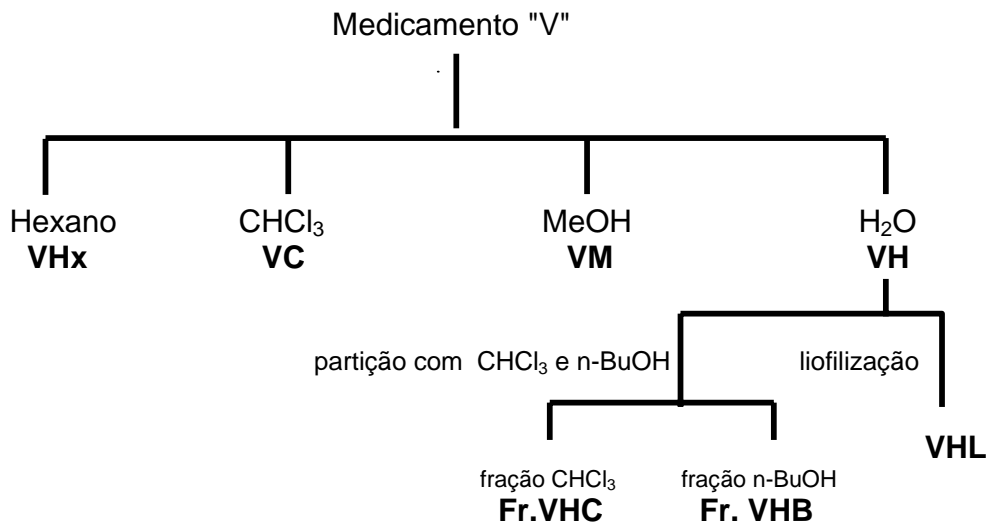
Uma avaliação inicial dos extratos por CCDC foi necessária para direcionarmos os estudos. Para isso, utilizou-se como fase móvel tolueno:eter etílico saturado com ácido acético 10% seguida por visualização das placas sob luz UV e/ou pulverização com vanilina sulfúrica e aquecimento a 100°C por 5 minutos (Wagner et al, 1984)(Esquemas 3 e 4).

Devido à pouca polaridade das furanocumarinas e à maior concentração delas no córtex das raízes, análises por CG/EM foram realizadas utilizando-se os extratos hexânico e clorofórmico desses materiais.

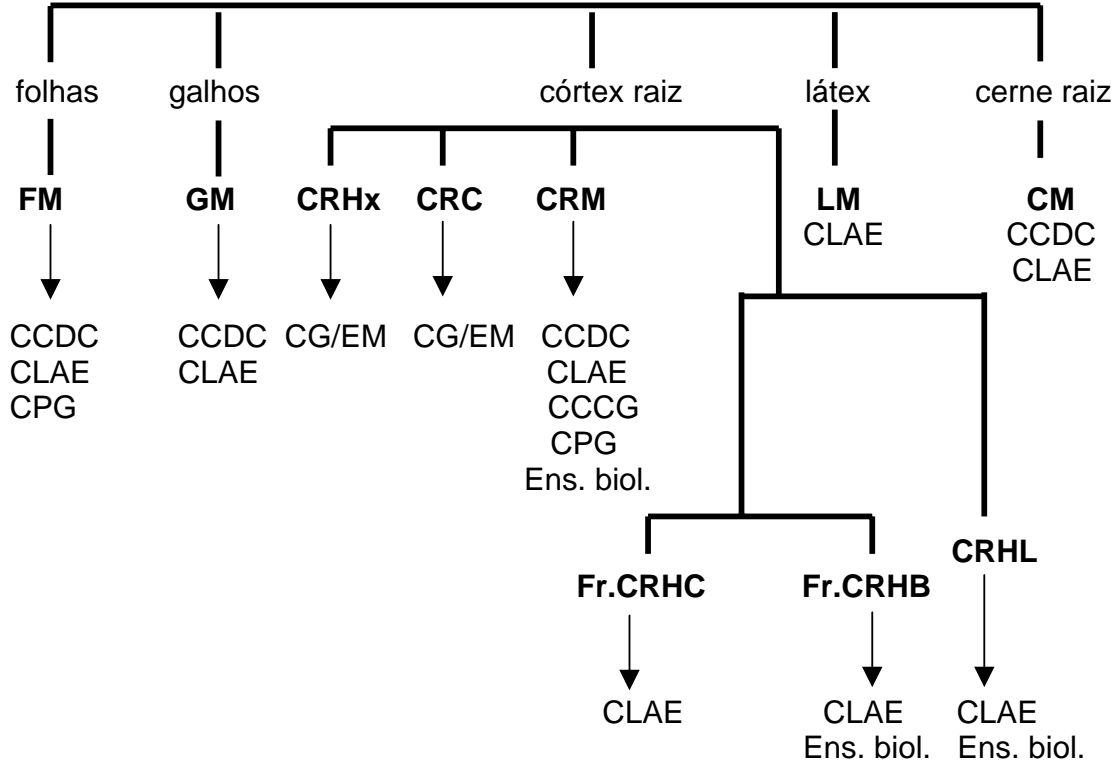
Esquema 1: Extratos e frações obtidos do vegetal *Brosimum gaudichaudii*



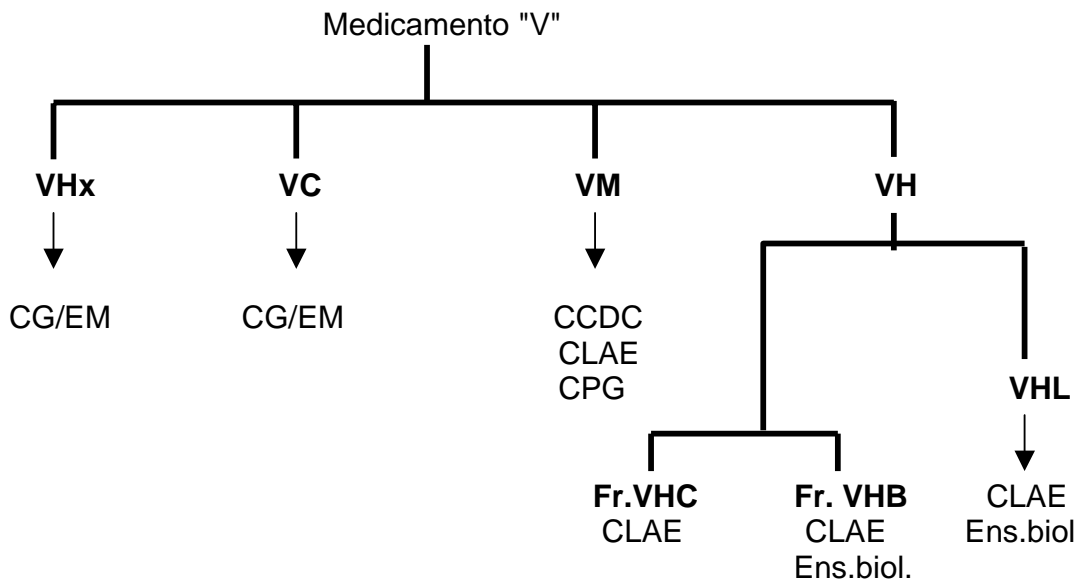
Esquema 2: Extratos e frações obtidos do medicamento "V"



Esquema 3: Análises realizadas em extratos e frações do vegetal *B. gaudichaudii*



Esquema 4: Análises dos extratos e frações do medicamento "V"



3.5- Análises Qualitativas

3.5.1- Análises por CG-EM

Inicialmente analisamos os constituintes menos polares presentes no medicamento “V” e no córtex da raiz do vegetal *B. gaudichaudii*. Para isso, utilizamos a técnica de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG/EM). Os extratos analisados foram CRH, CRC, VH e VC. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio. A temperatura do injetor e da interface foram de 280 °C, sendo utilizado ionização por impacto eletrônico (70 eV). A injeção foi feita de forma split 1:30. A programação de temperatura foi:

T.inicial (°C)	Mantida por (min)	Rampa (°C/min)	T. final (°C)	Mantida por (min)
120	2	6	280	20

3.5.2- Análises por CLAE/DAD

Visando avaliar os perfis cromatográficos das diferentes partes da planta dos dois indivíduos citados e do medicamento “V”, analisamos por CLAE/DAD os seguintes materiais: FM, GM, CRM, LM, CeM, Fr.CRHC, Fr.CRHB, CRHL, VM, Fr.VHC, Fr.VHB.

A fase móvel utilizada foi MeOH:H₂O num gradiente linear nas proporções de 40:60 → 80:20 em 20 minutos, mantendo-se 80:20 até 25 minutos e de 80:20 → 40:60 até 27 min, terminando-se a análise em 30 min. O fluxo foi de 0,6 mL/min e o volume de cada injeção foi de 20µL. As injeções foram feitas logo após as extrações ou partições.

3.6- Análises Quantitativas

3.6.1- Quantificação de psoraleno e bergapteno no córtex das raízes (CRM) e no medicamento “V” (VM)

3.6.1.1- Determinação da curva de calibração do psoraleno

A quantificação de psoraleno e bergapteno foi feita pelo método do padrão externo (Kateman & Buydens, 1993). Para a construção da curva de calibração do psoraleno foi utilizado a técnica de diluição da solução-padrão estoque (Leite, 1998). A quantificação foi feita pela interpolação das áreas dos picos relativas ao psoraleno nas amostras com as áreas das soluções da curva de calibração de psoraleno.

Para o preparo da solução-mãe de psoraleno, 1,100 mg do padrão foi pesado em balança analítica e diluído em 1,00 mL de MeOH. Desta forma temos uma solução-padrão estoque na concentração de 1,10 μ g/ μ L (m/v). A partir da solução-padrão cinco diluições foram feitas da seguinte forma: 200 μ L da solução mãe de psoraleno foram diluídos em outros 200 μ L de MeOH (solução P₁). Em seguida, 200 μ L da solução P₁ foram diluídos com outros 200 μ L de MeOH (solução P₂) e assim sucessivamente até P₅ (Tab. 2).

A solução-padrão, assim como suas diluições, foram acondicionadas em frascos vedados com tampas de rosca e selados com filme de PVC e protegidos da luz por folhas de alumínio. As soluções foram armazenadas na geladeira (4° C). O padrão de psoraleno foi acondicionado em frasco protegido de luz e armazenado na geladeira.

Tabela 2 – Concentrações das soluções usadas para obtenção da curva de calibração de psoraleno.

Solução	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Estoque	1,10
P ₁	0,55
P ₂	0,28
P ₃	0,14
P ₄	0,07
P ₅	0,03

3.7- Estudo dos constituintes majoritários dos extratos CRM (córtex da raiz) e FM (folhas)

3.7.1- Isolamento de psoraleno e bergapteno do córtex das raízes

No extrato metanólico do córtex da raiz (CRM) de *B. gaudichaudii* a concentração de psoraleno e bergapteno é de cerca de 3,0% cada (Tab.8 , pag.74). Por isso, realizamos um fracionamento preliminar do extrato CRM visando obter as furanocumarinas para os posteriores ensaios biológicos.

O fracionamento foi realizado por CC flash, utilizando como fase estacionária sílica derivatizada para cromatografia em fase reversa (octadecil C-18). A coluna, com 2,5 cm de diâmetro, continha 50 g da fase estacionária preenchendo 13 cm de altura. A fase móvel utilizada foi MeOH:H₂O, estando a coluna estabilizada com MeOH:H₂O (4:6) antes de ser iniciado o fracionamento.

O extrato seco (\cong 500 mg) foi dissolvido em 1,5 mL de MeOH:H₂O (4:6) e submetido ao fracionamento. Diminuiu-se progressivamente a polaridade do eluente através do aumento da proporção de MeOH na mistura (Tabela 3).

Tabela: 3 - Seqüência de eluição da fase móvel e coleta de frações no isolamento de psoraleno e bergapteno do córtex da raiz de *B. gaudichaudii*.

Volume de eluente (mL)	Proporção MeOH (%)	Fração coletada
50	40	1,2,3
50	70	4,5
50	100	6,7

Ao final das eluições, as frações obtidas e padrões de psoraleno e bergapteno foram analisadas por CCDC utilizando como fase móvel tolueno: éter saturado com ácido acético 10% e visualizadas sob luz UV (Wagner *et al*, 1984).

3.7.2- Fracionamento de extrato CRM por CCCG (cromatografia em contra corrente por gotejamento).

Visando determinar o perfil químico do extrato MeOH do córtex da raiz, realizamos um fracionamento utilizando a técnica de cromatografia em contra corrente por gotejamento (CCCG).

A eluição foi realizada em modo descendente, utilizando como fase móvel a fase orgânica da mistura CHCl₃:MeOH:H₂O (7:13:8) num fluxo de 30 mL/h. Foram coletadas 181 frações com volume de 9 mL cada. As frações obtidas foram analisadas por CCDC usando como fase móvel CHCl₃:MeOH:H₂O (43:37:20) . A visualização foi feita com revelador NP/PEG seguido de luz UV. As frações semelhantes foram posteriormente reagrupadas e analisadas por CLAE

utilizando como fase móvel MeOH:H₂O num gradiente linear nas proporções de 40:60 → 80:20 em 20 minutos, mantendo-se 80:20 até 25 minutos e de 80:20 → 40:60 até 27 min, terminando-se a análise em 30 min. O fluxo foi de 0,6 mL/min e o volume de cada injeção foi de 20µL. O reagrupamento das frações semelhantes gerou quatro subfrações, das quais duas delas (Bg₁ e Bg₂) por conterem massas suficientes foram enviadas para análises de RMN.

3.7.3 - Fracionamento do extrato FM por CPG (cromatografia de permeação em gel)

Através de CCDC e CLAE verificou-se que o extrato MeOH das folhas de *B. gaudichaudii* apresenta as furanocumarinas em quantidade bastante inferior ao córtex. Porém, algumas substâncias mais polares que as furanocumarinas estão presentes nesse extrato.

No intuito de identificarmos essas substâncias polares presentes nas folhas de *B. gaudichaudii*, realizou-se um fracionamento do extrato FM utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20 e MeOH como eluente.

O extrato seco (1,0g) foi redissolvido em 5,0 mL de MeOH, centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante aplicado na coluna. O eluente utilizado foi MeOH 100% num fluxo de 0,5 mL/min. Foram coletadas 132 frações de 5 mL cada. As frações foram analisadas por CCDC utilizando como fase estacionária sílica gel 60G_{F254} e como fases móveis BAW e/ou CHCl₃:MeOH:H₂O (43:37:20). Após a eluição, as placas foram visualizadas sob luz UV ou utilizando os reagentes orgânicos vanilina sulfúrica ou NP/PEG (Wagner et al, 1984). As frações semelhantes foram reunidas em 7 frações. A fração FM7, correspondendo a uma mistura de flavonóides, foi purificada por CLAE preparativo (Esquema 5).

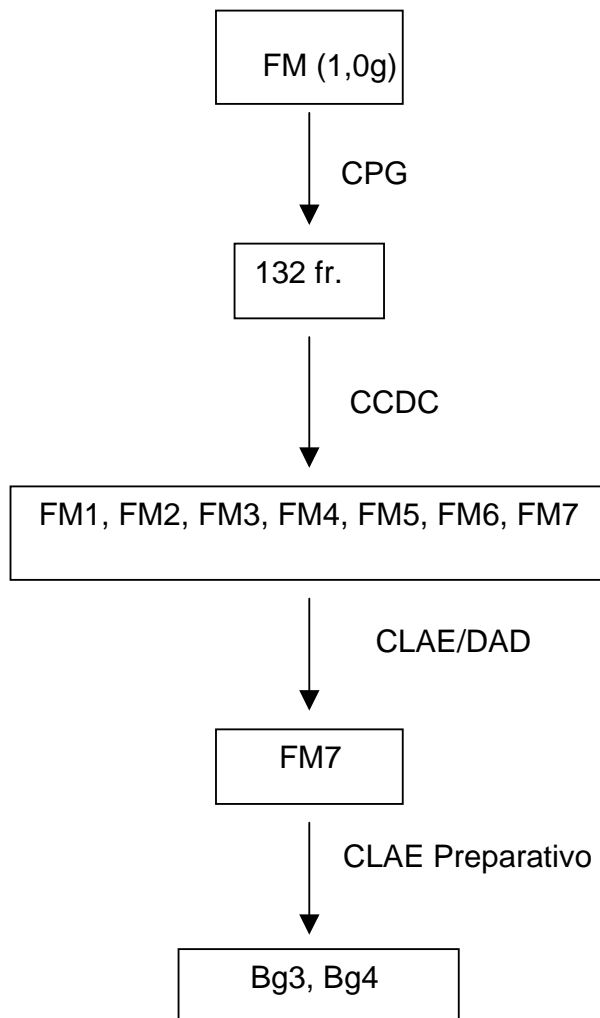
3.7.3.1- Purificação da fração FM7 por CLAE preparativo

A fração FM7 (0,1220 g) foi dissolvida em 1,2 mL de MeOH. Foram feitas 4 corridas cromatográficas, de forma que em cada uma foram injetados 300 μ L. O eluente utilizado foi MeOH:H₂O (1:1), num fluxo de 1mL/min. As coletas foram realizadas mediante observação do espectro de UV da substância detectada monitorando-se a 254 nm. As sub-frações foram novamente cromatografadas por CCDC utilizando como fase móvel CHCl₃:MeOH:H₂O (43:37:20), foram visualizadas sob UV após serem borrifadas com NP/PEG, sendo que algumas delas foram também checadas por CLAE. As sub-frações relativas aos flavonóides (Bg₃ e Bg₄) foram submetidas à análises espectroscópicas de RMN ¹H e ¹³C e ES/MS para elucidação estrutural das substâncias.

3.7.3.2- Identificação de Bg₃ e Bg₄

Para a identificação das substâncias Bg₃ e Bg₄ isoladas do extrato MeOH de folhas (FM), as mesmas foram submetidas a análises de ES/EM e RMN.

Esquema 5 - Isolamento dos flavonóides do extrato FM de *B. gaudichaudii*



3.8- ENSAIOS BIOLÓGICOS

A utilização da terapia PUVA no tratamento do vitiligo deve ser feita com precaução tanto no que se refere ao tempo de exposição a luz UV quanto no número de exposições, pois esses psoralenos são hepatotóxicos, nefrotóxicos, carcinogênico e ocasionam distúrbios gástricos e oculares.

Tendo em vista que a população utiliza o medicamento “V” e também o vegetal *B. gaudichaudii* no tratamento do vitiligo e que ambos contém psoraleno e bergapteno, realizamos ensaios biológicos nesses materiais para avaliarmos a mutagenicidade e a citotoxicidade desses.

Os ensaios biológicos foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, sendo os ensaios de mutagenicidade realizados sob a orientação da Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda e os de citotoxicidade pela Profa. Dra. Maria Stela Gonçalves Raddi.

3.8.1- Ensaios de Citotoxicidade

Para os ensaios de citotoxicidade foram testadas as amostras CRM, VM, CRHL, VHL e os padrões de psoraleno e bergapteno isolados da planta.

3.8.1.1- Procedimento

Células McCoy (ATCC 1696) (células derivadas inicialmente de tecido sinovial humano que sofreram transformação originando linhagem contínua) (Oriol & Ridgway, 1982) foram mantidas em garrafas tipo xarope contendo meio Eagle adicionado de 7,5% de soro fetal bovino. Após tripsinização, 200µL de meio Eagle contendo 10⁴-10⁵ células/mL (contagem realizada em câmara de Neubauer) foram inoculadas em microplaca para cultura de tecido, contendo 96 poços e

incubadas a 37°C, para fornecer cerca de 60 a 70% de confluência, quando observada em microscópio invertido, após 24 horas de incubação. O meio Eagle foi removido e cada poço recebeu diferentes concentrações da substância química a ser testada, utilizando-se o meio de cultura como diluente. Após incubação por 24 horas, o meio foi removido e a placa tratada para o teste do MTT tetrazólio.

3.8.1.2- Técnica do MTT- tetrazólio

Um volume de 200 µL da solução estoque de MTT foi adicionada ao crescimento celular após exposição a diferentes concentrações da droga (24 horas), e incubado a 37°C por 3 horas. Após esse período de incubação, a placa foi vertida, adicionado 200 µL de isobutanol em cada poço e homogeneizada em agitador por 10 minutos. A absorbância da reação foi lida, em espectrofotômetro multicanal (leitor de ELISA), em comprimento de onda de 540 nm. Os testes foram sempre acompanhados de crescimento controle, realizados em triplicata e repetidos no mínimo 3 vezes (Barile, 1994).

3.8.1.3- Determinação do Índice Citotóxico (IC₅₀)

O IC₅₀ para cada extrato testado foi determinado. O IC₅₀ indica a concentração do agente que diminui em 50% a absorbância espectrofotométrica.

3.8.2- Ensaio de mutagenicidade (Teste de Ames)

Foram utilizadas as cepas TA100, TA98, TA102 e TA97a, cedidas pelo Dr. Bruce Ames (Berkeley, California- USA).

Antes do preparo dos estoques as características genéticas das linhagens foram avaliadas quanto a: requerimento de histidina e biotina, presença de deleção de *uvrB* , presença de mutação *rfa* , presença do plasmídeo que resulta

na resistência à ampicilina ou à tetraciclina (dependendo da linhagem), freqüência de reversão espontânea e características de reversão frente a vários controles positivos.

Tabela 4 - Controles positivos usados nos ensaios de mutagenicidade com linhagens de *Salmonella typhimurium*.

Linhagem de <i>S. typhimurium</i>	Controle positivo	
	(+S9)	(-S9)
TA ₁₀₀	2-antramina	Azida sódica
TA ₉₈	2-antramina	4-nitrofenilenodiamina
TA ₁₀₂	2-aminofluoreno	Daunomicina
TA _{97A}	2-aminofluoreno	4-nitrofenilenodiamina

Para a azida sódica e daunomicina o solvente é a água, e para os demais foi usado o dimetilsulfóxido (DMSO). Esses solventes foram usados como controles negativos.

Os meios de cultura e soluções utilizados nos ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron & Ames (1983).

O crescimento das linhagens de *S.typhimurium* foi realizado em caldo nutriente Oxoid n.2 e o ágar nutriente foi elaborado à partir do caldo nutriente, com ou sem ampicilina dependendo do ensaio, solidificado com 1,5% de ágar.

Nos ensaios de mutagenicidade foi usado ágar mínimo glicosado com traços de histidina, constituído de ágar glicose (20 g de glicose, 15 g de Bacto

ágar e 930 mL de água destilada) e Meio Vogel Bonner “E” 50x concentrado(10 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 100 g de ácido cítrico, 175 g de fosfato de sódio e amônio , 500g de fosfato de potássio dibásico e 670 mL de água destilada na proporção de 990 mL para 10 mL respectivamente, acrescido de 10 mL de uma solução de L-histidina 0,096 mg/mL e D-biotina 0,123 mg/mL.

