



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FAMÁCIA**

CAIO FERNANDES MONTEIRO LEITE

Estudo de [REDACTED] ocorrente no Distrito Federal.

BRASÍLIA, DF

2013

CAIO FERNANDES MONTEIRO LEITE

Estudo de [REDACTED] ocorrente no Distrito Federal.

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento

BRASÍLIA, DF

2013

CAIO FERNANDES MONTEIRO LEITE

Estudo de [REDACTED] ocorrente no Distrito Federal.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento
(FCE/ Universidade de Brasília)

Professora. Dra. Damaris Silveira
(Universidade de Brasília)

Professora. Dra. Yris Maria Fonseca
(Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2013

SUMÁRIO

Conteúdo

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FLUXOGRAMAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS.....	22
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
2.1. MÉTODOS GERAIS:	25
2.1.1. – Cromatografia em coluna delgada (CCD):.....	25
2.1.2. –Cromatografia em coluna (CC) (BARROS, 2008):	25
2.1.2.1. - Sílica gel Merck 60 A:	25
2.1.3. – Análise Espectrométrica (BARROS, 2008):	25
2.1.3.1. – Ressonância Magnética Nuclear (RMN):	25
2.1.4. Ensaios Biológicos	26
2.1.4.1. – Atividade Citotóxica.....	26
2.1.4.1.1. – Teste de Toxicidade às Larvas de <i>Artemia salina</i> (MEYER et al., 1982):	26
2.1.4.1.2. - Germinação e Crescimento (BORGHETTI; FERREIRA, 2004).....	26
2.1.4.2. Avaliação do potencial antioxidante pelo Modelo de Redução do Complexo de Fosfomolibdênio.	28
2.2. – PARTE EXPERIMENTAL	33
2.2.1. Descrição botânica:	33
2.2.2. Obtenção do material botânico:.....	33
2.2.3. Obtenção dos extratos brutos:	34
2.2.3.1. - Extrato hexânico bruto (EHB):	34
2.2.3.2. - Extrato etanólico bruto (EEB):	34
2.2.3.3. – Fração Aquosa do Extrato Etanólico (FAEE):	35
2.2.3.4. – Extrato Aquoso Bruto (EAB):	36
2.2.4. – Isolamento e Identificação de constituintes químicos das folhas de [REDACTED]	37
2.2.4.1. – Fitoquímica do extrato hexânico(EHB).....	37

2.2.4.2. – Fitoquímica do Extrato etanólico bruto (EEB):	37
2.3. Avaliação do perfil cromatográfico por CLAE e determinação de rutina no extrato aquoso de [REDACTED]	39
2.3.1. Validação da metodologia	40
2.3.1.1. Seletividade	40
2.3.1.2. Linearidade	41
2.3.1.3. Precisão	41
2.3.1.4. Limite de Detecção (LD)	41
2.3.1.5. Limite de Quantificação (LQ)	42
2.3.1.6. Exatidão	42
2.3.1.7. Robustez	43
2.4. Análise estatística dos resultados	44
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS –	45
Estudo Químico e Biológico.	45
3.1. Identificação de Substâncias Presentes do Extrato Hexânico das folhas de [REDACTED]	46
3.1.1. Lupeol:	46
3.2. Ensaios Biológicos do Extrato Hexânico das folhas de [REDACTED]	46
3.2.1. Atividade Citotóxica:	46
3.2.1.1. Avaliação da Atividade Alelopática:	46
3.2.1.2. Teste de toxicidade às larvas de <i>Artemia salina</i> :	46
3.3. Identificação de Substâncias Presentes no Extrato Etanólico das folhas de [REDACTED]	46
3.3.1. Purificação da Isoquercetrina:	46
3.3.2. Identificação Isoquercetrina:	47
3.4. Ensaios Biológicos do Extrato Etanólico das folhas de [REDACTED]	50
3.4.1. Atividade Citotóxica:	50
3.4.1.1. Avaliação da Atividade alopática:	50
3.4.1.2. Teste de toxicidade às larvas de <i>Artemia salina</i> :	50
3.4.2. Atividade antioxidante:	50
3.5. Ensaios Biológicos da Fração Aquosa do Extrato Etanólico das folhas de [REDACTED]	50
3.5.1. Atividade Citotóxica:	50
3.5.1.1. Avaliação da Atividade alopática:	50
3.5.1.2. Teste de toxicidade às larvas de <i>Artemia salina</i> :	52