O ágar de superfície (“top-agar”) foi composto de 0,5% de cloreto de sódio e 0,6% de Bacto ágar.

Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave a 121° C por 15 minutos quando não especificado.

3.8.2.1- Preparo do inóculo de *S. typhimurium*

Com auxílio de uma alça de inoculação, foi semeada pequena quantidade de uma cultura estoque congelada, em 30 mL de caldo nutriente Oxoid nº2.

Esse caldo foi incubado por 12-16 h sob agitação constante (160 rpm) de modo a obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL.

Após o crescimento, a cultura foi mantida sob refrigeração durante o período em que a mesma não estava sendo utilizada.

3.8.2.2- Confirmação dos genótipos das linhagens de *Salmonella typhimurium*

a) Auxotrofia para histidina

As culturas bacterianas foram estriadas com alça de platina em placas controle de ágar mínimo acrescidas de histidina e biotina e placas testes

contendo apenas biotina. A biotina é requerida, uma vez que, a deleção do gene *uvrB* se estende até o gene responsável por sua síntese. Após incubação por 24 h a 37°C, as placas testes contendo apenas biotina não apresentaram crescimento, enquanto as placas suplementadas com histidina e biotina apresentaram crescimento.

b) Mutação *rfa*

A mutação no gene *rfa* confere sensibilidade ao cristal violeta. As culturas de *Salmonella* foram inoculadas em placas de ágar nutriente utilizando-se cotonetes estéreis de forma a se obter um crescimento homogêneo. A seguir, foi colocado no centro da placa, um disco de papel de filtro de 5 mm de diâmetro embebido com 10 µl de uma solução de cristal violeta a 1%. As cepas apresentaram um halo de inibição de , no mínimo 14 mm de diâmetro após a incubação a 37° C por 24 h.

c) Plasmídio pKM101

A presença do plasmídio pKM101 foi confirmada através da resistência ao antibiótico ampicilina. As culturas bacterianas foram semeadas perpendicularmente a uma estria de solução de ampicilina 8mg/mL em placas de ágar nutriente. Após incubação a 37° C por 24 h, as cepas portadoras do plasmídio pKM101 apresentaram crescimento contínuo através das estrias da solução de ampicilina.

d) Deleção *uvrB*

A mutação *uvrB* confere sensibilidade à radiação ultravioleta, devido à deficiência no mecanismo de reparo por excisão. As culturas de *Salmonella* foram semeadas em placas de ágar nutriente utilizando-se cotonetes estéreis. A

seguir, metade da placa foi coberta com papel alumínio e irradiada com lâmpada germicida (ultra-violeta) de 15 watts a uma distância de 33 cm.. Após incubação a 37°C por 24 h, as cepas portadoras de deleção *uvrB* cresceram apenas na metade da placa não irradiada (coberta).

e) Taxa de reversão espontânea

A taxa de reversão espontânea foi determinada inoculando-se 100µL de cada cultura (10^8 bactérias) em 2 mL de ágar de superfície estabilizado a 45° C e vertendo-se essa mistura, após homogeneização, sobre uma placa de ágar mínimo. O ensaio foi realizado em triplicata e o número de colônias revertentes espontâneas obtidas após 48 h de incubação a 37°C estava dentro da faixa esperada para cada cepa (240-320 para a TA102, 75-225 para a TA100, 25-75 para a TA98 e de 90-180 para a TA97_A).

3.8.2.3- Sistema de ativação metabólica

Os testes de mutagenicidade foram realizados em presença e ausência de ativação metabólica. O sistema utilizado foi a fração microssomal S9 (S9 mix) preparada a partir de homogenatos de fígado de ratos Sprague Dawley, previamente tratados com Aroclor 1254, adquiridos sob a forma liofilizada da Moltax Molecular Toxicology Inc., Annapolis, USA.

Volumes adequados da mistura de ativação S9 foram preparados no momento do ensaio e mantidos em gelo durante sua execução. Após o ensaio, a mistura não utilizada foi descartada. Foi utilizada a mistura padrão recomendada por Maron e Ames (1983), constituída de 4% de fração S9; 1% de cloreto de magnésio 1,65 M; 0,5% de D-glicose-6-fosfato 1M; 4% de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1 M; 50% de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,4 (81%

de fosfato de sódio dibásico 0,2 M e 19 % de fosfato de sódio monobásico 0,2 M) e 39,5 % de água destilada estéril.

3.8.2.4- Procedimento do ensaio (Maron & Ames, 1983)

Para os ensaios de mutagenicidade foram testadas amostras de CRM, VM, CRHL, Fr.CRHC e Fr.CRHB .

De acordo com essa metodologia, uma solução de histidina /biotina 0,05mM foi adicionada a um ágar de superfície (top-ágar) na proporção de 10 /100 mL, e distribuído em tubos de ensaio em alíquotas de 2 mL. A cada tubo assim composto foram adicionados 0,1 mL da cultura (pernoite) de bactérias e a concentração adequada do extrato seco dissolvido em DMSO (as concentrações variaram de 3,37 a 27 mg do extrato/placa). Nos ensaios com ativação metabólica foi adicionado também 0,5 mL da mistura S9 (fração pós-mitocondrial, suplementada com cofatores e preparada a partir de fígado de ratos tratados com agentes indutores de enzimas-Aroclor 1254). Essa mistura S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou se necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. Em seguida, os tubos foram agitados e vertidos em placas de Petri que já continham o meio mínimo glicosado. Estas placas foram incubadas por 48 horas a 37° C. Transcorrido o tempo necessário, foi efetuada a contagem das colônias revertentes. Todas as concentrações testadas, controles positivos e negativos foram realizados em triplicata.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Avaliação do rendimento de extrações

A fim de se verificar qual era a melhor relação entre massa de planta/ volume de solvente extrator, analisamos a extração de 1,0, 2,0 e 5,0g de pó do córtex das raízes de *B.gaudichaudii* usando sempre 100 mL de MeOH.

A tabela 5 mostra os resultados quantitativos do processo de extração metanólica quando utilizamos diferentes concentrações do pó de córtex da raiz de *B. gaudichaudii*. O extrato a 1% foi o que forneceu maior rendimento percentual (27%) em relação ao peso seco inicial do pó da planta. Os extratos a 2% e 5% renderam 24% e 19%, respectivamente.

Ao aumentarmos a concentração do pó na mistura, o solvente extrator torna-se ineficiente para uma extração adequada, nas condições empregadas.

Usando CCDC foi possível comprovar que nas três concentrações utilizadas, obtivemos extratos com perfil químico semelhantes. Assim, empregamos essa proporção (1%) na extração das diversas partes de *B. gaudichaudii* e do medicamento "V".

Tabela 5: Massas dos resíduos secos e porcentagens provenientes das extrações metanólicas do córtex das raízes

RENDIMENTOS DE EXTRAÇÕES					
1g/100 mL		2,0 g/100 mL		5,0 g/100 mL	
Massa* (g)	%	Massa* (g)	%	Massa* (g)	%
0,27 ± 0,01	27	0,472 ± 0,009	24	0,94 ± 0,02	19

*média de três replicatas

Após avaliarmos a relação soluto/solvente mais adequada para as extrações das cumarinas utilizando MeOH, verificamos o perfil químico das diferentes partes da planta em outros solventes, por CCDC.

Através de CCDC verificamos que o córtex das raízes é a parte da planta que mais apresenta as furanocumarinas psoraleno e bergapteno, independente do solvente extrator. O medicamento "V" apresentou apenas traços dessas furanocumarinas no extrato MeOH. As folhas apresentaram muito clorofila e compostos mais polares, principalmente no extrato MeOH. Galhos e cerne das raízes apresentaram perfil cromatográfico semelhante ao córtex das raízes porém as furanocumarinas em menores concentrações.

Como essa avaliação preliminar dos extratos foi apenas por CCDC, as etapas seguintes consistiram em análises desses extratos através de técnicas mais eficientes. Assim, o passo seguinte deste trabalho consistiu na análise de extratos apolares e de média polaridade do córtex da raiz de *B. gaudichaudii* e do medicamento "V" através da técnica de CG/EM, que tem sido usada com sucesso na separação e identificação de componentes apolares de plantas (Cabelo-Hurtado *et al*, 1998; Cardoso, 2000; Królicka *et al*, 2001; Rycroft *et al*, 1998; Valenciennes *et al*, 1999;).

4.2- Análises Qualitativas

4.2.1- CG/EM

Através dos cromatogramas obtidos por CG/EM dos extratos hexânicos do córtex da raiz (CRH) do vegetal *B. gaudichaudii* e dos comprimidos do medicamento "V", verificamos que a composição do extrato CRH é baseada quase que exclusivamente nas furanocumarinas psoraleno e bergapteno (tr= 13,3 e 15,8 min respectivamente) (Fig.9, Tab.6). Isso foi possível confirmar mediante o

registro dos espectros de massas das substâncias citadas. A presença de picos com tempos de retenção 30,6 e 32,7 min sugere serem terpenos (Cardoso *et al*, 1998). Nos comprimidos "V", verificamos apenas a presença de picos relativos a ácidos graxos sendo o ácido hexadecanóico ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{-COOH}$) em $t_r = 15,00$ min e o ácido octadecanóico ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{16}\text{-COOH}$) em $t_r = 17,15$ min e a ausência de picos referentes ao psoraleno e bergapteno. (Fig.10).

Desta forma, verificamos que o extrato hexânico do córtex da raiz do vegetal *B. gaudichaudii* é rico nas furanocumarinas psoraleno e bergapteno. Já no extrato hexânico do medicamento "V", nas mesmas condições, não evidenciamos a presença do bergapteno, substância ativa indicada pelo fabricante do medicamento "V" no tratamento do vitiligo.

Analisando ainda os cromatogramas relativos à CG/EM dos extratos clorofórmicos dos mesmos materiais, verificamos que as composições destes extratos são semelhantes às daqueles extraídos com hexano. A presença das furanocumarinas psoraleno e bergapteno ocorre apenas nos extratos do córtex da raiz (Fig. 11, Tab. 6). O extrato CHCl_3 do medicamento "V" novamente evidencia apenas a presença dos ácidos graxos (Fig.12). Desta forma, nas condições de extração e análise citadas, não foi possível evidenciar a presença de bergapteno no medicamento "V", sugerindo assim a ausência do princípio ativo no citado medicamento.

Tabela 6 - Fragmentos relevantes obtidos por CG/EM dos extratos CHCl_3 do córtex das raízes

Substância	Resultados Experimentais (m/z)
Psoraleno	186[M] ⁺ , 158[M-CO] ⁺ , 130[158-CO] ⁺ , 102[130-CO] ⁺
Bergapteno	216[M] ⁺ , 188[M-CO] ⁺ , 173[188-CH ₃] ⁺ , 145[173-CO] ⁺

A análise dos extratos apolares e de média polaridade do medicamento "V" evidenciou a ausência das furanocumarinas psoraleno e bergapteno nos extratos hexânico e clorofórmico, enquanto que extratos do córtex da raiz do vegetal *B. gaudichaudii* nos mesmos solventes continham as furanocumarinas citadas.

A utilização de CG/EM nos estudos de furanocumarinas mostrou-se eficiente visto que foi possível através dos fragmentogramas de massa evidenciar que as substâncias majoritárias presentes nos extratos do córtex da raiz realmente são as furanocumarinas psoraleno e bergapteno.

Quanto ao medicamento "V", a ausência de furanocumarinas nos extratos analisados é um alerta de que essas substâncias ou estão em quantidades abaixo do limite de detecção do equipamento ou elas realmente não estão presentes nesse medicamento. Além disso, não há registro na literatura de que os ácidos graxos encontrados possam exercer algum efeito sobre o vitiligo. Isso mostra a importância de um controle de qualidade de medicamentos, de tal forma que um medicamento possa ser consumido com a segurança de que a quantidade de princípio ativo ingerido será aquela descrita na bula.

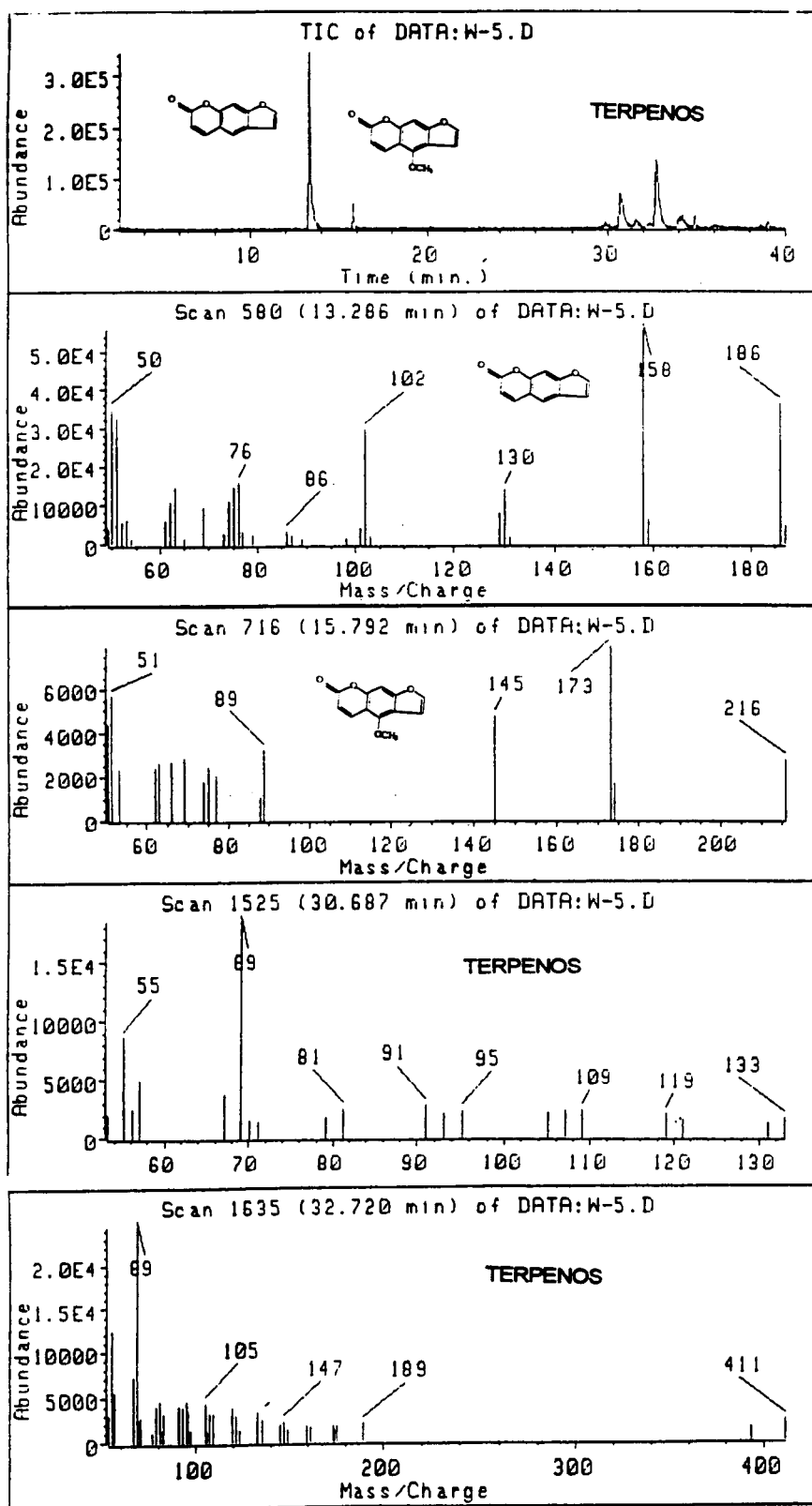


Fig. 09 – CG/EM do extrato hexânico do córtex das raízes (CRHx)

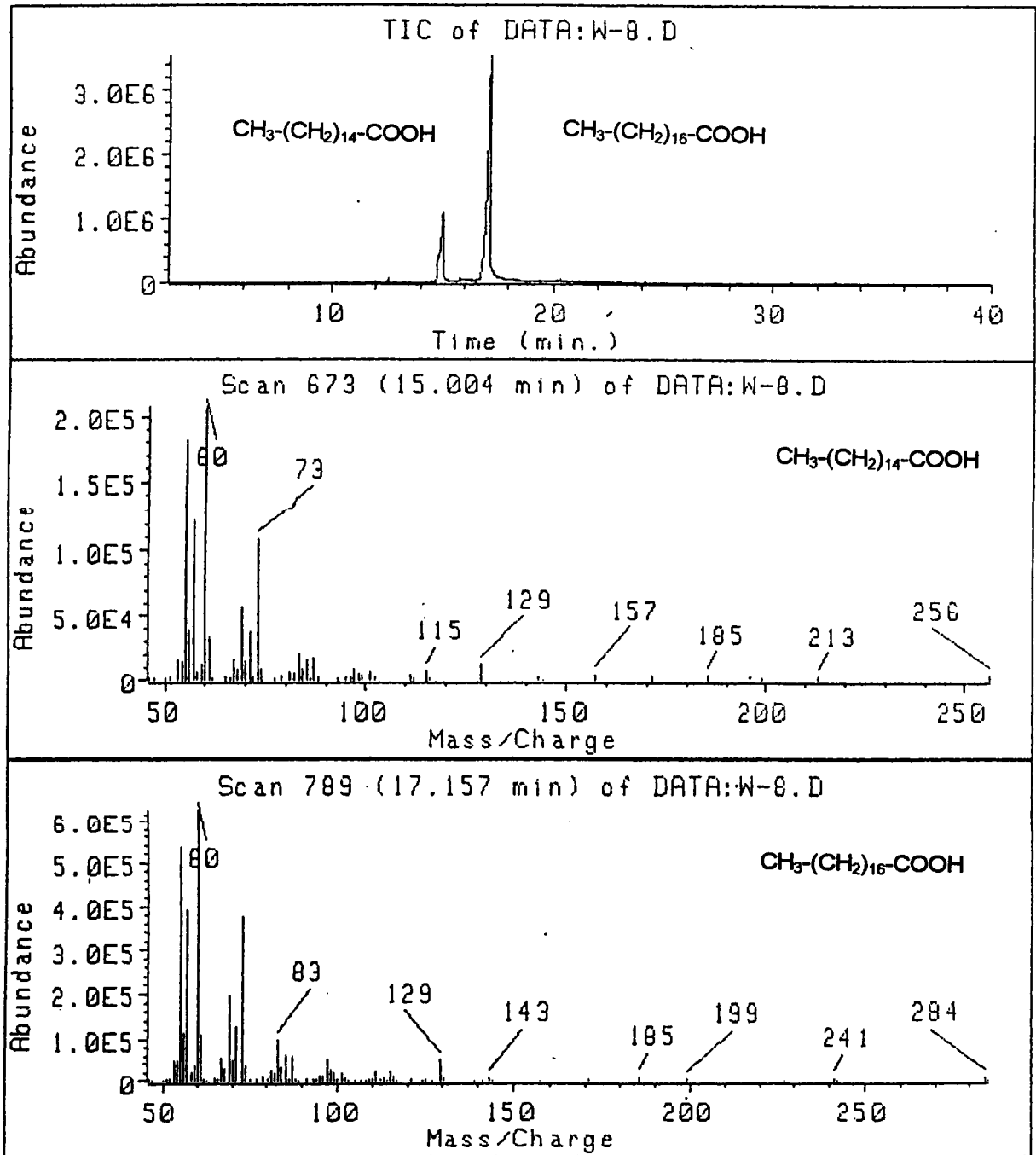


Fig. 10 – CG/EM do extrato hexânico do medicamento "V" (VHx)

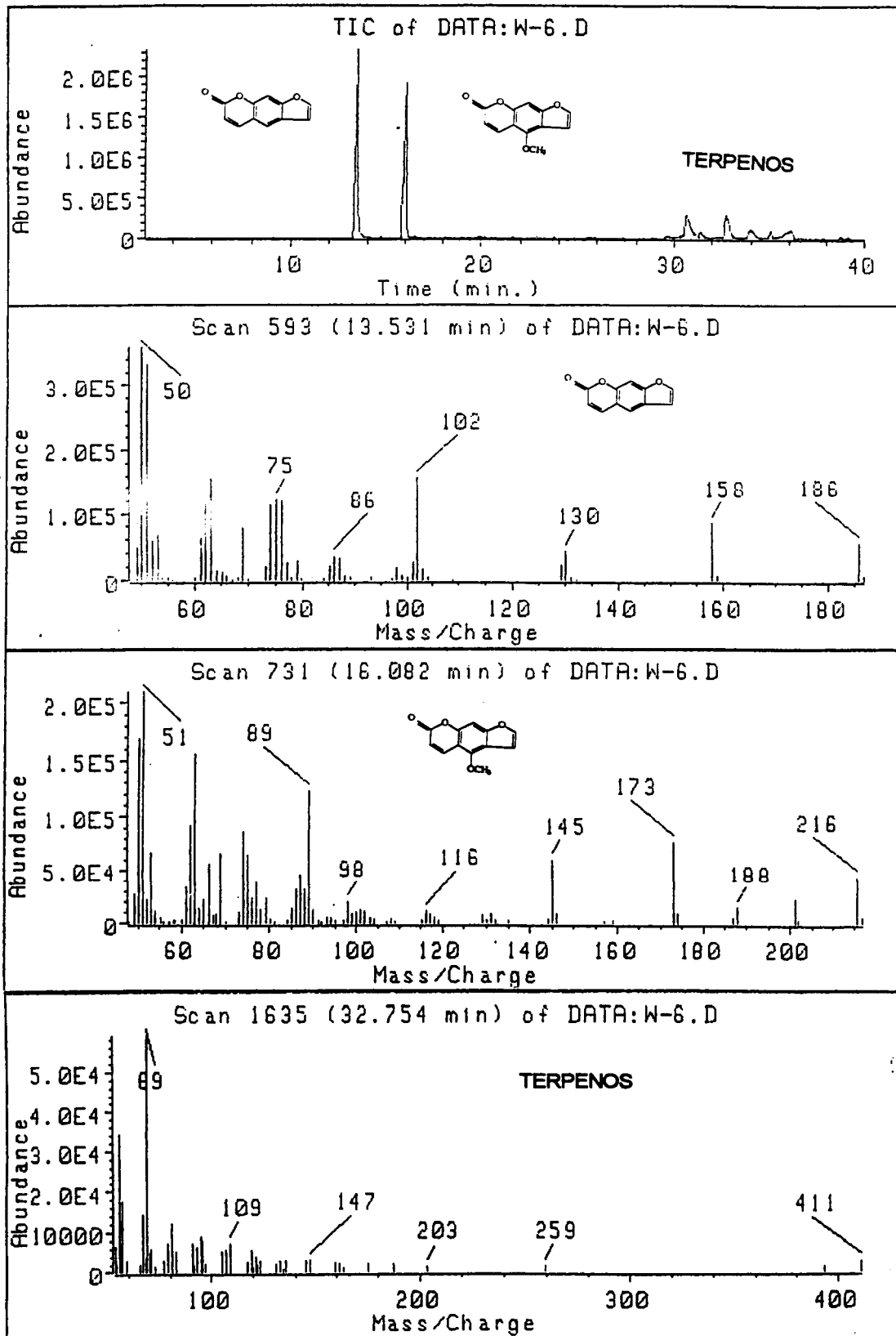


Fig. 11 – CG/EM do extrato CHCl₃ do córtex das raízes (CRC)

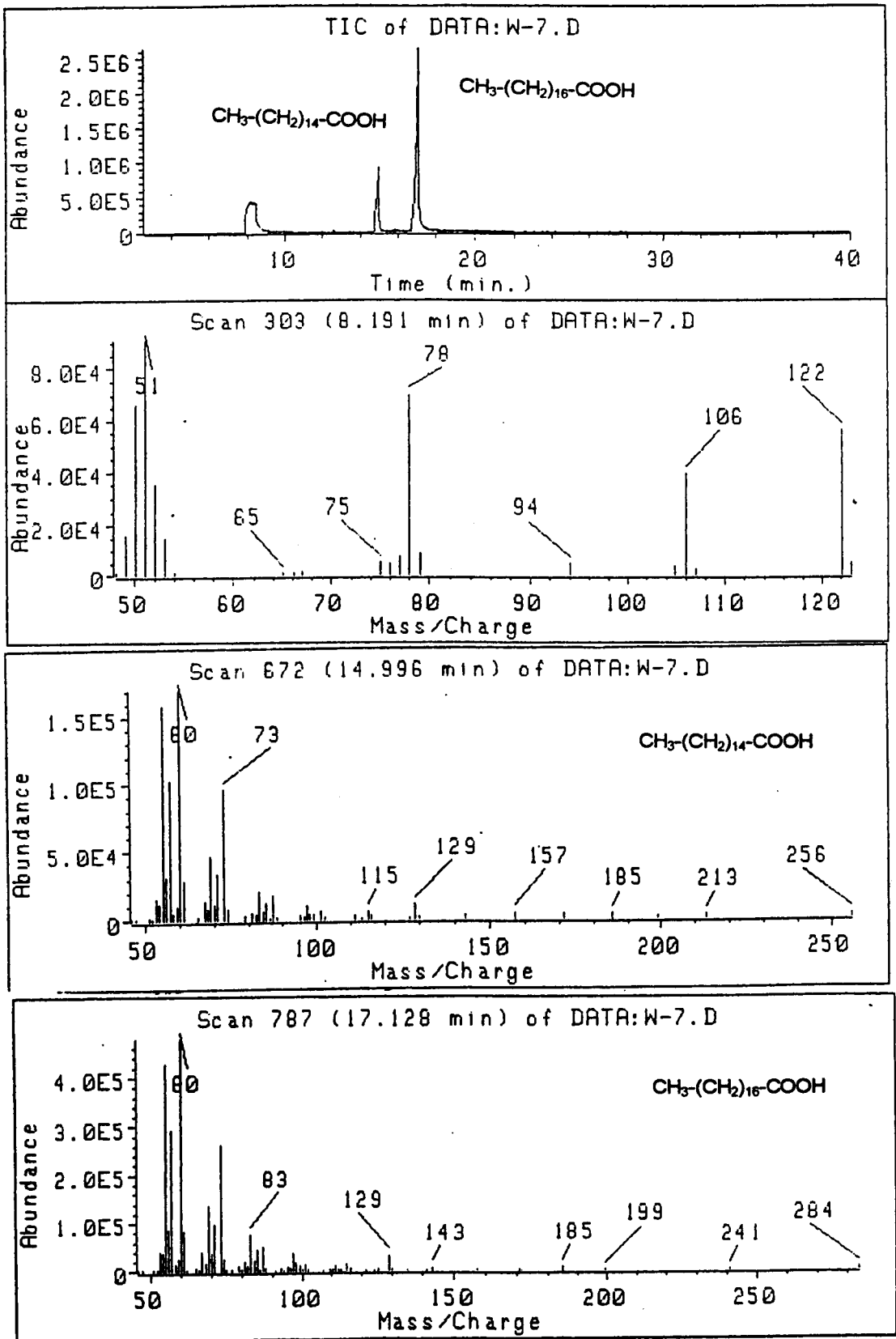


Fig. 12 – CG/EM do extrato CHCl_3 do medicamento "V" (VC)

Segundo Murray (1995), extrações de cumarinas utilizando solventes polares (água, metanol e etanol são mais eficientes do que aquelas que usam solventes apolares ou de media polaridade (acetato de etila, éter e clorofórmio). Isso ocorre tanto para as cumarinas livres como para as glicosiladas.

Baseado nisso, o passo seguinte consistiu em analisar os extratos mais polares do vegetal e do medicamento "V", a fim de verificar se as furanocumarinas realmente seriam melhor extraídas pelo MeOH e H₂O.

Para analisar as substâncias mais polares, utilizamos a técnica de CLAE, pois essa vem fornecendo resultados excelentes nas análises de constituintes polares de plantas (Cardoso *et al*, 1998; Da Silva *et al*, 2000; Strege, 1999).

4.2.2- CLAE/DAD

Os cromatogramas dos extratos metanólicos das diversas partes da planta (FM, GM, CRM, LM e CM) de *B. gaudichaudii* e do medicamento "V" (VM) indicaram diferenças nos perfis cromatográficos.

Nessa fase do trabalho os experimentos realizados por CLAE foram somente qualitativos, de forma que avaliamos o perfil cromatográfico e as proporções entre os componentes dos extratos.

O cromatograma do extrato CRM apresenta três picos bem intensos, sendo um com tempo de retenção 4,06 min (34,8%) e os outros dois em 19,99min (24,3%) e 23,16min (29,0%) (Fig. 13). Esses dois últimos representam o psoraleno e bergapteno na amostra, o que pôde ser comprovado pela comparação dos espectros UV das amostras com aqueles de padrões autênticos das furanocumarinas citadas (Figs.14a e 14b). Tendo em vista que as absortividades molares do psoraleno e do bergapteno são semelhantes, pode-se estimar que a proporção de psoraleno/bergapteno é de aproximadamente 1:1 nesse extrato (Fig. 13).

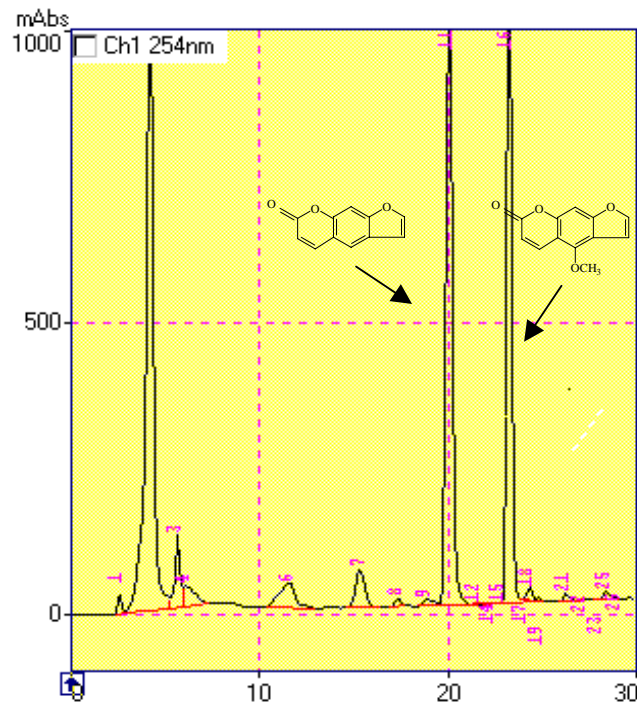


Fig. 13- CLAE de extrato metanólico de córtex das raízes (CRM) de *B. gaudichaudii*

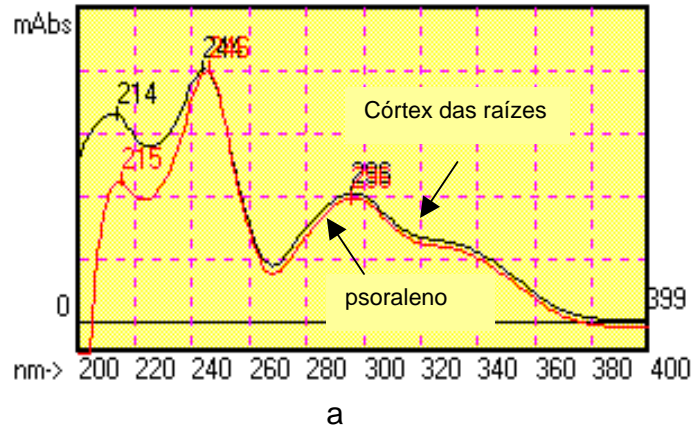


Fig.14a. Espectro no UV do psoraleno contido no córtex da raiz e do padrão de psoraleno

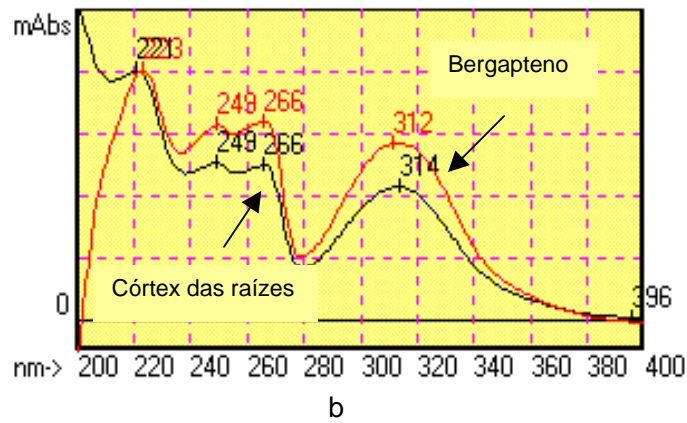


Fig.14b. Espectro no UV do bergapteno contido no córtex da raiz e do padrão de bergapteno

O extrato FM (folha) apresenta um pico intenso com tempo de retenção 4,27 minutos (53,5%) e picos menos intensos em 5,51 min (8,84%); 12,09 min (11,2%); 14,79 min (3,2%) e 15,98min (16,8%). Picos em 19,99 min e 23,11 minutos correspondem ao psoraleno e ao bergapteno (0,59% e 0,29%) (Fig.15), com proporção de aproximadamente 2:1.

Por meio de comparação dos espectros UV das substâncias referentes aos picos com tempo retenção de 19,99 e 23,11 minutos com aqueles de psoraleno e bergapteno podemos confirmar que se tratam das mesmas substâncias (Fig.15).

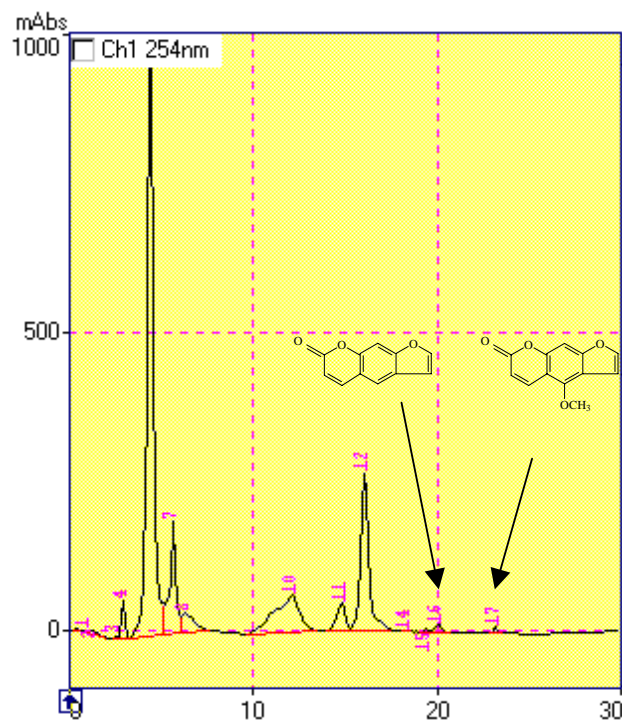


Fig. 15- CLAE de extrato metanólico das folhas (FM) de *B. gaudichaudii*

As análises por CLAE indicaram que o extrato GM (galhos) apresenta um pico intenso em 4,26 min (67,2%) e outro em 5,56 min (10,84%). A presença dos picos em 18,89 min (6,4%) e 23,03 min (4,4%) correspondem ao psoraleno e bergapteno (Fig.16), numa proporção aproximada de 1:1,5.

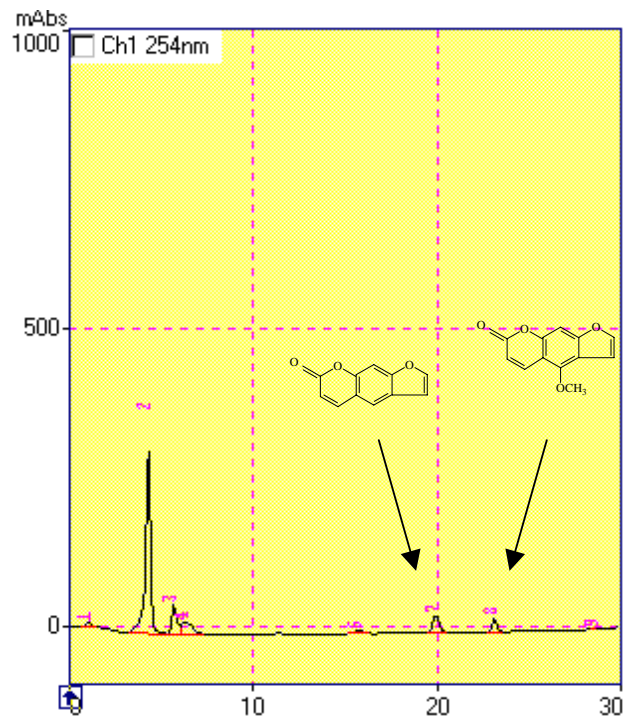


Fig.16- CLAE de extrato metanólico de galhos (GM) de *B. gaudichaudii*

O extrato CeM apresenta em seu perfil cromatográfico quatro picos intensos. O primeiro com tempo de retenção 3,81min (19,2%), um em 19,84min (psoraleno, 47,7%) outro em 22,98min (bergapteno, 20,1%) e o quarto com tempo de retenção 24,16min (4,7%). Desta forma, os extratos metanólicos do córtex (CRM) e do cerne das raízes (CeM) apresentam os picos referentes ao psoraleno e ao bergapteno com intensidades superiores aos dos outros componentes do extrato. Porém, no extrato CRM a concentração de psoraleno é superior à do bergapteno e no extrato CeM ocorre o inverso. No extrato CeM a presença do psoraleno é quase 2,5 vezes maior que do bergapteno (Fig.17).

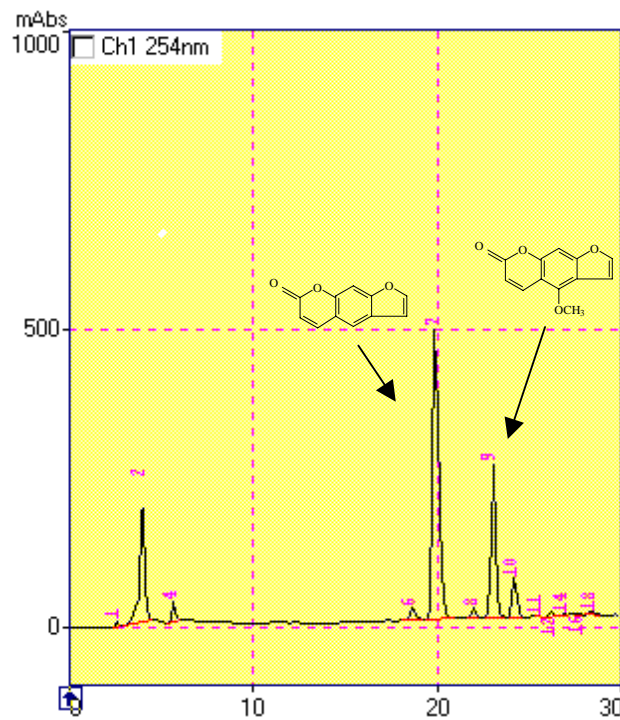


Fig.17- CLAE de extrato metanólico do cerne da raiz (CeM) de *B. gaudichaudii*

O cromatograma do extrato LM apresenta picos referentes a substâncias mais polares com tempos de retenção de 4,487 min e 5,398 min, e evidencia a ausência de picos relativos às furanocumarinas (Fig.18).

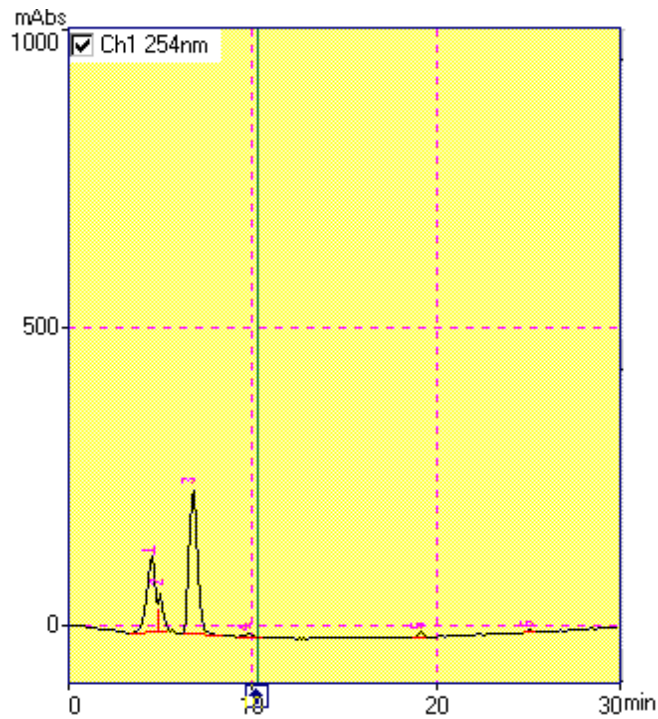


Fig.18 - CLAE de extrato metanólico do látex (LM) de *B. gaudichaudii*

O extrato metanólico do medicamento "V" (VM) apresenta um pico com tempo de retenção 6,27min (82,0%) e picos em 19,57min (0,4%) e 22,83min (2,0%) referentes ao psoraleno e ao bergapteno, em proporções de 1:5 (Fig.19). Quando comparamos o tempo de retenção e o espectro no UV do pico mais intenso do extrato VM com o de uma amostra autêntica de padrão do fator PP verificamos uma perfeita sobreposição, evidenciando assim tratarem-se da mesma substância (Fig.20). Desta forma, o extrato metanólico do medicamento "V" é composto quase que exclusivamente pelo fator PP.

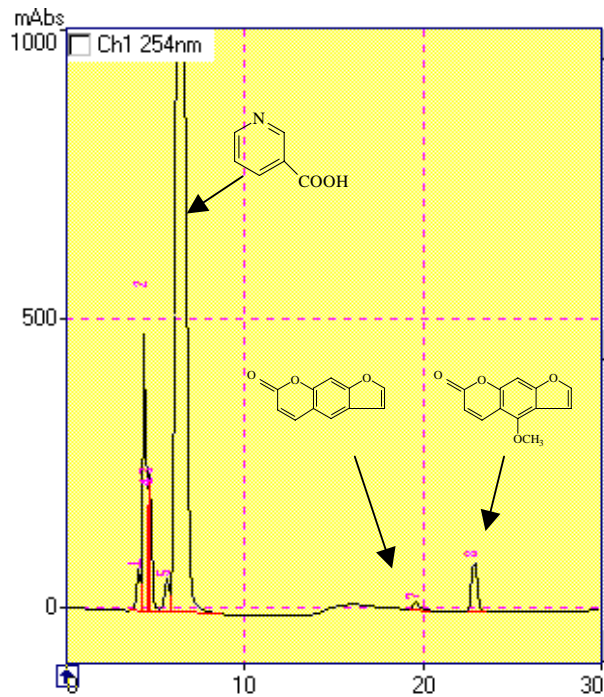


Fig.19 - CLAE de extrato metanólico do medicamento "V" (VM)

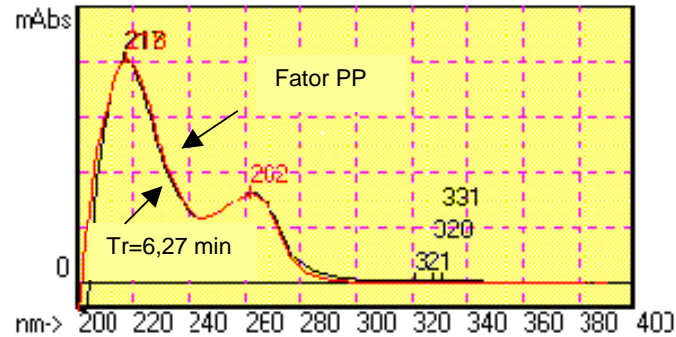


Fig. 20 - Espectro no UV do pico com $t_r=6,27$ min e do padrão do fator PP

Utilizando a técnica de CLAE/DAD foi possível verificar que as furanocumarinas psoraleno e bergapteno estão presentes em todos os extratos metanólicos das diferentes partes do vegetal *B. gaudichaudii*, porém em proporções diferentes.

Analisando as figuras 13, 15, 16, 17, 18 e 19 referentes aos extratos metanólicos, verificamos que a concentração das furanocumarinas nas amostras diminui na seguinte ordem CRM (córtex das raízes) > CeM (cerne das raízes) > VM (medicamento "V") > GM (galhos) > FM (folhas) > LM (látex).

Os extratos FM (folhas) e CRM (córtex das raízes) apresentam picos intensos com tempos de retenção próximos a 4,0 min e o extrato VM é composto quase que unicamente pelo pico 6,27 min. É possível verificar ainda que o extrato metanólico do medicamento "V" (VM) apresenta o bergapteno, porém em pequena quantidade.

Nas análises por CLAE/DAD foi possível obter os espectros no UV de cada pico e comparar com substâncias-padrão, possibilitando a confirmação das substâncias presentes nas amostras com padrões autênticos.