3.5.2. Atividade antioxidante:.....	52
3.6. Ensaios Biológicos do Extrato Aquoso Bruto das folhas de [REDACTED] [REDACTED].....	52
3.6.1. Atividade Citotóxica:.....	52
3.6.1.1. Avaliação da Atividade alopática:.....	52
3.6.1.2. Teste de toxicidade às larvas de <i>Artemia salina</i> :	53
3.6.2. Atividade antioxidante:.....	53
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO –	54
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE PARA DETERMINAÇÃO DE RUTINA NO EXTRATO AQUOSO DE [REDACTED] [REDACTED]	54
4.1. Perfil Cromatográfico:	55
4.2. Seletividade	55
4.3. Linearidade.....	57
4.4. Precisão.....	58
4.5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	58
4.6. Exatidão	59
4.7. Robustez.....	59
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura da Rutina.

FIGURA 2. Atividade redutora da quercetina no método do fosfomolibdênio. Curva padrão construída com as absorbâncias obtidas com concentrações crescentes da quercetina.

FIGURA 3. Atividade redutora do ácido ascórbico no método do fosfomolibdênio. Curva padrão construída com as absorbâncias obtidas com concentrações crescentes do ácido ascórbico.

FIGURA 4. Atividade redutora do BHT no método do fosfomolibdênio. Curva padrão construída com as absorbâncias obtidas com concentrações crescentes do BHT.

FIGURA 5. Planta adulta de [REDACTED]

FIGURA 6. Estrutura da Isoquercetrina.

FIGURA 7. Perfil cromatográfico de [REDACTED] por CLAE.

FIGURA 8: Curva de regressão linear obtida para rutina frente ao método proposto, com os dados disponíveis na tabela 15.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Leitura de absorvâncias da quercetina para a construção da curva padrão.

TABELA 2: Leitura de absorvâncias do ácido ascórbico para a construção da curva padrão

TABELA 3: Leitura de absorvâncias do BHT para a construção da curva padrão.

TABELA 4: Rendimentos dos extratos brutos de [REDACTED]

TABELA 5: Rendimentos das frações derivadas do extrato etanólico.

TABELA 6: Resultados das frações obtidas da cromatografia em coluna de sílica gel (CC).

TABELA 7: Gradiente de eluição na análise por CLAE.

TABELA 8: Concentração teórica para análise da exatidão de [REDACTED]

TABELA 9: Variações do método para determinação da robustez.

TABELA 10: Comparação dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra [REDACTED] E 02 com espectros de flavonóis já descritos na literatura.

TABELA 11: Efeito alelopático do extrato de folhas de [REDACTED] no crescimento radicular (comprimento mm) de sementes de *Lactuca sativa*.

TABELA 12: Efeito alelopático do extrato de folhas de [REDACTED] no crescimento (comprimento mm) das partes aéreas (epicótilo) de sementes de *Lactuca sativa*.

TABELA 13: Germinabilidade (G) e respectiva taxa de inibição da germinabilidade (TIG) de sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato aquoso as fração etanólica de folhas de [REDACTED] com resposta dose-dependente ao final de 5 dias.

TABELA 14: Degradação forçada de [REDACTED] por hidrólise ácida (HCl 1N) e básica (NaOH 1N).

TABELA 15: Linearidade de rotina na análise do método por CLAE.

TABELA 16: Precisão do método para quantificação de rotina em [REDACTED]
[REDACTED]

TABELA 17: Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) do método proposto.

TABELA 18: Exatidão do método por CLAE.

TABELA 19: Resultados da variação de comprimento de onda no ensaio de robustez.

TABELA 20: Resultados da variação de temperatura no ensaio de robustez.

TABELA 21: Resultados da variação de fluxo no ensaio de robustez.

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 1: Esquema da partição do extrato etanólico

FLUXOGRAMA 2: Obtenção do extrato aquoso bruto liofilizado de [REDACTED]
[REDACTED]

FLUXOGRAMA 3: Esquema de purificação amostra 283.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHT – Butilhidroxitolueno

CC – Coluna cromatográfica

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

CIPLAN - Comissão Nacional Interministerial de Planejamento e Coordenação

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

CLAE-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos

CMD - Concentração média determinada

CR - Crescimento radicular

CRC - Comprimento da radícula no controle

CRT - Comprimento da radícula no tratamento

DMSO – Dimetilsulfóxido

DP – Desvio padrão

DPR - Desvio padrão relativo

EAB - Extrato Aquoso Bruto

EEB - Extrato etanólico bruto

EHB - Extrato hexânico bruto

█ E - █ Etanólico

FAEE - Fração Aquosa do Extrato Etanólico

G% - Germinação

GC - Germinabilidade do controle

GT - Germinabilidade do tratamento

HCl – Ácido Clorídrico

Hz – Hertz

IC – Inclinação da curva de calibração

J – Constante de acoplamento de ^1H

LD - Limite de Detecção

LQ - Limite de Quantificação

M – Molar

MHz - MegaHertz

mm – Milímetro

MT- Medicina Tradicional.