Conforme citação na introdução deste trabalho, o medicamento "V" recebe a adição de fator PP (nicotinamida). De acordo com a literatura (Budavari *et al*, 1996), tanto o ácido nicotínico quanto a nicotinamida são referenciados como fator PP. Assim, pela comparação do espectro no UV do pico com tempo de retenção 6,27 minutos do extrato VM e do padrão de ácido nicotínico verificamos trataram-se da mesma substância.

Desta forma, podemos sugerir que nas condições analisadas o medicamento "V" é composto quase que exclusivamente pelo fator PP e que de bergapteno, o alegado princípio ativo do medicamento "V", encontra-se apenas 0,3 mg/g de peso seco de planta contida no comprimido (Tab.8, pag 74).

O extrato CRM (córtex das raízes) apresenta as furanocumarinas em proporções muito superiores aos outros extratos. O perfil do extrato CeM (cerne das raízes) é semelhante ao CRM (córtex das raízes), porém as intensidades de todos os picos são inferiores no CeM. O extrato FM (folhas) apresenta perfil fitoquímico diferente dos demais, contendo picos na região entre 12,0 - 16,0 min, com espectros no UV semelhantes a flavonóides (Harborne *et al*, 1975; Mabry *et al*, 1970), e picos referentes às furanocumarinas com intensidade relativamente baixas. Os picos das furanocumarinas no extrato GM (galhos) apresentam intensidades superiores àqueles do extrato FM.

Até o momento, os resultados obtidos mostram que as diferentes partes da planta *B. gaudichaudii* apresentam perfis cromatográficos distintos, e conseqüentemente diferenças na composição química dos extratos.

Tendo em vista os resultados anteriores e ao fato de que o medicamento "V" deve ser ingerido com água, preparamos também extratos aquosos do córtex da raiz e do medicamento "V". Foram analisados extratos aquosos liofilizados e extratos aquosos submetidos a partição com CHCl_3 e n-BuOH.

O extrato aquoso liofilizado do córtex da raiz (CRHL) apresenta em sua composição picos referentes às furanocumarinas psoraleno (tr= 19,39 min) e bergapteno (22,45 min) em quantidades inferiores às aquelas presentes no extrato metanólico (Fig. 21).

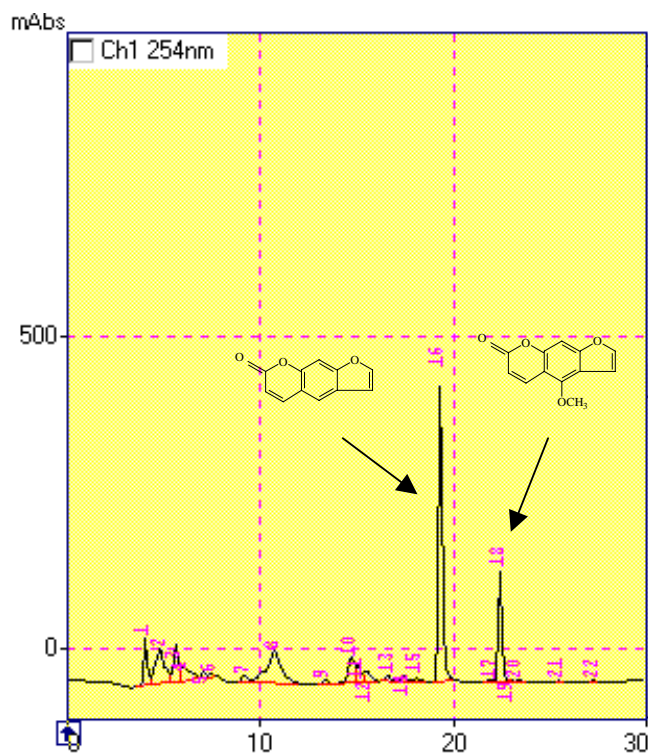


Fig. 21 - CLAE de extrato aquoso liofilizado de córtex das raízes (CRHL) de *B. gaudichaudii*

A fração CHCl_3 do córtex da raiz (Fr.CRHC) apresenta picos referentes às furanocumarinas psoraleno (19,15 min) e bergapteno (22,35 min). Quando comparamos o perfil químico da fração Fr.CRHC com o do extrato CRHC, verificamos que a presença das furanocumarinas nessa fração está intensificada, visto que a partição do extrato aquoso com CHCl_3 concentrou nessa fase orgânica esses compostos menos polares (Fig. 22).

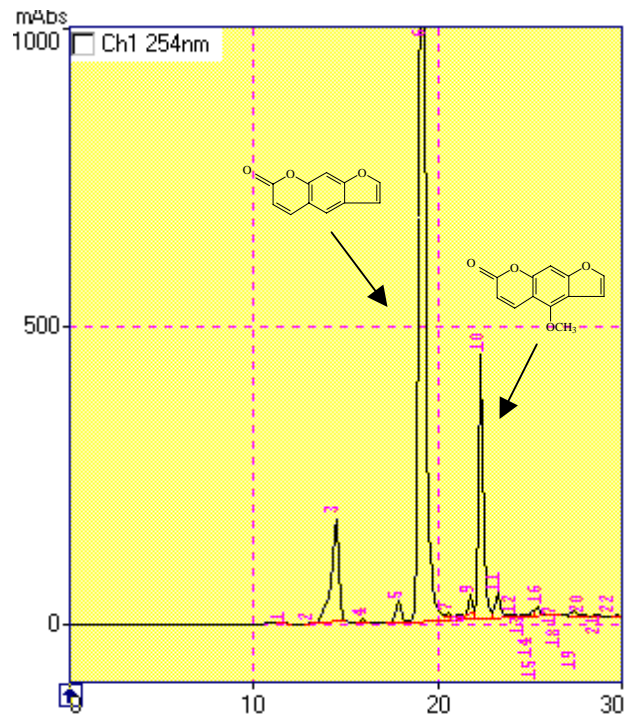


Fig. 22 - CLAE da fração CHCl_3 do córtex da raiz (Fr.CRHC) de *B. gaudichaudii*

Através de CLAE da fração n-BuOH do córtex da raiz (Fr.CRHB) foi possível verificar que essa fração contém os picos referentes às furanocumarinas psoraleno e bergapteno. Foi possível ainda evidenciar que a partição com CHCl_3 retirou do extrato aquoso quase que a totalidade das furanocumarinas psoraleno e bergapteno presentes nos extrato aquoso (Fig.23) .

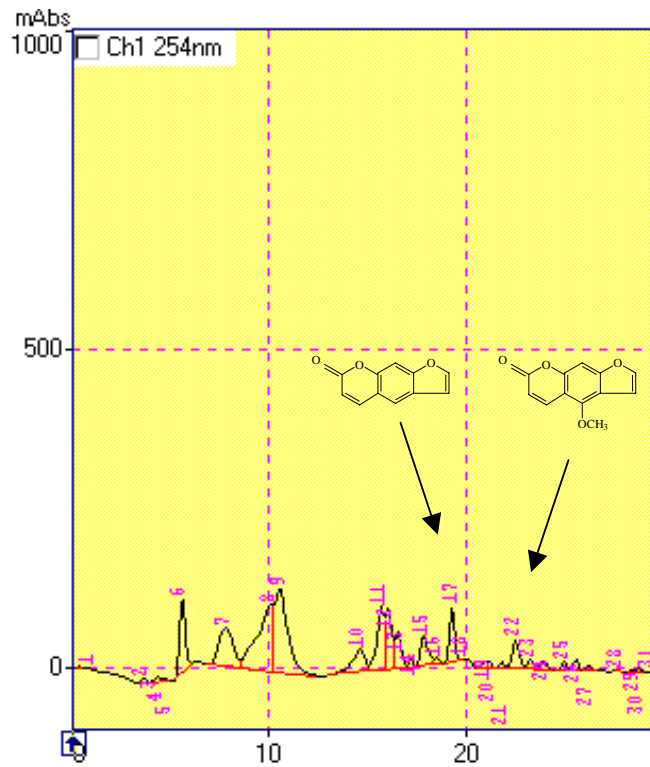


Fig. 23 - CLAE da fração n-BuOH do córtex da raiz (Fr.CRHB) de *B. gaudichaudii*

O extrato aquoso liofilizado (VHL) do medicamento "V" apresenta o pico relativo ao fator PP em maior intensidade que o das furanocumarinas psoraleno e bergapteno. A análise por CLAE evidenciou que a extração aquosa do medicamento "V" forneceu menores concentrações das substâncias presentes no mesmo quando comparado ao extrato metanólico (Fig. 24).

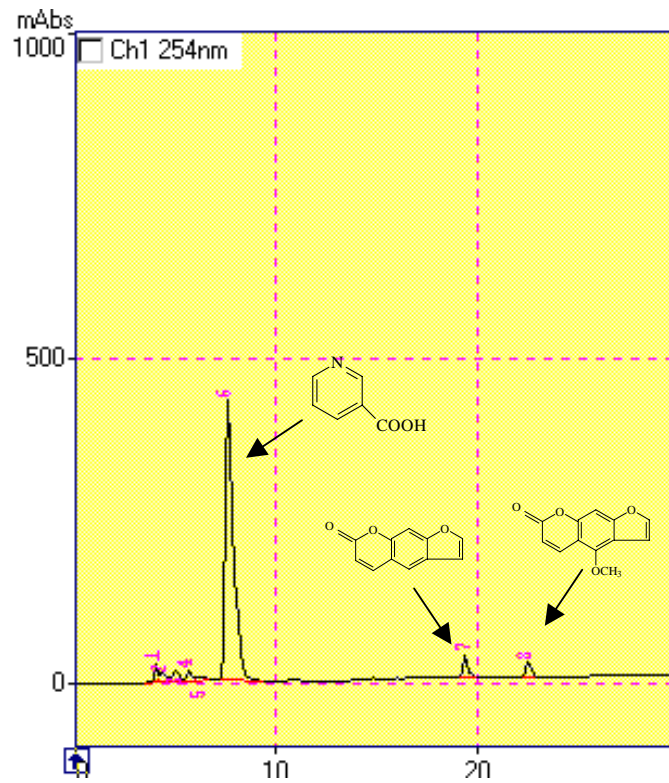


Fig.24 - CLAE do extrato aquoso liofilizado do medicamento "V" (VHL)

A fração CHCl_3 do medicamento "V" (Fr.VHC) apresenta as furanocumarinas psoraleno e bergapteno e o fator PP em proporções semelhantes ($\cong 1:1:1$). A partição do extrato aquoso do medicamento "V" (VH) com CHCl_3 retirou parcialmente o fator PP presente no extrato aquoso (Fig.25).

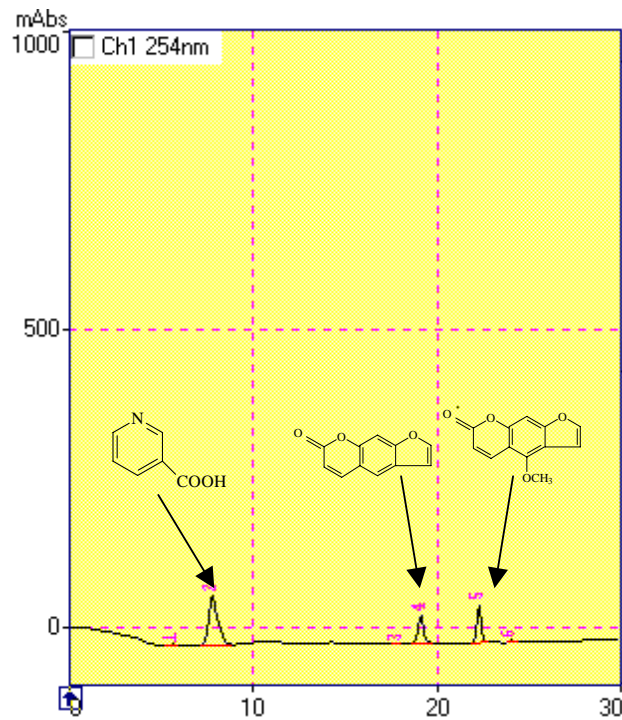


Fig. 25 - CLAE da fração CHCl_3 do medicamento "V" (Fr.VHC)

Através de CLAE da fração n-BuOH do medicamento "V"(Fr.VHB) verifica-se que a partição com n-BuOH retirou grande parte do fator PP presente no extrato aquoso. A furanocumarina bergapteno está presente nessa fração em quantidade reduzida e o psoraleno não foi detectado nessa fração (Fig. 26).

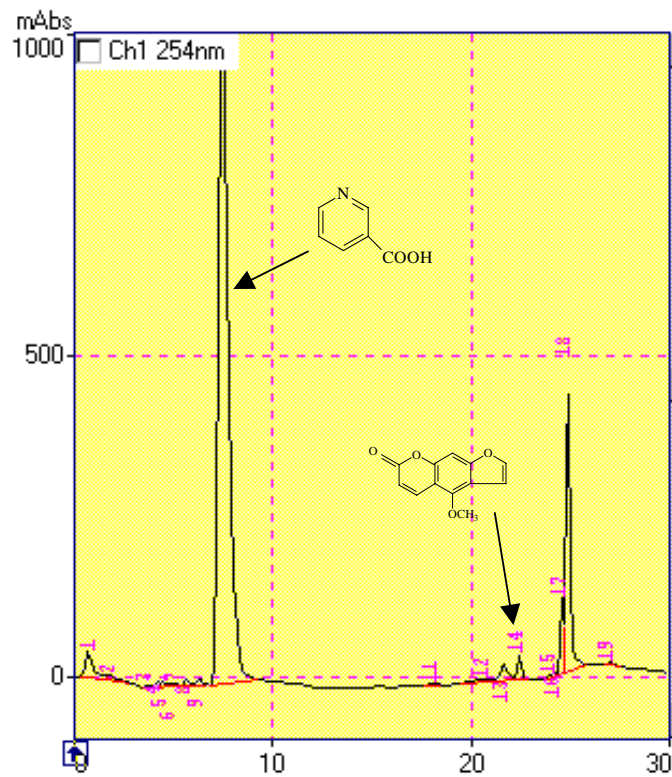


Fig. 26 - CLAE da fração n-BuOH do medicamento "V" (Fr.VHB)

Através de análises por CLAE/DAD do extrato aquoso liofilizado do córtex da raiz (CRHL), verificamos que a extração aquosa forneceu menores quantidades das furanocumarinas nesse extrato. Quando fazemos a partição do extrato aquoso, as furanocumarinas permanecem em maiores concentrações na fração clorofórmica (Figs. 21 e 25). Isso pode ser evidenciado pelos tempos de retenção e pela sobreposição dos espectros no UV de padrões autênticos de psoraleno e bergapteno com os picos presentes nas frações.

Quando analisamos os cromatogramas Fr.VHC e Fr.VHB, do medicamento "V", verificamos que em ambas as frações aparece o pico referente ao fator PP, em maior proporção na fração n-butanólica que na clorofórmica (Figs. 25 e 26). Ainda, o cromatograma do extrato aquoso liofilizado (VHL) evidencia que o constituinte majoritário dos extratos polares do medicamento "V" é o fator PP e que as furanocumarinas apresentam concentrações inferiores ao último ponto da curva de calibração (0,03 µg/µL de psoraleno) (Tab.8, pag.74).

Foi possível observar que a extração com água forneceu extratos com concentrações inferiores de furanocumarinas quando comparadas com o MeOH. Esse fato é importante, tendo em vista que grande parte dos trabalhos utilizam solventes orgânicos para a extração nos estudos de plantas e não água. Por outro lado, a população quando ingere essas plantas na forma de chás ou os medicamentos fitoterápicos ou os fitoderivados, na maioria das vezes utiliza água, levando assim a resultados diferentes daqueles utilizando solventes orgânicos.

As análises realizadas preliminarmente indicaram diferenças qualitativas. Assim, um dos passos seguintes consistiu na quantificação das furanocumarinas no córtex da raiz do vegetal *B. gaudichaudii* e no medicamento "V", para determinar a concentração de bergapteno nesses materiais.

4.3- Análises Quantitativas

Para a análise quantitativa é possível empregar-se vários métodos de calibração. Na quantificação de psoraleno e bergapteno empregou-se o método de calibração externa, no qual injetam-se quantidades conhecidas de padrão, representando-se um gráfico de calibração onde os valores da área dos picos estão em função da concentração do padrão, obtendo-se assim uma curva de calibração linear.

Para isso, construímos uma curva de calibração de psoraleno com concentrações que variaram entre 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - 0,55 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. As soluções do padrão e das amostras foram injetadas 3 vezes, sendo apresentados os desvios padrões relativos referentes aos erros de injeção da amostra.

O valor do coeficiente de correlação (r^2) encontrado para a curva de calibração do psoraleno foi de 0,99862. Isso significa que o método empregado na análise das substâncias citadas obedece a uma correlação linear no intervalo de concentrações considerado. A representação gráfica da curva de calibração de psoraleno está na Fig. 27. A tabela 7 mostra as áreas médias obtidas para cada ponto da curva de calibração.

Tabela 7: Concentrações das soluções-padrão de psoraleno e suas áreas correspondentes na curva de calibração

Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Área \pm SD
0,03	2.098.614 \pm 109.488
0,07	4.009.858 \pm 80.819
0,14	8.175.512 \pm 281.376
0,28	16.499.387 \pm 428.354
0,55	29.940.615 \pm 527.163

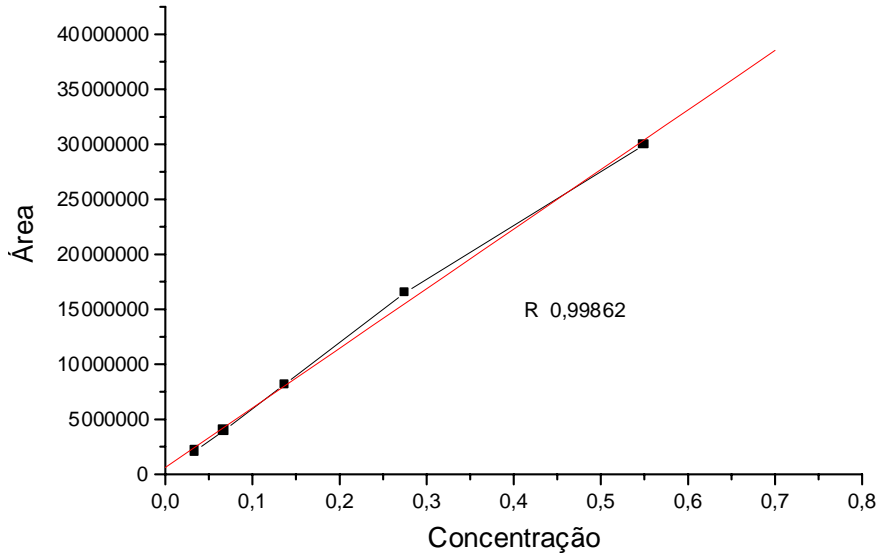


Fig. 27 - Curva de calibração utilizando diferentes concentrações ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de soluções-padrão de psoraleno, por CLAE/DAD

4.3.1- Quantificação de psoraleno e bergapteno nos extratos de córtex (CRM e CRHL) da raiz de *B. gaudichaudii* e do medicamento "V" (VM e VHL)

Tendo em vista as baixas concentrações de psoraleno e bergapteno no medicamento "V" e a variação na composição entre o córtex da raiz do vegetal e o medicamento "V", avaliamos quantitativamente o teor das furanocumarinas nesses materiais por CLAE/DAD.

As concentrações de psoraleno e bergapteno no extrato metanólico do córtex da raiz de *B. gaudichaudii* (CRM) estão em torno de 2,8% e 3,2%, respectivamente. No extrato aquoso do mesmo material, esse teor cai para 0,7% para o psoraleno e 0,26% para o bergapteno. O extrato metanólico dos comprimidos do medicamento "V" apresenta apenas 0,01% de psoraleno e 0,03% de bergapteno. No extrato aquoso não conseguimos quantificar as

furanocumarinas em questão, pois os valores ficaram abaixo da menor concentração da curva de calibração (Tab.8).

Tabela 8: Massas e porcentagem de psoraleno e bergapteno nos extratos do córtex das raízes (CRM e CRHL) e do medicamento "V" (VM e VHL).

Amostra		Psoraleno		Bergapteno	
		mg/gPS	%	mg/gPS	%
MeOH	CRM	27,6 ± 0,7	2,8	32 ± 2	3
	VM	0,14 ± 0,06	0,01	0,3 ± 0,1	0,03
H ₂ O	CRHL	7,1 ± 0,1	0,7	2,60 ± 0,03	0,26
	VHL	ND	ND	ND	ND

ND= valores abaixo da menor concentração da curva de calibração

PS = peso seco de planta

Médias de 3 determinações ± SD

No medicamento "V", o princípio ativo indicado no tratamento do vitiligo é o bergapteno. A concentração do bergapteno nos extratos aquosos não foi quantificada, pois essa foi inferior à menor concentração do padrão utilizada para traçar a curva de calibração.

Na medicação sistêmica, o psoralênico é ingerido na dose de 0,5 a 0,8 mg/Kg duas vezes por semana, duas horas antes da exposição à radiação UVA (Steiner, 1998). Se tomarmos a concentração das furanocumarinas (bergapteno 0,3 mg/g PS e bergapteno 0,14 mg/g PS) no extrato metanólico do medicamento "V" e levarmos em consideração a dosagem mínima (0,5mg/Kg duas vezes por semana) citada no tratamento PUVA, considerando-se ainda uma pessoa com peso médio de 60Kg, esta deveria consumir 60mg de bergapteno/semana. Segundo a bula, a dosagem indicada do medicamento "V", para o tratamento do vitiligo, é de 2 comprimidos/dia (0,36mg de psoraleno e bergapteno). Ao final de uma semana, a quantidade total ingerida seria de 2,52 mg de bergapteno. Assim, pacientes

utilizando o medicamento "V" estariam ingerindo somente cerca de 4,2% da dose semanal necessária ao tratamento, ou seja uma quantidade muito abaixo da necessária.

Muito embora algumas vezes o princípio ativo isolado da planta não seja o único responsável por uma determinada atividade biológica, devido ao sinergismo ou até mesmo pela proteção de uma molécula através de outra, o estudo e a quantificação dos princípios ativos nas plantas torna-se necessário. Isso se deve ao fato da necessidade de um marcador quantitativo que indicará um bom controle de qualidade (Houghton, 2001).

O medicamento "V" cita apenas a quantidade de material vegetal utilizada na confecção do mesmo, porém não referencia a quantidade de princípio ativo, como pede a nova legislação de medicamentos preparados a partir de plantas (Brasil, 2000).

4.4- Identificação das substâncias presentes nos extratos do córtex da raiz (CRM) e das folhas (FM)

Tendo em vista os seguintes resultados anteriores:

- 1) O medicamento "V" apresenta um teor de psoraleno e bergapteno inferior ao do córtex da raiz que é de 2,75%
- 2) O estudo da extração mostra que a maior quantidade de material é extraída pelo metanol (tab. 3)
- 3) O estudo dos componentes polares do vegetal ainda apresenta lacunas

A etapa seguinte do trabalho consistiu em fracionar os extratos polares do medicamento (VM), do córtex da raiz (CRM) e das folhas do vegetal (FM) em escala preparativa a fim de se determinar quais são os componentes polares da planta e do medicamento "V".

4.4.1- Extrato CRM

A técnica utilizada para o fracionamento do extrato MeOH do córtex da raiz (CRM) foi a CCCG. Esta separação gerou apenas duas frações em quantidade e pureza suficientes para podermos identificá-las (Bg₁ e Bg₂). Comparação com dados da literatura permitiram deduzir que Bg₁ tratava-se de uma mistura de psoraleno e bergapteno (Fig.28, Tab. 9)(Steck & Mazurek, 1972). Os espectros de RMN ¹H e de ¹³C (Figs.29 e 30)(Tab. 10) indicaram que a fração Bg₂ tratava-se da (+)-(2'S,3'R)-3-hidroxiarmesina (Fig. 2, pág.5), anteriormente isolada do córtex das raízes de *Brosimum gaudichaudii* (Vilegas & Pozetti, 1993).

Tabela 9- Deslocamentos químicos de RMN ¹H do Psoraleno e do Bergapteno (CDCl₃, TMS, ppm, 200 MHz)

Posição	Psoraleno		Bergapteno	
	Experimentais	Literatura	Experimentais	Literatura
3	6,34	6,33	6,23	6,25
4	7,71	7,75	8,11	8,14
5	7,67	7,64	-	-
6 ou 8	7,43	7,41	7,08	7,12
a	6,81	6,79	7,00	7,02
b	7,66	7,65	7,57	7,59
OMe	-	-	4,24	4,25

Tabela 10- Deslocamentos Químicos de RMN ^1H e ^{13}C de (+)-2'S,3'R)-3-hidroxiarmesina (DMSO-d₆, TMS, ppm, 200 MHz)

Posição	(+)-2'S,3'R)-3-hidroxiarmesina			
	Resultados Experimentais		Dados da Literatura	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2		160,3		160,4
3	6,26	111,9	6,25	111,9
4	7,99	144,5	8,00	144,8
5	7,65	125,6	7,65	125,7
6		128,3		128,5
7		162,8		162,8
8	6,91	97,7	6,91	97,8
9		156,1		156,2
10		112,5		112,8
2'	4,33	91,9	4,32	91,9
3'	5,26	71,3	5,26	71,0
4'		70,2		70,1
OH3'	6,06		6,06	
OH4'	4,86		4,86	
Me	1,35	26,7	1,35	26,9
Me	1,31	26,3	1,31	26,5

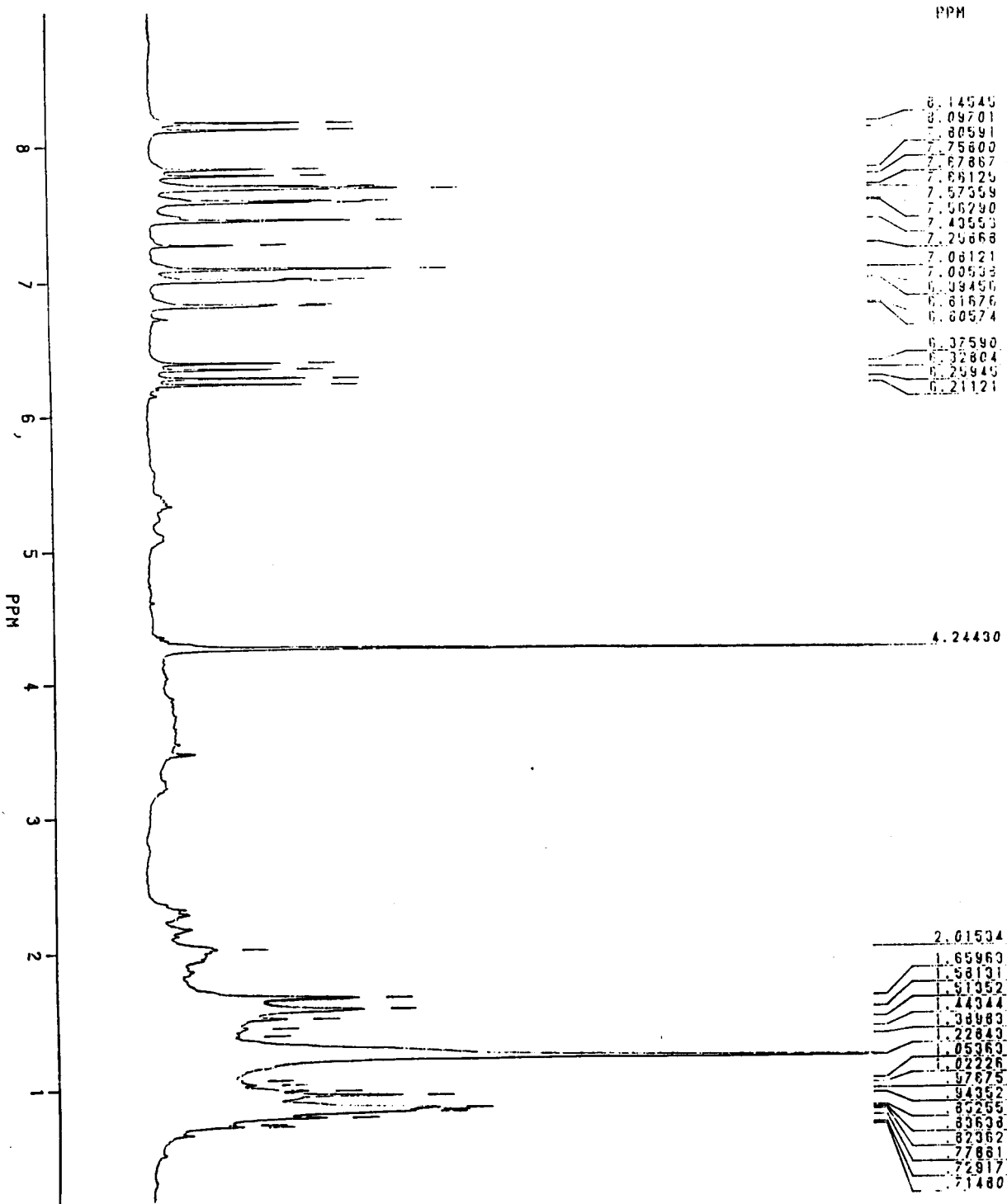


Fig. 28 – RMN ¹H da mistura psoraleno/bergapteno

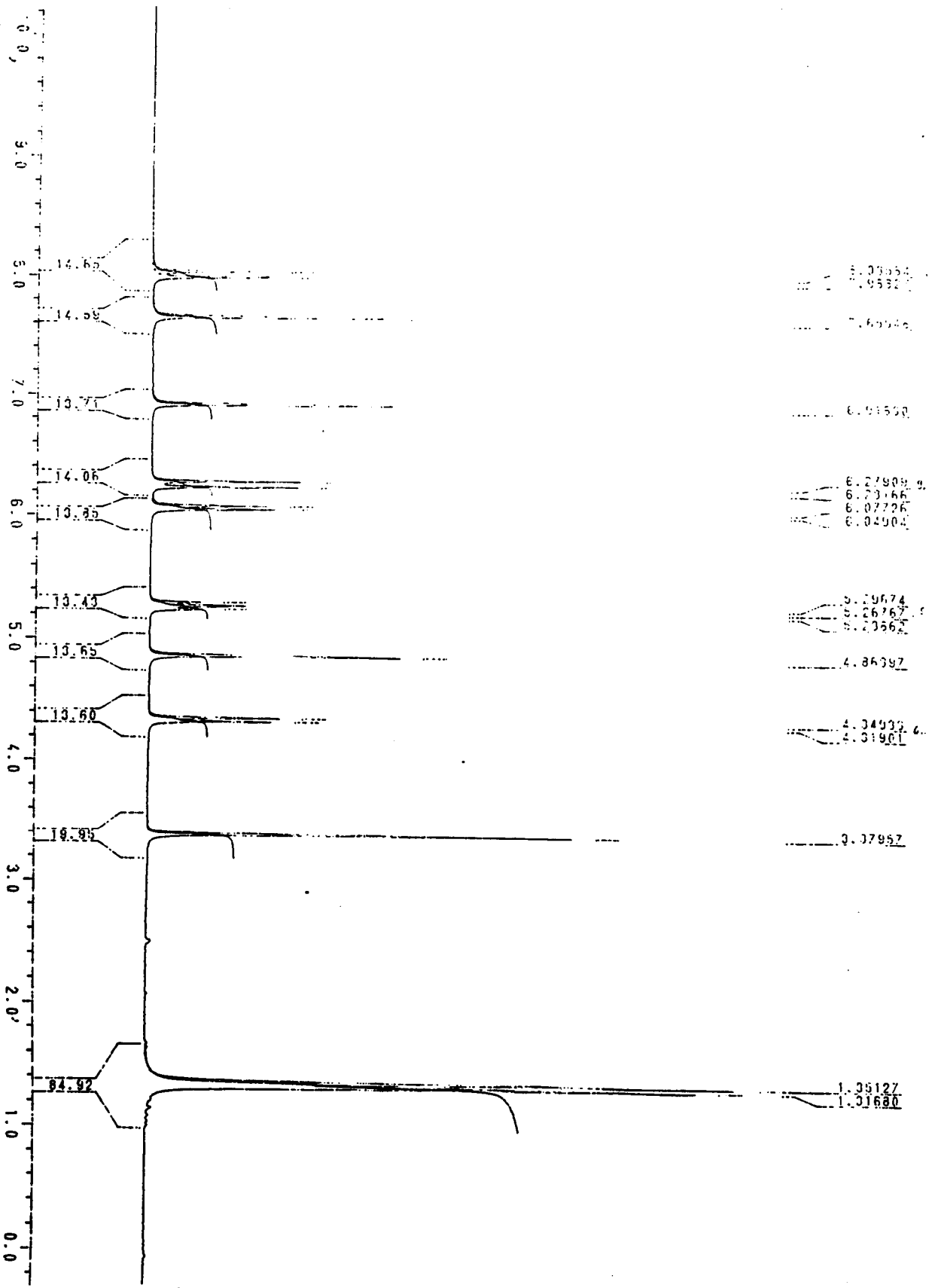


Fig. 29- RMN ¹H de (+)-(2'S,3'R)-3-hidroximarmesina

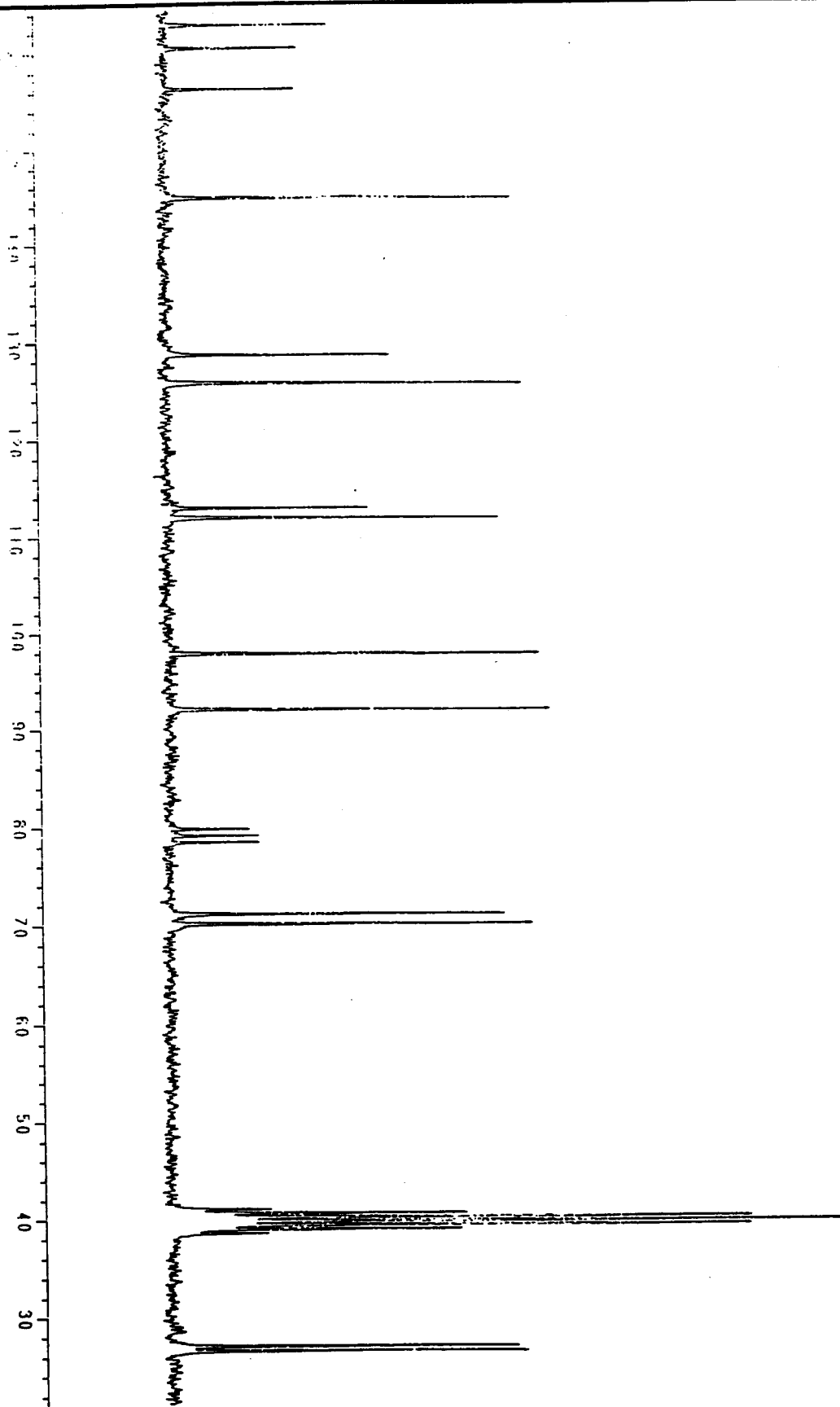


Fig. 30 – RMN ^{13}C de (+)-(2'S,3'R)-3-hidroxi-marmesina

4.4.2- Extrato de FM

O extrato metanólico das folhas de *B. gaudichaudii* (FM) foi fracionado em coluna de Sephadex LH-20. As frações obtidas foram purificadas por CLAE preparativo, fornecendo as substâncias Bg₃ e Bg₄, que foram analisadas por CLAE/DAD, ES-MS e RMN.

Comparação com dados da literatura (Agrawal, 1989; Harborne *et al*, 1975; Harborne, 1993; Hostettmann *et al*, 1997; Stobiecki, 2000) permitiram deduzir que Bg₃ trata-se da 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona (iso-orientina) (Fig. 31) e Bg₄ 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol (Fig. 32).

Estas informações puderam ser confirmadas mediante dados de UV(Figs. 33 e 34), ES/EM (Figs.35, 36, 37 e 38) e RMN de ¹H e ¹³C (Figs. 39, 40, 41, 42, 43 e 44) das duas substâncias citadas (Tabelas 11, 12 e 13).

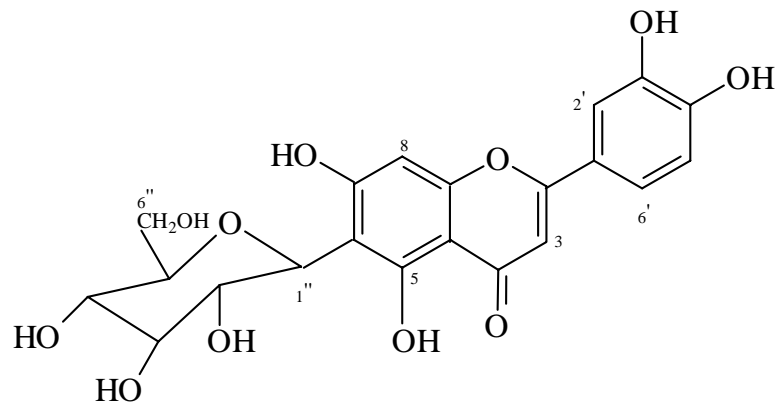


Fig. 31 - 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona (Bg₃)

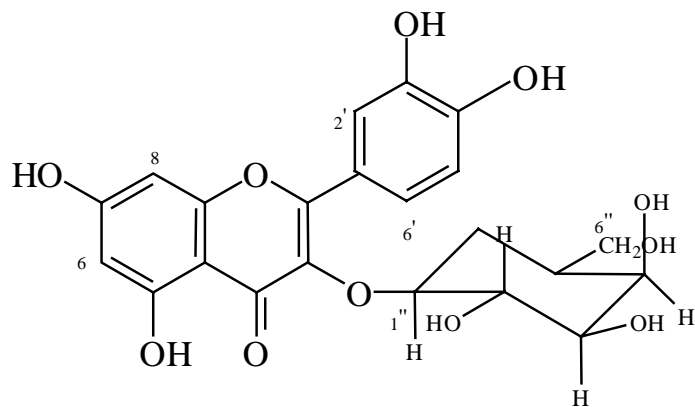


Fig. 32 - 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol (Bg₄)

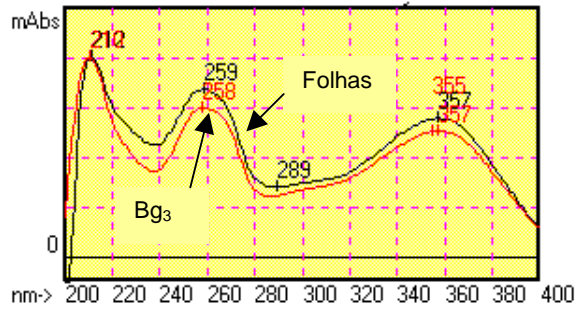


Fig.33 - Espectro no UV do pico com $t_r=12,57\text{min}$ do extrato metanólico de folhas de *B. gaudichaudii* e de Bg_3

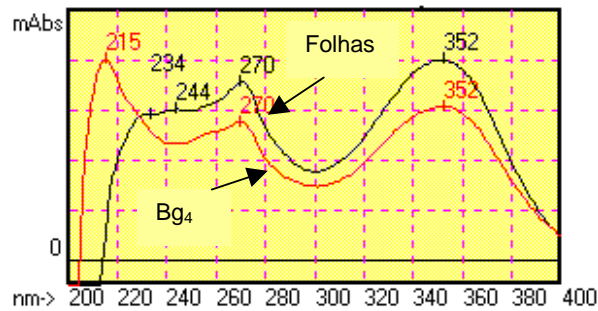


Fig. 34 - Espectro no UV do pico com $t_r=16,25\text{min}$ do extrato metanólico de folhas de *B. gaudichaudii* e de Bg_4

Tabela 11 - Fragmentos de EM relevantes de Bg₃ e Bg₄ (PI 100V).

Substância	Resultados experimentais (<i>m/z</i>)
5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona (iso-orientina) (Bg ₃)	471[M+K] ⁺ , 455[M+Na] ⁺ , 433[M+H] ⁺ , 313[M+H-120] ⁺ ,
5,7,3',4' tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol (Bg ₄)	503[M+K] ⁺ , 487[M+Na] ⁺ , 465[M+H] ⁺ , 303[M+H-Gal] ⁺

Tabela 12 - Fragmentos de EM relevantes de Bg₃ e Bg₄ (NI 70V).

Substância	Resultados experimentais (<i>m/z</i>)
5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona (iso-orientina) (Bg ₃)	431[M - H] ⁻
5,7,3',4' tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol (Bg ₄)	463[M-H] ⁻ , 301[M-H-Glu] ⁻

Quando analisamos os fragmentos relevantes da substância Bg₃, no modo positivo, verificamos que o pico do íon molecular aparece em *m/z* 433. O pico em *m/z* 313 é referente a [M+ H -120]. Este fragmento é característico da clivagem do C-glicosídeo (Hostettmann *et al*, 1997; Stobiecki, 2000). Os fragmentos em *m/z* 455 e *m/z* 471 são referentes ao [M+ Na]⁺ e [M + K]⁺, respectivamente (Fig.35). No modo negativo podemos observar a presença do fragmento em *m/z* 431 relativo ao íon molecular desprotonado [M - H]⁻ (Fig.36).

Os fragmentos relevantes da substância Bg₄ no modo positivo observam-se em m/z 465, referente ao íon molecular protonado $[M + H]^+$, em m/z 303 da aglicona $[M + H - Gal]^+$ (465 - 162), além dos fragmentos dos adutos de sódio e potássio de m/z 487 $[M + Na]^+$ e m/z 503 $[M + K]^+$ (Fig.37). No modo negativo observam-se os fragmentos m/z 463 $[M - H]^-$ e m/z 301 $[M - H - Gal]^-$ (Fig.38) .