NaOH – Hidróxido de sódio

nm – Nanômetros

PEG – Polietilenoglicol

ppm – Partes por milhão

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN de ^1H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

TICR - Taxa de inibição do crescimento radicular

TIG - Taxa de inibição da germinabilidade

TMS – Tetrametilsilano

TR – Tempo de retenção

UV – Ultravioleta

US\$ - Dólar

Var.- Variedade

δ - Deslocamento químico

r – Coeficiente de correlação

σ - Desvio padrão do y-intercepta

RESUMO

O presente trabalho de conclusão de curso descreve o estudo químico, atividade biológica de folhas de [REDACTED] espécie do bioma Cerrado do Distrito Federal, conhecida popularmente como cabelo de negro. Além de desenvolver e validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar o marcador fitoquímico rutina no extrato aquoso de [REDACTED]. Durante este trabalho foi identificado por RMN (Ressonância Magnética Nuclear) de ^{13}C e ^1H o flavonóide isoquercetrina no extrato etanólico das folhas de [REDACTED] e o flavonoide rutina na análise comparativa do padrão de rutina e o extrato aquoso das folhas por CLAE, nas folhas do extrato hexânico submetida à CCD em comparação com padrão de lupeol, sugeriu a presença desse composto. As folhas dos extratos brutos hexânico, etanólico, aquoso e fração aquosa do extrato etanólico apresentaram baixa toxicidade utilizando como modelo larvas de *Artemia salina*, pelo qual, amostras que apresentam $\text{DL}_{50} > 1000\text{ppm}$ são consideradas inativas. Na avaliação da atividade alelopática, foi determinada a ação dos extratos brutos sobre a germinação e crescimento das sementes de *Lactuca sativa*. Dos extratos estudados nenhum foi capaz de inibir a germinação de sementes de sementes de *Lactuca sativa*, nas concentrações teste. Em relação ao crescimento radicular a fração aquosa do extrato etanólico apresentou inibição dose-dependente, sendo inibido moderadamente o crescimento das partes aéreas. O extrato aquoso não inibiu o crescimento das partes aéreas de sementes de *L. sativa*, ocorrendo inibição dose-dependente apenas do crescimento radicular. Os extratos etanólico, aquoso e fração aquosa do extrato etanólico foram avaliados quanto à atividade antioxidante através do modelo de redução do complexo de fosfomolibdênio, realizado segundo PRIETO (1999), no qual os extratos apresentaram significativa atividade antioxidante quando testados com o BHT, quercetina e ácido ascórbico. No que diz respeito à validação de método, o presente trabalho conseguiu desenvolver uma rápida e confiável técnica de CLAE para determinação do flavonoide rutina no extrato aquoso de folhas de [REDACTED]. Sendo assim, validado de acordo com todos os parâmetros determinados tanto nacionalmente quanto internacionalmente.

Palavras Chaves: [REDACTED] Cerrado e cabelo de negro.

ABSTRACT

This study of the course completion describes the chemical, biological activity of leaves of [REDACTED] species of the Cerrado biome of the Federal District, popularly known as black hair. In addition, develop and validate an analytical method by high performance liquid chromatography (HPLC) to quantify the marker phytochemical rutin in aqueous extract of [REDACTED]. During this work it was identified by NMR (Nuclear Magnetic Resonance) ^{13}C and ^1H isoquercitrin the flavonoid in ethanol extract of the leaves of [REDACTED] and the flavonoid rutin in the comparative analysis of the pattern of rutin and aqueous extract of leaves by HPLC, in leaves of hexane extract was submitted to CCD compared with standard lupeol, suggested the presence of such compound. The leaves of the crude hexane extracts, ethanol, aqueous and aqueous fraction of the ethanol extract showed low toxicity in the model of the larvae of *Artemia salina*, whereby samples with $\text{LD}_{50} > 1000$ ppm are considered inactive. In assessing the allelopathic activity was determined the action of extracts on germination and growth of *Lactuca sativa* seeds. None of the extracts tested were able to inhibit the germination of *Lactuca sativa* seeds in the tested concentrations. In relation to root growth the aqueous fraction of the ethanol extract showed dose-dependent inhibition, moderately inhibited the growth of the aerial parts. The aqueous extract did not inhibit the growth of aerial parts of *L. sativa* seeds, occurring only dose-dependent inhibition of root growth. The ethanolic, aqueous and aqueous fraction of the ethanol extract were evaluated for antioxidant activity through the reduction model complex phosphomolybdenum, performed according PRIETO (1999), in which the extracts showed significant antioxidant activity when tested with the BHT, quercetin and ascorbic acid. In respect to method validation, this work develops a rapid and reliable technique for HPLC determination of flavonoid rutin in aqueous extract of leaves of [REDACTED]. It was validated according to all parameters determined both nationally and internationally.