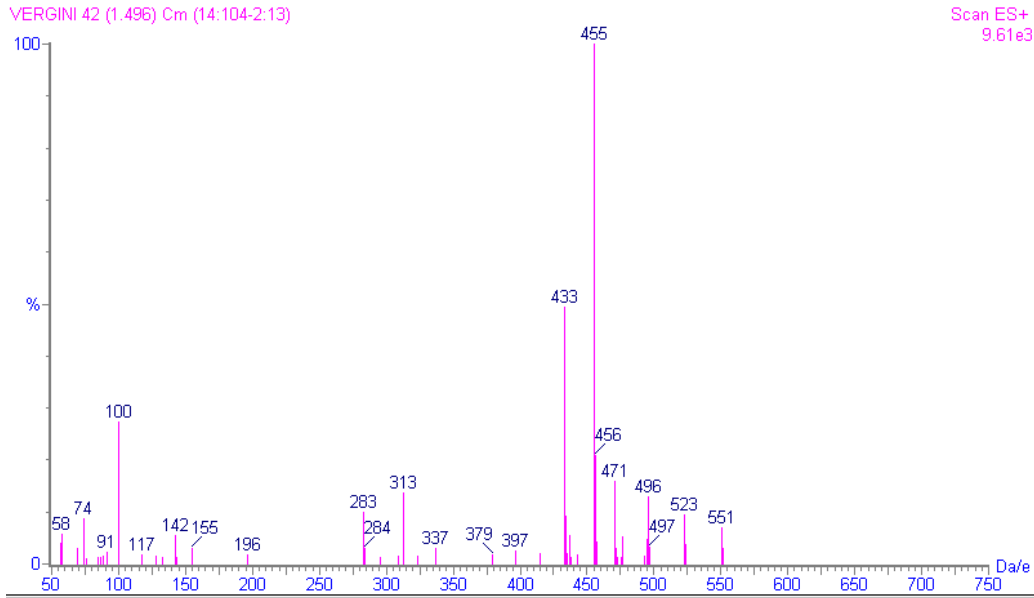


Fig. 35- Espectro ES/EM da substância Bg₃ (100V modo positivo)

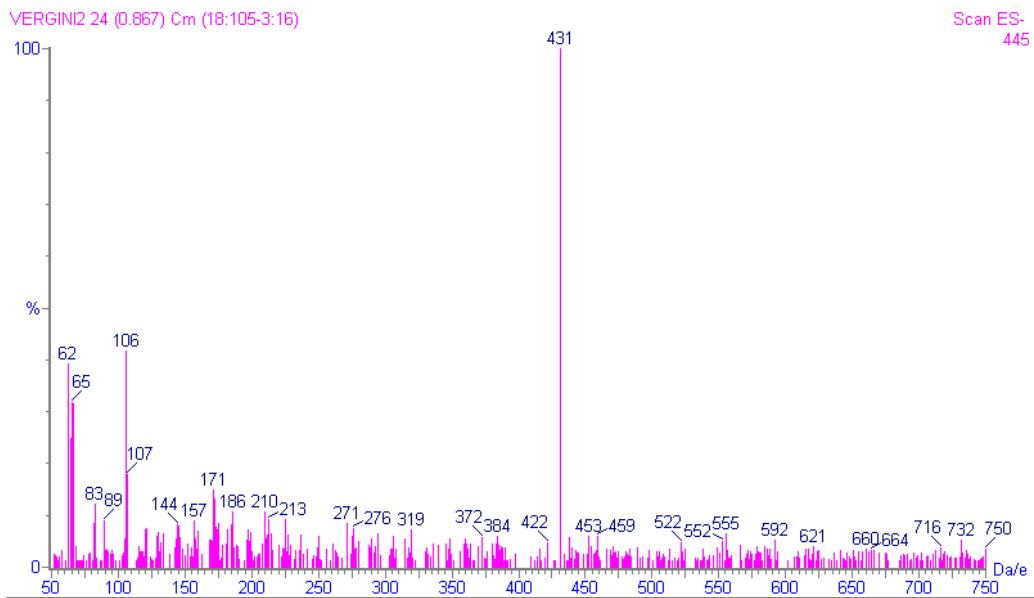


Fig. 36- Espectro ES/EM da substância Bg₃ (70V modo negativo)

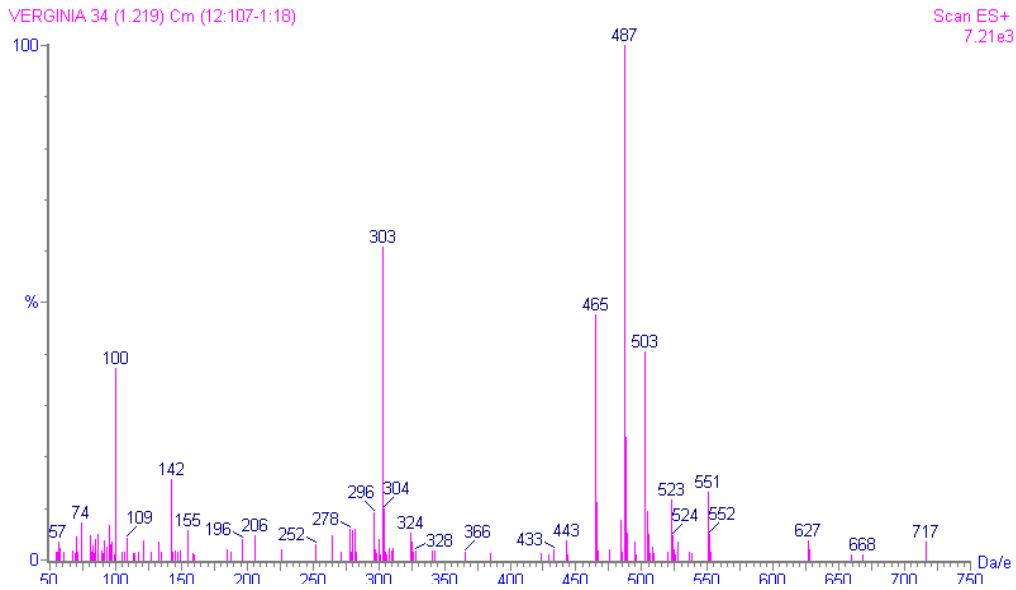


Fig. 37- Espectro ES/EM da substância Bg₄ (100V modo positivo)

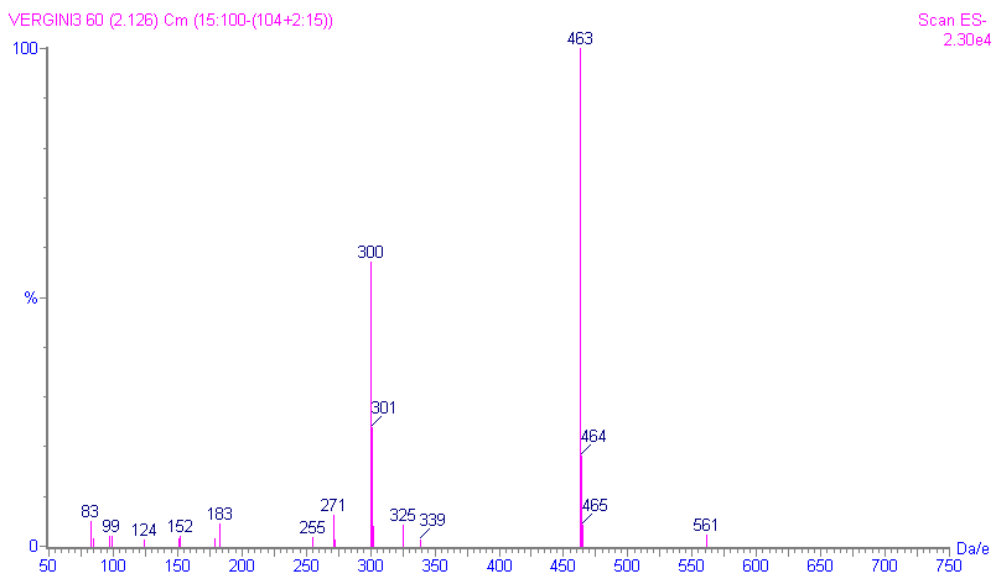


Fig. 38- Espectro ES/EM da substância Bg₄ (70V modo negativo)

Tabela 13 - Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C de Bg₃ e Bg₄ (DMSO-d₆, TMS, ppm, 500 MHz)

Posição	Bg ₃				Bg ₄			
	Experimentais		Literatura		Experimentais		Literatura	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
2	163,8		163,6		156,5		156,3	
3	103,2	6,66	103,3	6,78	133,5		133,8	
4			181,8		177,6		177,6	
5	156,9		156,1		161,2		161,3	
6	109,8		108,7			6,20	98,8	6,20
7			163,6				164,2	
8	94,0	6,48	93,5	6,53	93,8	6,40	93,6	6,40
9	161,8		160,6				156,5	
10	103,5		102,7				104,2	
1'			121,3		121,4		121,4	
2'	114,0	7,36	113,2	7,43	115,6	7,52	115,2	7,59
3'			145,7				144,8	
4'			149,6		148,4		148,5	
5'	117,5	6,88	116,0	6,92		6,80	116,5	6,83
6'	120,0	7,40	118,9	7,44	121,6	7,62	121,6	7,59
1''	73,4	4,60	72,7	4,60	101,8	5,40	102,3	5,40
2''		4,00	70,8		71,19		71,3	
3''		3,19	79,0		73,1		73,4	
4''			70,0		67,9		68,0	
5''	81,5	3,32	81,3		75,8		75,8	
6''	61,6	3,60	61,8		60,1		60,8	

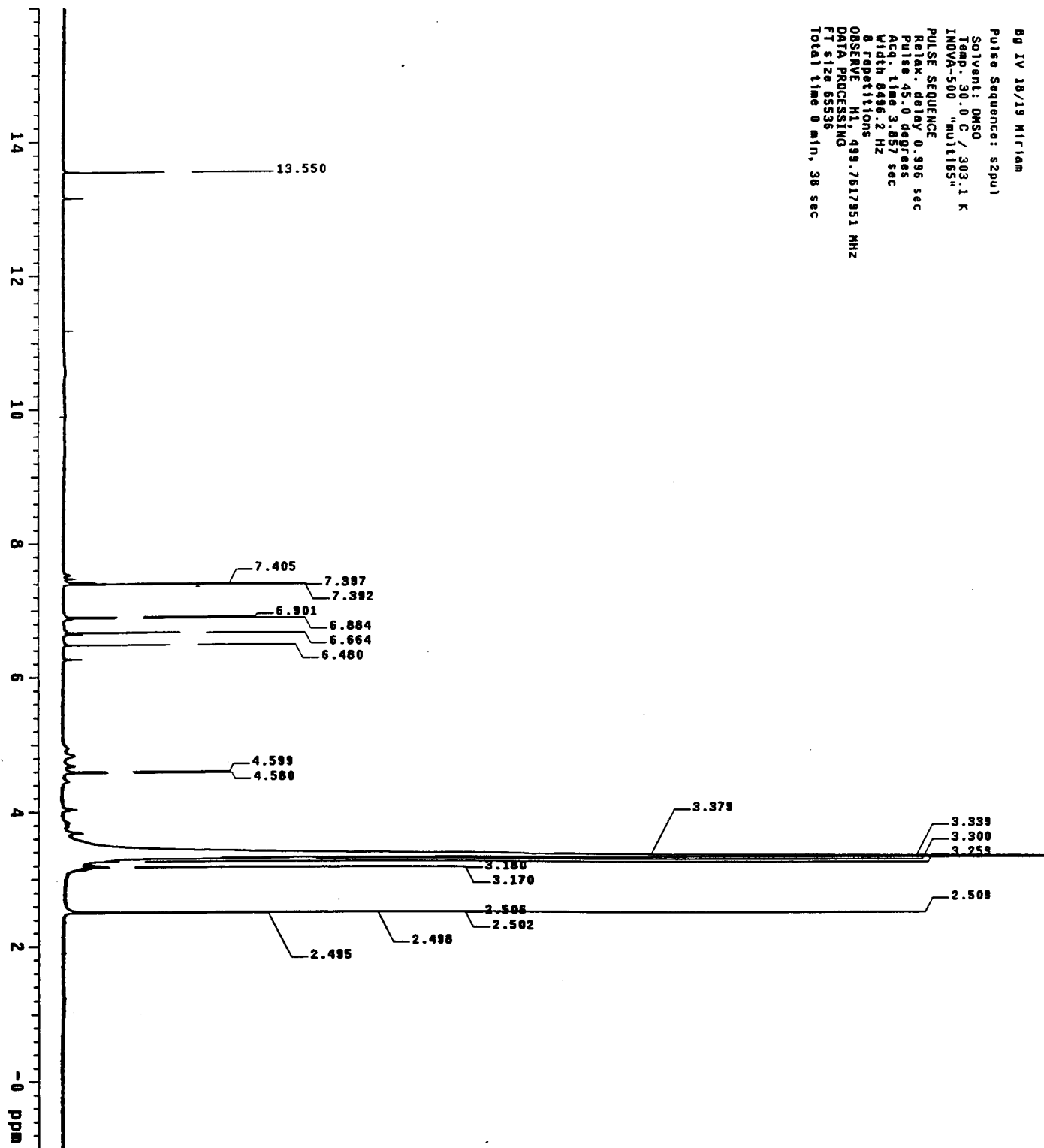


Fig. 39 – RMN ¹H de 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona (Bg₃)

Resultados e Discussão

Bg IV 18/19 Miriam
Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: DMSO
Temp: 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "MULTI63"
PULSE SEQUENCE: gHMBC
Relax. delay: 1.000 sec
Acq. time: 0.241 sec
Width: 9996.2 Hz
2D Width: 90154.5 Hz
124 Repetitions
128 Increments
OBSERVE: H1, 499.7617951 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell: 0.121 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell: 0.002 sec
FT size: 4096 x 2048
Total time: 5 hr, 51 min, 8 sec

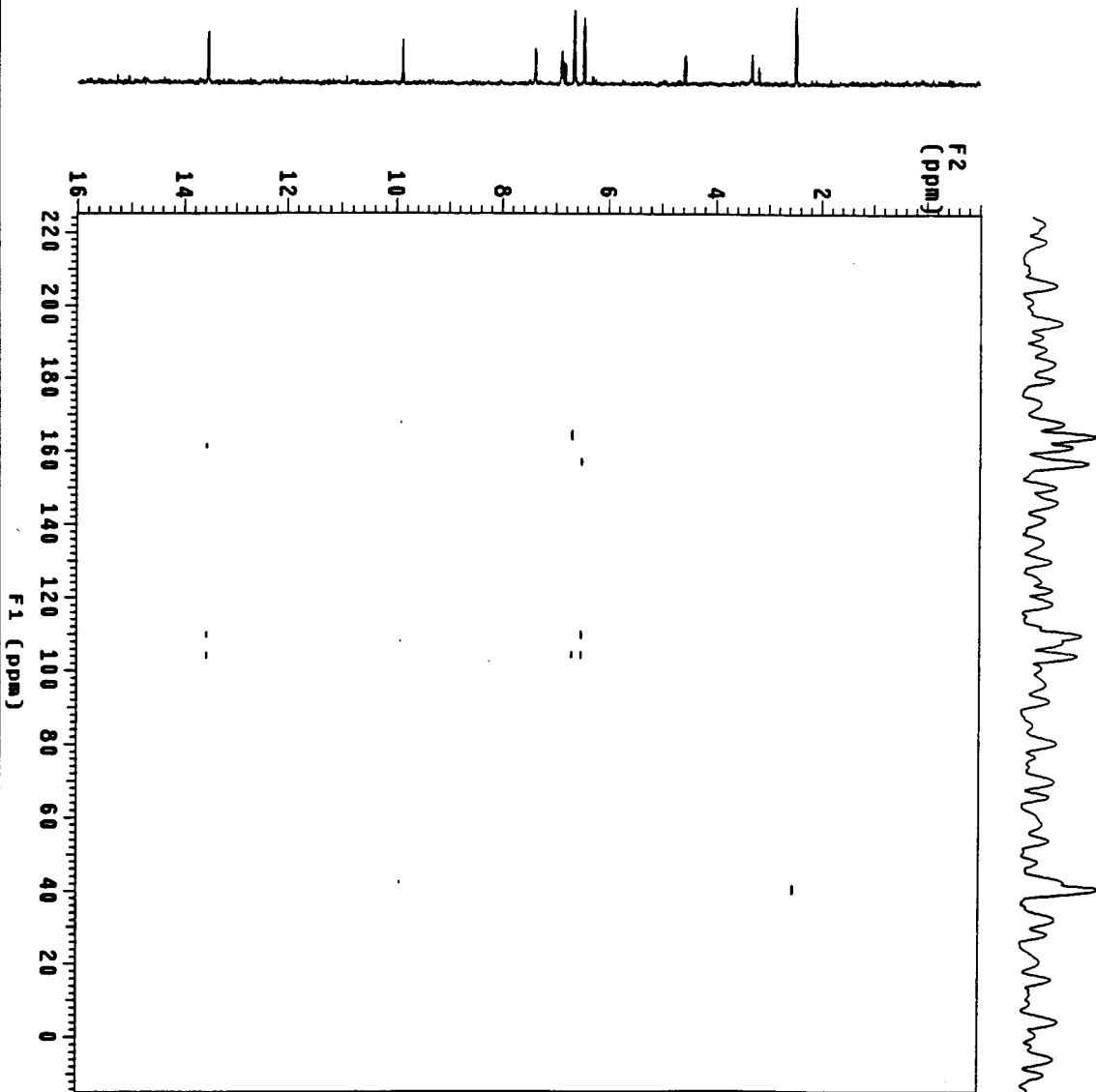


Fig. 40 - Espectro gHMBC de 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona (Bg₃)

Bg IV 18/19 Miriam
 Pulse Sequence: gHMOC
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 INOVA-500 "MULTI185"
 PULSE SEQUENCE: gHMOC
 Relax. delay: 1.000 sec
 Acq. time: 0.241 sec
 Width: 6496.2 Hz
 2D Width: 20105.6 Hz
 64 repetitions
 2 x 126 increments
 OBSERVE: H1, 498.7617851 MHz
 DECOUPLE: C13, 125.8752285 MHz
 Power: 46 dB
 on during acquisition
 or during delay
 GARP-1 modulated
 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.111 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.003 sec
 FT size 4096 x 2048
 Total time 5 hr, 54 min, 24 sec

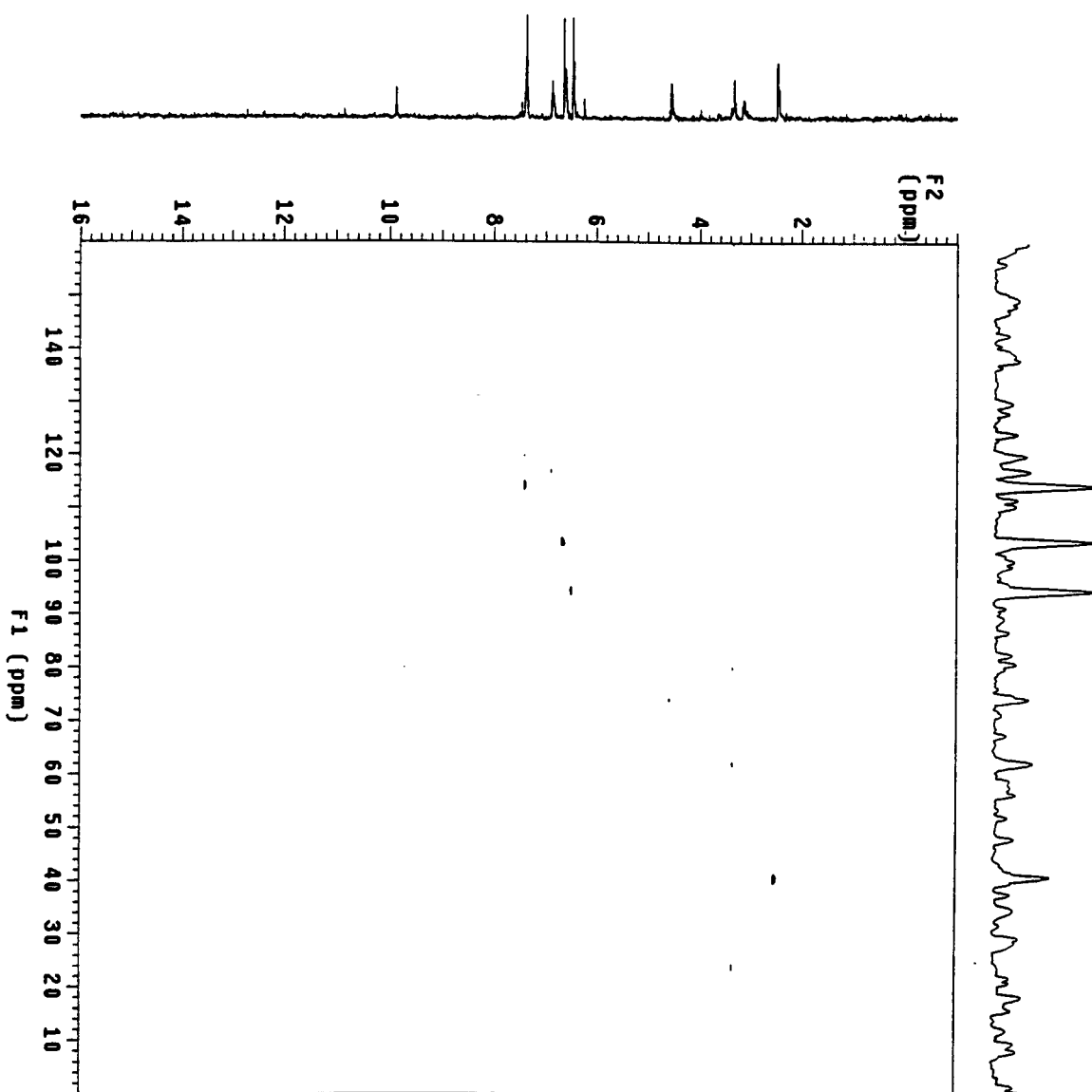


Fig. 41 - Espectro gHMOC de 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona (Bg₃)

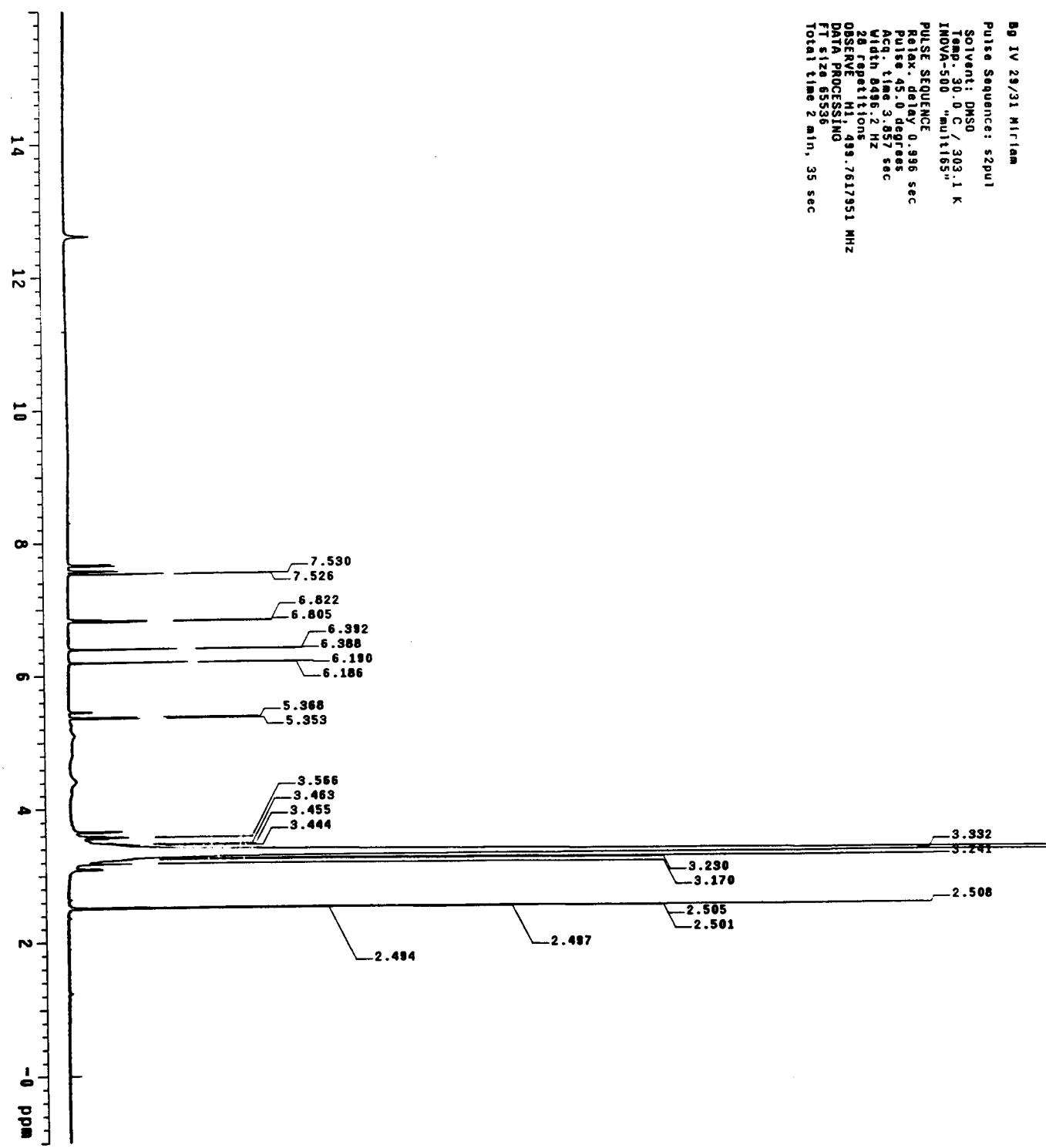
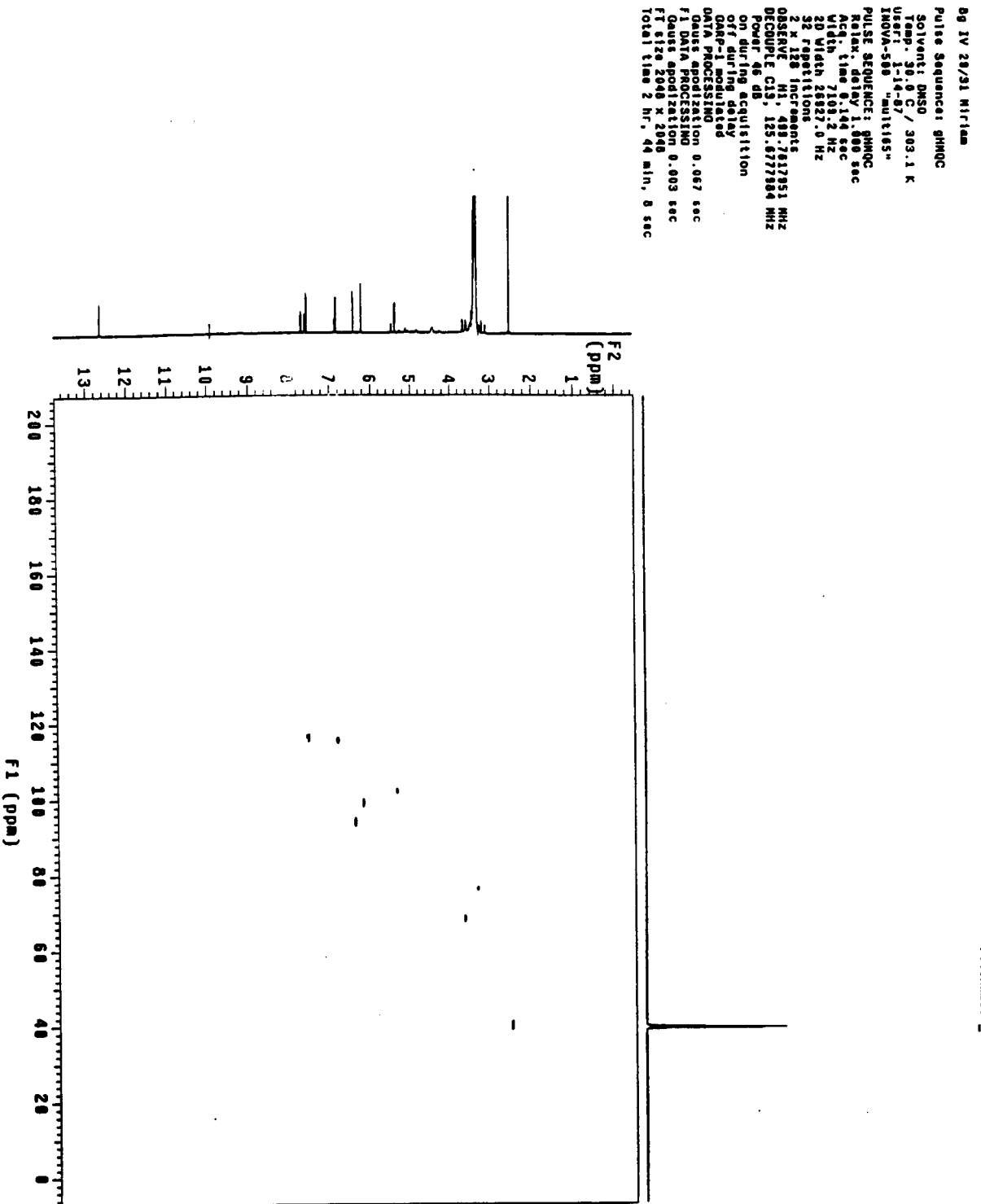


Figura. 42 – RMN ¹H de 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol (Bg4)



Filename: -

Figura 43 - Espectro de gHMBC de 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol (Bg₄)

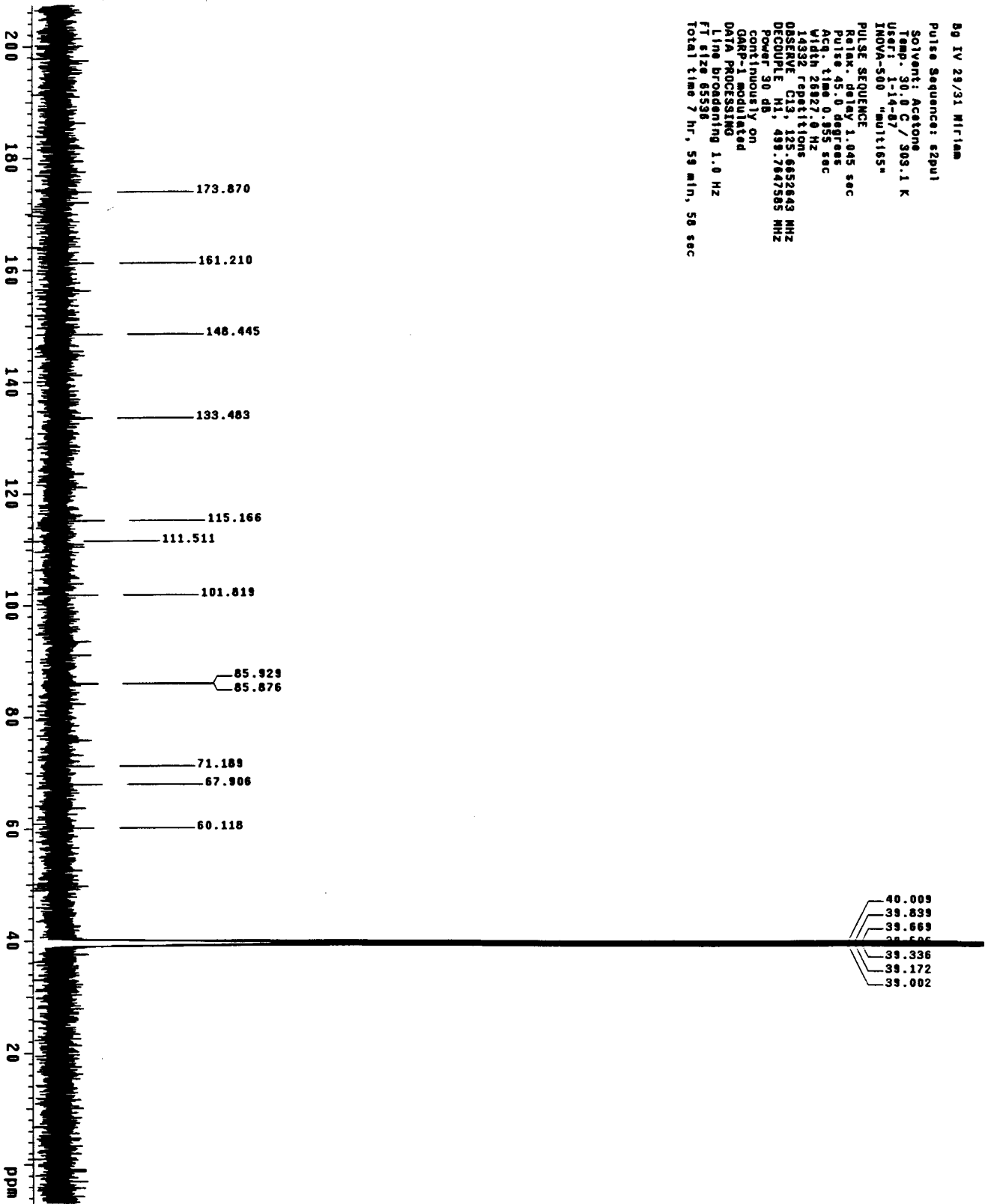


Figura 44 – RMN ¹³C de 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol (Bg₄)

Os dois compostos isolados das folhas de *B. gaudichaudii* 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona (iso-orientina) e 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol são flavonóides glicosilados.

Flavonóides conjugados constituem um grupo muito diverso de metabólitos vegetais. A maioria deles está presente como glicosídeos em células de plantas. A substituição do açúcar no esqueleto flavonoídico pode ocorrer através do grupo hidroxila terminal no caso de O-glicosídeos (Bg₄) ou diretamente ao átomo de carbono no anel A em C-glicosídeos (Bg₃) (Stobiecki, 2000).

Os flavonóides glicosilados e as agliconas livres estão envolvidos em interações de plantas com microrganismos, tanto patogênicos quanto simbióticos. Eles também agem como protetores de UV em células vegetais, fontes de pigmentos para compostos que colorem as flores, tendo ainda importante papel na interação planta-insetos. Estes metabólitos de plantas também afetam a saúde humana e vegetal por causa de sua importância na dieta, que é atribuída à suas propriedades antioxidantes, ação estrogênica e ao amplo espectro de atividades antimicrobianas e farmacológicas (Stobiecki, 2000).

Afifi *et al* (1997) relataram que a iso-orientina em conjunto com a vitexina exerce atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Foi demonstrado ainda que a iso-orientina, o 6-C-glicosídeo da luteolina, tem atividade miolítica em preparações contendo músculo liso de ratos e de cobaia (Afifi *et al*, 1999).

Devido à importância dos flavonóides e seus glicosídeos para os organismos vivos, a identificação e/ou determinação estrutural destes compostos, que ocorrem em tecidos vegetais e sistemas biológicos tem um importante papel

em muitas áreas da ciência, particularmente na ciência de plantas. (Stobiecki, 2000).

Os flavonóides proporcionam um papel de proteção através da absorção de radiação UV nas camadas epidermicas. Além disso a luz UV também pode induzir um aumento seletivo da concentração daqueles flavonóides que possuem um grupo hidroxila adicional no anel B, ou seja, um sistema catecólico. Acredita-se que substâncias contendo esse sistema atuam como antioxidantes, minimizando uma série de efeitos deletérios sobre os organismos vivos.

Estudos *in vitro* mostraram que os flavonóides são bons eliminadores de radicais hidroxila (OH), anion superóxido (O⁻) e outras espécies reativas de oxigênio, como H₂O₂. Flavonóides com um grupo hidroxila orto no anel do esqueleto flavonoídico tem uma atividade antioxidante potencialmente superior daqueles sem o grupo em orto. A quercetina tem se mostrado melhor captora de superóxidos que o kaempferol *in vitro*, devido a presença de um grupamento hidroxila adicional da quercetina na posição 3' do anel B (Olsson *et al*, 1998).

Existem quatro teorias sobre o aparecimento do vitiligo: auto-imune, neurogênica, auto-destrutiva e composta. Dentre essas, a teoria auto-destrutiva sugere que durante a síntese de melanina ocorra a liberação de substâncias tóxicas que, quando não são inibidas, levam à destruição dos melanócitos, resultando em vitiligo. Ou seja, existe um mecanismo de controle o qual, falhando, resulta no acúmulo de substâncias tóxicas. Acredita-se que essas substâncias químicas tóxicas são radicais reativos, principalmente os radicais superóxidos. Esses radicais superóxidos, se não antagonizados, resultarão na formação de radicais hidroxilados os quais causarão sérios prejuízos para as células (Fundação Nacional do Vitiligo, 2000).

Os flavonóides presentes nas folhas de *B. gaudichaudii* possuem esqueleto semelhante àqueles citados por Olsson *et al* (1998) como sendo bons eliminadores desses radicais superóxidos, os principais desencadeadores de reações deletérias às células levando ao aparecimento de várias doenças dentre elas o vitiligo.

Assim, a continuação das pesquisas com *B. gaudichaudii* no tratamento dessa doença é sem dúvida necessária. Não somente pela ação fotossensibilizante das furanocumarinas presentes em várias partes do vegetal, mas também pelos flavonóides encontrados nas folhas.

4.5- Ensaios Biológicos

4.5.1- Ensaios de Citotoxicidade

Conforme relatamos na introdução desse trabalho, muitas plantas estão sendo usadas indiscriminadamente pela população, sem uma prévia avaliação quanto à sua atividade citotóxica e mutagênica. Adicionado ao fato de que a legislação exige estudos quanto à toxicidade dos medicamentos fitoterápicos, esta parte do trabalho consistiu na execução de ensaios de citotoxicidade e mutagenicidade em extratos e frações do vegetal *B. gaudichaudii* e do medicamento “V”.

A tabela 14 apresenta os IC₅₀ para os extratos testados, através do teste do MTT-tetrazólio para a determinação da toxicidade. O valor de IC₅₀ da solução P/B foi 0,11 mg/mL. O extrato aquoso do vegetal apresentou IC₅₀ de 4,65 mg/mL e o do medicamento “V” ficou em 7,23 mg/mL. Para os extratos metanólicos os IC₅₀ foram 1,31 mg/mL para o vegetal e 1,75 mg/mL para o medicamento “V”.

Tabela 14- Índices citotóxicos (IC₅₀) obtidos através da técnica de MTT-tetrazólio (MTT) para extratos do vegetal *Brosimum gaudichaudii* e do medicamento “V”.

Amostra	IC50 (mg/mL)
Extrato aquoso do córtex da raiz do vegetal	4,65
Extrato aquoso do medicamento “V”	7,23
Extrato metanólico do córtex da raiz do vegetal	1,31
Extrato metanólico do medicamento “V”	1,75
Psoraleno/Bergapteno	0,11

Ensaio de citotoxicidade para avaliar dentre os extratos utilizados quais eram os mais citotóxicos foram realizados pelo método do MTT-tetrazólio. Os resultados obtidos com os extratos aquosos indicam que o extrato aquoso do medicamento é menos citotóxico do que o do vegetal, visto que quanto menor for o IC₅₀ maior é a citotoxicidade.

Dentre os extratos metanólicos pudemos observar que tanto o vegetal quanto o medicamento apresentam citotoxicidade, ou seja, esses extratos possuem IC₅₀ inferiores aos dos aquosos..

Os índices citotóxicos são ainda menores no caso das furanocumarinas puras, para as quais os valores são cerca de 10 vezes inferiores aos dos extratos metanólicos que são os que contém maiores concentrações das furanocumarinas.

4.5.2- Ensaio de Mutagenicidade

Os dados de atividade mutagênica obtidos nos ensaios de *Salmonella*/microssomos para os extratos do vegetal *B. gaudichaudii* estão apresentados na tabela 15. A tabela mostra que houve indução da mutagenicidade para os extratos aquosos na presença de S9 e sinais de mutagenicidade na ausência de S9 para as linhagens TA102 e sinais de mutagenicidade para TA100 na presença de S9. O extrato metanólico induziu mutagenicidade na TA102 (+S9 e -S9) e para TA 100 na ausência de S9 e sinais de mutagenicidade na presença de S9.

A tabela 15 também mostra que o extrato metanólico do vegetal na concentração de 13,5 mg/placa apresentou sinais de toxicidade para TA100 e TA97a. Concentrações acima de 20,25 mg/placa foram tóxicas para todas as linhagens pois a frequência de revertentes foi abaixo da frequência espontânea normal. Não foi observada mutagenicidade em nenhuma linhagem quando a fração n-butanólica do vegetal foi avaliada na ausência e presença de S9.

A tabela 17 mostra que não houve indução de mutagenicidade em nenhuma linhagem de *S. typhimurium* testadas para os extratos do medicamento "V" na presença e ausência de S9.

A partir dos resultados obtidos, foi calculado a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose analisada, que é a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos ou induzidos) dividida pela média do número de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos). A amostra foi considerada positiva quando a RM foi maior ou igual a 2 em pelo menos uma das doses testadas e houve uma relação dose-resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. Quando apenas um dos critérios foi

atingido, a amostra foi considerada como tendo indícios de mutagenicidade (Valent *et al*, 1993; Vargas *et al*, 1993).

Os maiores valores de razão de mutagenicidade (RM) foram observados para os extratos metanólico e aquoso na presença de metabolização em TA102, que detecta mutágenos oxidativos (Tabela 16).

Na tabela 18 podemos observar os valores de RM para os extratos do medicamento "V".

Tabela 15- Atividade mutagênica de extratos aquosos e metanólicos e da fração n-butanólica de córtex da raiz de *Brosimum gaudichaudii* em linhagens de *Salmonella typhimurium*.

	Dose mg/placa	Revertentes his+/placa (M ± SD)							
		TA102		TA100		TA98		TA97a	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Extrato aquoso	3.37	255±62	521±97	188±21	227±38	30±07	55±08	159±28	-
	6.75	369±53	540±35**	178±33	213±08*	34±06	61±04	151±30	228±22
	10.12	313±33	644±20**	-	215±07*	-	61±01	-	-
	13.50	388±46*	728±102**	196±13	273±63	39±06	66±17	156±35	292±26
	20.25	407±14**	1020±100**	191±05	331±66*	39±09	54±21	165±41	283±61
	27.00	336±56	965±378	199±27	298±57*	45±10	41±04	155±33	210±62
Extrato Metanólico	3.37	601±214	1073±90**	430±47**	281±98	49±24	58±16	154±14	167±62
	6.75	418±75	1353±81**	417±95*	283±13**	50±36	40±08	187±74	133±30
	10.12	930±339*	718±275	341±54*	269±15*	47±23	50±32	17±16	49±27
	13.50	506±158	840±180*	64±33	105±11	47±33	36±08	-	10±02
	20.25	-	-	25±24	-	2±02	-	-	-
Fração n-butanólica	3.37	249±40	300±22	175±13	148±03	27±05	69±03	185±07	191±14
	6.75	277±13	314±41	196±05	130±14	29±04	54±08	179±24	194±14
	10.12	287±32	343±19	176±07	166±24	29±04	-	176±20	198±16
	13.50	315±33	353±42	192±09	154±16	23±03	54±05	171±15	183±20
	20.25	228±28	330±25	149±15	172±16	19±02	52±07	180±14	217±38
Controle	Negativo	276±21	321±22	179±24	173±06	36±08	41±05	157±14	169±28
Controle	Positivo	1321±104	1015±85	1117±255	1104±125	1328±182	333±39	1038±82	1187±110

Os valores representam a média±SD dos últimos 2 experimentos realizados em triplicatas.

Controle Negativo = 0.1 mL DMSO (solvente).

Control Positivo = 2-antramine (0.625µg/placa) →TA100 e TA98 (+S9); 2-aminofluoreno (10µg/placa)→TA102 e TA97a (+S9).

daunomicina (3µg/placa) →TA102(-S9); azida sodica (1.25µg/placa) →TA100 (-S9)

4-nitro-o-fenilenodiamina (5µg/placa) →TA98 e TA97a (-S9).

* $P < 0.05$ (ANOVA) ** $P < 0.01$ (ANOVA)

Tabela 16 - Razão de mutagenicidade para extratos e frações de córtex da raiz de *Brosimum gaudichaudii* em linhagens de *Salmonella typhimurium*

Tratamento mg/placa	Razão de Mutagenicidade (RM)							
	TA102		TA100		TA98		TA97A	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Extratos aquosos								
3.37	0.92	1.62	1.05	1.31	0.83	1.37	1.01	-
6.75	1.33	1.68	0.99	1.23	0.94	1.34	0.96	1.35
10.12	1.13	2.00	-	1.24	-	1.49	-	-
13.50	1.41	2.26	1.09	1.58	1.08	1.61	0.99	1.24
20.25	1.47	3.18	1.07	1.91	1.08	1.32	1.05	1.67
27.00	1.22	3.01	1.11	1.72	1.25	1.00	0.92	1.24
Extratos metanólicos								
3.37	2.18	3.34	2.40	1.62	1.36	1.41	0.98	0.99
6.75	1.51	4.21	2.33	1.64	1.39	0.98	1.19	0.79
10.12	3.37	2.24	1.91	1.55	1.31	1.22	0.11	0.29
13.50	1.83	2.62	0.36	0.61	1.31	0.88	-	0.06
20.25	-	-	0.14	-	0.05	-	-	-
Fração n-butanólica								
3,37	0.90	1.07	0.98	0.86	0.75	1.68	1.18	1.13
6,75	1.00	0.98	1.09	0.75	0.80	1.32	1.14	1.15
10.12	1.03	1.07	0.98	0.96	0.80	-	1.12	1.17
13,50	1.14	1.10	1.07	0.89	0.64	1.32	1.09	1.08
20.25	0.82	1.03	0.83	0.99	0.53	1.27	1.15	1.28

Razão de Mutagenicidade (RM): No. de HIS+ (colônias revertentes) induzidos na amostra/No. de HIS+ espontâneo no controle negativo. R \geq 2 em negrito

Tabela 18 - Razão de mutagenicidade para extratos e frações do medicamento "V" em linhagens de *Salmonella typhimurium*

Tratamento mg/placa	Razão de Mutagenicidade (RM)							
	TA102		TA100		TA98		TA97A	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Extratos aquosos								
3.37	1,08	1,40	0,67	1,02	0,93	1,03	0,95	1,10
6.75	1,03	1,39	0,79	1,06	1,04	0,95	0,88	1,13
10.12	0,92	1,47	0,79	1,13	1,06	1,03	0,93	1,22
13.50	0,80	1,34	0,79	1,11	1,09	1,05	0,17	1,09
Extratos metanólicos								
3.37	0,96	1,33	0,68	1,13	0,91	1,13	0,90	1,01
6.75	0,78	1,19	0,60	1,22	0,93	1,18	1,22	1,05
10.12	0,86	1,12	0,68	1,23	0,93	1,11	1,21	0,84
13.50	0,79	1,03	0,75	1,21	0,67	1,16	1,39	1,09
Fração n-butanólica								
3,37	1,10	1,41	0,88	1,20	0,93	0,71	1,14	1,30
6,75	1,05	1,34	0,81	1,18	0,78	1,00	1,32	1,31
10.12	-	1,36	-	1,21	-	0,82	-	1,29
13,50	1,05	1,30	1,05	1,30	0,71	0,76	1,12	1,31

Razão de Mutagenicidade (RM): No. de his+ (colônias revertentes) induzidos na amostra/No. de HIS+ espontâneo no controle negativo.

O extrato metanólico do córtex da raiz da planta induziu um aumento significativo no número de revertentes para a linhagem TA100 na ausência de S9 e sinais de mutagenicidade na presença de S9, e para TA102 na ausência e presença de S9. O extrato aquoso induziu somente um aumento significativo no número de revertentes em TA102 e sinais de mutagenicidade em TA100 na presença de S9. A fração n-butanólica não induziu mutagenicidade.

As análises cromatográficas mostraram que as furocumarinas psoraleno e bergapteno são os componentes majoritários no extrato metanólico do vegetal. Esses são agentes que se intercalam na molécula de DNA formando mono e diaductos, além de induzirem a produção de oxigênio simples e radicais superóxido que são mutágenos oxidativos claramente detectados pela linhagem TA102. Portanto, podem ter contribuído para a mutagenicidade observada. A menor frequência de mutações induzida pelo extrato aquoso da planta é provavelmente devido à menor quantidade de furocumarinas extraídas pela água.

As análises mostraram ainda que a fração n-butanólica do córtex da raiz de *B. gaudichaudii* contém apenas traços de furanocumarinas. Isso era esperado, visto que as furanocumarinas foram previamente removidas pela partição com clorofórmio. A ausência de mutagenicidade na fração n-butanólica reforça assim a hipótese que furanocumarinas são os componentes responsáveis pela mutagenicidade. De fato, a literatura reporta uma marcada mutagenicidade (Bianchi *et al*, 1996; Cebula & Koch, 1990) assim como citotoxicidade (Ivie, 1987) de furanocumarinas.

Embora as placas e frascos de cultura para as bactérias tenham sido incubadas no escuro, todos os experimentos foram realizados na presença de luz natural, um fato que pode ter permitido a fotoativação das furanocumarinas.

Pelos ensaios realizados foi possível verificar que os extratos do córtex da raiz do *B. gaudichaudii* apresentaram atividade mutagênica em culturas

de *S. typhimurium* testadas. Assim, cuidados devem ser tomados na utilização desta planta para o tratamento do vitiligo na medicina popular.

5- CONCLUSÃO

O perfil químico de *B. gaudichaudii* indica que a composição química do extratos metanólicos das diferentes partes do vegetal apresenta diferenças, de forma que a parte da planta que encerra as maiores concentrações das furanocumarinas é o córtex das raízes. Excetuando-se as folhas, que contém também os flavonóides 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-C-glucopiranosilflavona (iso-orientina) e 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-O-β-D-galactopiranosilflavonol, todas as outras partes do vegetal são constituídos basicamente pelas furanocumarinas.

O conjunto das técnicas CG/EM e CLAE/DAD permitiu uma avaliação quali e quantitativa confiável, pois foi possível a detecção de pequenas quantidades das furanocumarinas presentes na planta e no medicamento "V". Isso é importante, pois num controle de qualidade onde as substâncias alvo estejam presentes em pequenas quantidades torna-se necessário técnicas mais sensíveis.

No caso de *B. gaudichaudii* particularmente, um controle de qualidade se fará de forma fácil, visto que nas condições empregadas as furanocumarinas são os componentes majoritários dos extratos.

Segundo a resolução RDC-17 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, o medicamento "V" estudado nesse trabalho não se enquadraria como tal, visto que o mesmo recebe a adição de vitaminas, não sendo portanto exclusivamente de origem vegetal.

O referido medicamento cita em sua bula ser composto por "seiva bruta concentrada de *B. gaudichaudii*". Porém por meio das análises cromatográficas e espectrométricas verificou-se que o mesmo não é produzido com o látex (seiva de *B. gaudichaudii*), pois essa parte da planta não apresenta

em sua composição as furanocumarinas psoraleno e bergapteno. Além disso, a concentração de látex presente nessa espécie de *Brosimum* não parece ocorrer em quantidade suficiente para ser comercialmente explorado.

Desta forma, verificamos que a parte da planta cuja composição química mais se assemelha à dos comprimidos são os galhos, pois apresentam teores de psoraleno/bergapteno próximos.

A concentração das furanocumarinas nos extratos MeOH do medicamento fica em torno de 0,01% para o psoraleno e 0,03% para o bergapteno. Esses índices são baixos quando comparados aos valores necessários dessas substâncias no tratamento do vitiligo pelo método PUVA (psoralenos seguido de luz UVA).

Embora alguns estudiosos mostrem que o princípio ativo sozinho nem sempre é tão efetivo quanto o fitocomplexo, é preocupante o fato de que a população consuma esse medicamento e que talvez ele esteja sendo subdosado.

Por outro lado, o consumo de chás do córtex da raiz de *B. gaudichaudii* pela população no tratamento do vitiligo deve ser feito com muito rigor e cautela. As concentrações de psoraleno e bergapteno nessa parte da planta são de 2,8% e 3,2%, respectivamente. Estes valores são altos se considerarmos que essas substâncias podem ser fotoativadas pela luz UV gerando graves queimaduras na pele, e são ainda carcinogênicas e hepatotóxicas.

Nossos experimentos mostraram ainda a mutagenicidade dos extratos metanólicos e aquosos do vegetal. Embora os extratos do medicamento não tenham apresentado atividade mutagênica, isso pode ser decorrente da baixa concentração dessas substâncias no medicamento ou ainda por um efeito

protetor causado por vitaminas adicionadas ao mesmo. Assim, cuidados devem ser tomados quando do uso dessa planta no tratamento do vitiligo, pois tanto o extrato metanólico quanto o aquoso mostraram-se mutagênicos nas linhagens de bactérias testadas.

Embora os testes de citotoxicidade tenham sido realizados somente sobre um sistema bacteriano, verificamos que nos extratos testados a presença das furanocumarinas contribuem para o aumento dos índices de citotoxicidade.

As furanocumarinas certamente continuarão sendo utilizadas nos tratamentos terapêuticos de pele, mas novos estudos tornam-se necessários no sentido de que sejam minimizados os efeitos colaterais danosos dessas moléculas à saúde humana e animal.

6- Considerações finais e perspectivas futuras

O presente estudo permitiu fornecer informações a respeito da composição química do vegetal *Brosimum gaudichaudii* a partir de pequenas quantidades de material vegetal.

Os métodos de CG/EM e CLAE/DAD para as análises das furanocumarinas dos extratos vegetais, assim como para os extratos do medicamento "V" proporcionaram boa resolução.

Os perfis cromatográficos dos materiais mostraram que o estabelecimento de um controle de qualidade dessa planta ou de fitoterápicos produzidos a partir dela será relativamente fácil, visto que os extratos não necessitam de etapas de clean-up.

As informações contidas nesse trabalho poderão servir de subsídio no controle de qualidade de plantas onde as furanocumarinas poderiam ser utilizadas como marcadores químicos.

O estudo dos flavonóides presentes nas folhas e a utilização dos mesmos quer no tratamento do vitiligo quer em outra enfermidade torna a continuação desse estudo viável.

7- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AFIFI, F. U.; KHALIL, E.; ABDALLA, S. Effect of isoorientin isolated from *Arum palaestinum* on uterine smooth muscle of rats and guinea pigs. **J. Ethnopharm.**, v.65, p.173-177, 1999.

AFIFI, F. U.; SHERVINGTON, A.; DARWISH, R. Phytochemical and biological evaluation of *Arum palaestinum*. Part I: Flavone C-glycosides. **Acta Techn. Leg. Med.**, v.8, n.2, p.105-110, 1997.

AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. New York: Elsevier Science, 1989. 564p.

AL-QATTAN, M. M. Pediatric burns induced by psoralens in Saudi Arabia. **Burns**, v.26, p.653-655, 2000.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DO VITILIGO. Vitiligo não é contagioso e tem cura. Disponível em: <<http://www.vitiligo.com.br>>. Acesso em: 05 abr. 2000.

AZAMBUJA, R. Tratamento de vitiligo. **Bras. Méd.**, v.18, n.3-4, p.69-73, 1981.

BACCHI, E. M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: DI STASI, L.C.(Org). **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Unesp, 1996. cap.12, p.169-186.

BACON, J. A.; LINSEMAN, D. A.; RACZNIAK, T. J. In vitro cytotoxicity of tetracyclines and aminoglycosides in LLC-PK, MSCK and Chang continuous cell lines. **Toxic. in vitro**, v.4, n.4-5, p.384-388, 1990.

BALLS, M.; CLOTHIER, R. Citotoxicity assays for intrinsic toxicity na irritancy. In: WATSON R. R. (Ed). **In vitro Meth. Toxic.** Boca Raton: CRC Press, 1992. p.37-52.

BARILE, F. A. **Introduction to in vivo cytotoxicology:** mechanisms and methods. Boca Raton: CRC Press, 1994. 222p.

BEIER, R. C. Natural pesticides and bioactive components in foods. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v.113, p.47, 1990.

BEIER, R. C.; IVIE, G. W.; OERTLI, E. H. Linear furanocoumarins and graveolone from the common herb parsley. **Phytochemistry**, v.36, p.869, 1994.

BEIER, R. C.; NIGG, H. N. Toxicity of natural occurring chemicals in food, In: HUI, Y. H.; RICHARD GORHAM, J.; MURREL, K. K.; CLIVER, D. O. (Eds). **Foodborne Disease Handbook.** New York: Marcel Decker, 1994. v.3.

BERGENDORFF, O. et al. Furanocoumarins with affinity to brain benzodiazepine receptors *in vitro*. **Phytochemistry**, v.44, n.6, p.1121-1124, 1997.

BERRIDGE, M. V. et al. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tretrazolium salts. **Biochemica**, v.4. p.15-19, 1996.

BIANCHI, L. et al. Effects of β -carotene and α -tocoferol on photogenotoxicity induced by 8-methoxypsoralen: the role of oxigen. **Mutat. Res.**, v.369, p.183-194, 1996.

BICCHI, C. et al. Chemical diversity of the contents from the secretory structures of *Heracleum sphondylium* subsp. *sphondylum*. **Phytochemistry**, v.29, n.6, p.1883-1887, 1990.

BORGES, M. F. M.; ROLEIRA, F. M. F.; PINTO, M. M. M. Simultaneous isocratic HPLC separation of the diastereoisomers of caffeic, ferulic, and isoferulic acids and related coumarins. **J. Liq. Chromat.**, v.16,n. 1, p.149-160, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária. Resolução RDC-17 de 24/02/2000. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso: em 10 mai. 2001.

BRAZ FILHO, R.; MAGALHÃES A. F.; GOTTLIEB, O. R. A química de moráceas brasileiras - II*. Brosiprenina e outras cumarinas do *Brosimum rubescens*. **An. Acad. Bras. Cien.**, v.43, n.3-4, p.585-586, 1971.

BROWN, S. A.; EL-DAKHAKHNY, M. Biosynthesis of linear furanocoumarins. **Can. J. Biochem.**, v.48, p.863-871, 1970.

BUDAVARI, S. et al. **The Index Merck**. 20. ed. New Jersey: Merck Research Laboratories, 1996. p.1114-1120.

CABELLO-HURTADO, F. et al. Coumarins in *Helianthus tuberosus*: Characterization, induced accumulation and biosynthesis. **Phytochemistry**, v.49, n.4, p.1029-1036, 1998.

CAFFIERI, S. et al. Photosensitizing furanocoumarins: photocycloaddition to unsaturated fatty acids. **Proc. Int. Congress "Psoralens 1988"**, v.87, p.137-145, 1989.

CARAUTA, J. P. P. Moráceas do estado do Rio de Janeiro. **Albertoa**, v.4, n.13, p.196, 1996.

CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; HONDA, N. K. Quantitative determination of indole alkaloids, triterpenoids and steroids of *Tabernaemontana hilariana*. **J. Chromat. A**, v.808, p.264-268, 1998.

CARDOSO, C. A. L. **Análise cromatográfica de plantas e produtos fitoterápicos**. 2000, 146f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

CEBULA, T. A.; KOCH, W. H. Analysis of spontaneous and psoralen-induced *Salmonella typhimurium* his G46 revertants by oligodeoxyribonucleotide colony hybridization: use of psoralens to cross-link probes to target sequences. **Mutat. Res.**, v.229, p.79-87, 1990.

CHANDLER, R. et al. Examination of psoralens-induced photodermatitis in wistar rats under scanning electron microscopy. **J. Nat. Toxins**, v.8, n.2, p.167-177, 1999.

CHOUCHI, D.; BARTH, D. Rapid Identification of Some Coumarin Derivatives in Deterpenated Citrus Peel Oil by Gas Chromatography. **J. Chromat. A**, v.672, p.177-183, 1994.

DA SILVA, B.; BERBARDO, R. R.; PARENTE, J. P. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. **Phytochemistry**, v.53, p.87-92, 2000.

DEVIIENNE, K. F. **Avaliação da atividade biológica *in vitro* de isocumarinas naturais e semi-sintéticas obtidas de *Paepalanthus bromelioides***. 2000, 126f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

DIAWARA, M. M. et al. Implications on the distribution of linear furanocoumarins within celery. **J. Agric. Food Chem.**, v.43, n.3, p.723-727, 1995.

DIAWARA, M. M.; TRUMBLE, J. T. Linear Furanocoumarins. In: D'MELLO, J. P. F. (Ed). **Handbook of Plant and Fungal Toxicants**. New York: CRC Press, 1997. cap.12, p.175-89.

Di STASI, L. C. (Org). **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. 230p.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3.ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 486p.

GARCIA, E. S. et al. *Fitoterápicos*. Campinas: André Tosello, 1996. 17p.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p.3864-3874, 1991.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The Flavonoids**. London: Chapman & Hall, 1975.

HARBORNE, J. B. (Ed). **The flavonoids, advances in research since 1986**. London: Chapman & Hall, 1993. 676p.

HARMALA, P. et al. Optimization of the high-performance liquid chromatography of coumarins in *Angelica archangelica* with reference to molecular structure. **J. Chromat.**, v.507, p.367-380, 1990.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J. L.; RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. **Planta Med.**, v.63, p.2-10, 1997.

HOUGHTON, P. J. Old yet new: pharmaceuticals from plants. **J. Chem. Educ.**, v.78, n.2, p.175-184, 2001.

IVIE, G. W. The chemistry of plant furanocoumarins and their medical, toxicological, environmental and coevolutionary significance. **Rev. Latinoam. Quím.**, v.18, p.1-6, 1987.

KATA, M.; JOZSA, P.; AIGNER, Z. In vitro study of emulsions containing methoxsalen. **Acta Pharmacol. Hung**, v.70, n.2, p.35-40, 2000.

KATEMAN, G.; BUYDENS, L. **Quality control in analytical chemistry**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1993. 291p.

KRÓLICKA, A. et al. Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. **Plant Science**, v.160, p.259-264, 2001.

KUSTER, R. M. et al. Furanocoumarins from the rhizomes of *Dorstenia brasiliensis*. **Phytochemistry**, v.36, p.221-223, 1994.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 3. ed. Campinas: Átomo, 1998. 224p.

LIN, Z. et al. A stimulation of mouse melanocyte proliferation by *Piper nigrum* fruit extract and its main alkaloid, piperine. **Planta Med.**, v.65, n.7, p.600-603, 1999.

LU, K. L. et al. Analysis of flavonoids and coumarins in *Irexia laevigata* var. Oldhami by HPLC. **J. Liq. Chromat. Rel. Techn.**, v.23, n.16, p.2573-2583, 2000.

MABRY, T.J.; MARKLAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer Verlag, 1970. 354p.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytomedicine**, v.2, p.117-189, 1995.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat. Res.**, v. 113, p.173-215, 1983.

MARTINS, M. V. *Brosimum gaudichaudii* Tréc., a Brazilian medicinal plant. **Newsletter- G-15 Gene Bank for Medicinal Plants**, v.7-8, p.9, 1995.

MAURICE, P.D. ; CREAM. J.J. Dangers of herbalism. **Br. Med. J.**, v.299, p.1204, 1989.

McKEON, J.J. PUVA for psoriasis. **Amer. Pharm.**, NS21, v.9, p.530-532, 1981.

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

MURRAY, R. D. H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, S.A. **The natural coumarins, occurrence, chemistry and biochemistry**. Wiley: Chichester, 1982.

MURRAY, R. D. H. Coumarins. **Nat. Prod. Rep.**, v.6, p.477-505, 1995.

NATARAJAN, A. T.; OBE, G. Molecular mechanism involved in the production of Chromosomal aberrations. III-Restriction endonucleases. **Chromossoma**, v.90, p.120-127, 1984.

NYKOLOV, N.; IOSSIFOVA, T.; VASSILEVA, E.; KOSTOVA, I.; STOEV, G. **Phytochem. Anal.**, v.4, p.86, 1993.

OLSSON, L. C. et al. Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. **Phytochemistry**, v.49, n.4, p.1021-1028, 1998.

ORIEL, J. D.; RIDGWAY. **Genital infection by *Chlamydia trachomatis***. London: Edward Arnold, 1982. 144p.

ORTEGA, G. G. et al. Brasilianische phytoterapeutika, Ihre rolle im arzneimittelmarkt. **Dtsch. Apoth. Ztg.**, v.35, p.1847-1848, 1989.

PATHAK, M. A. et al. Melanogenic Potential of Various Furanocoumarins in normal and vitiginous skin. **Proc. Int. Congress "Psoralens 1988"**, v. 87, p.101, 1989.

PORTER, J.; BEUF, A. **A handbook for patients with vitiligo**. Disponível em: <<http://www.nvfi.org/handbook.htm>> Acesso em: 05 abr. 2000.

POZETTI, G. L. Estudo químico de *Dorstenia bryonifolia*. Mart. Ex Miq. (Moraceae). **Ecl. Quím.**, v.13, p.41-51, 1988.

QUIRKE, J. M. E. ; HSU, Y.; VAN BERKEL, G.J. Ferrocene-based electroactive derivatizing reagents for the rapid selective screening of alcohols and phenols in natural products mixtures using electrospray-tandem mass spectrometry. **J. Nat. Prod.**, v.63, p.230-237, 2000.

RAMAN, A. et al. Investigation of the effect of *Angelica sinensis* root extract on the proliferation of melanocytes in culture. **J. Ethnopharm.**, v.54, p.165-170, 1996.

REVISTA ÉPOCA. Fitoterapia: a saúde brota das plantas, p.86-92, abr.2001.

RIDDEL, R.J.; CLOTHIER, R.H.; BALLS, M. An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays. **Food Chem. Toxic.**, v.24, p.469-471, 1986.

RYCROFT, D. S.; COLE, W. J.; ASLAM, N. 3,4-dihydroxy-3'-methoxybibenzyl from the liverwort *Plagiochila exigua* from Scotland. **Phytochemistry**, v.49, n.1, p.145-148, 1998.

SCHLATTER, J. et al. Dietary intake and risk assesment of phototoxic furocoumarins in humans. **Food Chem. Toxic.**, v.29, p.523, 1991.

SCHULZ, H.; ALBROSCHKEIT, G.; NOWAK, D. **Lebensm.-Unters. Forsch**, v.195, p.254, 1992.

SHARIFI, S. et al. Determination of coumarin, 7-hidroxicoumarin, 7-hidroxicoumarin glucoronide, and 3-hidroxicoumarin by high performance liquid chromatography. **J. Liq. Chromat.**, v.16, n.6, p.1263-1278, 1993.

SHIROTA, O. et al. Two chalcone-prenylcoumarin diels-alder adducts from *Brosimum rubescens*. **Phytochemistry**, v.47, n.7, 1381-1385, 1998.

SIMÕES, C. M. O. et al (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2.ed. Florianópolis: UFSC, 2000. cap.21, p.451-469.

STECK, W.; MAZUREK, M. Identification of natural coumarins by NMR spectroscopy. **Lloydia**, v.35, n.4, p.418-439, 1972.

STEINER, D. Vitiligo. **Cosmet. Toiletries**, v.10, p.33, mar./abr. 1998.

STOBIECKI, M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. **Phytochemistry**, v.54, p.237-267, 2000.

STREGE, M. A. High-performance liquid chromatographic-eletrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. **J. Chromat. B**, v.725, p.67-78, 1999.

TORRES, S. L. et al. Two flavans from *Brosimum acutifolium*. **Phytochemistry**, v.44, n.2, p.347-349, 1997.

TORRES, S. L. et al. Flavonoids from *Brosimum acutifolium*. **Phytochemistry**, v.53, p.1047-1050, 2000.

VALENCIENNES, E.; SMADJA, J.; CONAN, J. Y. Screening for biological activity and chemical composition of *Euodia borbonica* var. *borbonica* (Rutaceae), a medicinal plant in Reunion Island. **J. Ethnopharm.**, v.64, p.283-288, 1999.

VIEIRA, I. J. C. et al. A new coumarins from *Brosimum gaudichaudii* Trecul. **Nat. Prod. Lett.**, v.13, n.1, p.47-52, 1999.

VILEGAS, W.; POZETTI, G.L. Coumarins from *Brosimum gaudichaudii*. **J. Nat. Prod.**, v. 56, n.3, p.416-417. 1993.

VILEGAS, W.; VILEGAS, J.H.Y.; POZETTI, G.L. Furanocoumarins from Brazilian *Dorstenia* ssp. **Rev. Latinoam. Quim.**, v.23, p.78-80, 1994.

VISTICA, D.T. et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Res.**, v.51, n.5, p.2515-2520, 1991.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E.M. **Plant Drug Analysis**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p.163-193.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnopharm.**, v.51, p.239-254, 1996.

WILSON, A. P. Citotoxicity and viability assays. In: FRESHNEY, R. I. **Animal cell culture: a practical approach**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1992. cap.8, p.263-303.