Keywords: [REDACTED] Cerrado and Black Hair.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1. Introdução

Do território nacional o cerrado corresponde de 20 a 25%, este gradiente fisionômico varia de uma paisagem campestre (os campos limpos) até paisagem com aparência florestal (os cerradões), intermediadas por campos sujos, campos cerrados e cerrados *sensu stricto*. A flora do cerrado é bastante rica e diversificada, com cerca de 6.062 espécies de fanerógamas e 267 espécies de pteridófitas (BIERAS; SAIO, 2004).

Durante a história os relatos mostram que o homem utiliza os recursos naturais em seu proveito. Os conhecimentos para tal utilização foram passados oralmente por gerações, ligados muitas vezes com mitos e rituais, tornando parte importante das culturas locais até hoje (AGUIAR & BARROS, 2012). Em países em desenvolvimento o uso da *medicina tradicional* (MT) e das plantas medicinais é largamente observado como base normativa para a manutenção de saúde (ONU, 1996). Nesses países, a medicina ainda aproveita grande parte dos conhecimentos tradicionais e crenças locais, como suporte de cuidados com a saúde (BRASIL, 2006).

Além disto, as plantas medicinais, os produtos naturais isolados e as preparações fitofarmacêuticas representam um mercado de bilhões de dólares, tanto em países industrializados e em desenvolvimento (BRASIL, 2006.). O mercado mundial de plantas medicinais totalizou US\$ 22 bilhões, em 2002. Sendo que a Europa e os Estados Unidos juntos contribuem com uma parcela de mais da metade deste mercado US\$14,8 bilhões, na Europa movimentou US\$ 8,5 bilhões e nos Estados Unidos US\$ 6,3 bilhões. Considerando o mercado mundial amplo de suplementos alimentares e fitoterápicos, esse valor chega a US\$ 50,6 bilhões. (RODRIGUES & BARBOSA, 2012)

Segundo a Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (ABIFISA), o mercado brasileiro de fitoterápicos alcançou um faturamento de R\$ 660,5 milhões e uma quantidade vendida de 37,5 milhões de unidades, em 2007, números estes bem abaixo de países como os Estados Unidos, porém o Brasil vem investindo cada vez mais nesse setor. Nos dados disponibilizados por esta associação mostra que o crescimento do faturamento no mercado fitoterápico foi de mais de 20% em relação

a 2006 enquanto a quantidade vendida cresceu aproximadamente 18% nesse período (RODRIGUES & BARBOSA, 2012).

As taxas de crescimento dos mercados farmacêutico e fitoterápico mostram que o primeiro foi mais dinâmico em 2006, mas foi ultrapassado pelo crescimento do mercado de fitoterápicos tanto em quantidade, quanto em faturamento no ano de 2007. Nota-se que a dinâmica no mercado de fitoterápico vem aumentando. Contudo, se pararmos para analisar o tamanho da biodiversidade brasileira, o mercado mundial (cerca de 40 vezes maior), e também a participação relativa deste segmento no mercado farmacêutico nacional de apenas 3%, fica claro que ainda existe muito espaço para avançar (RODRIGUES & BARBOSA, 2012). Segundo Hasenclever, em 2008 identificou-se 727 registros de produtos fitoterápicos e 171 empresas neste ramo. Em 2006, o número era de 367 medicamentos fitoterápicos e 103 empresas (BRASIL, 2007). Significando crescimento considerável de 98,0% no número de medicamentos e de 66,0% no número de empresas registradas.

O desenvolvido a partir da visão moderna dos sistemas nacionais de inovação, desenvolvimento local e, no caso, a partir de cada bioma, representa uma alternativa concreta e viável para chegarmos a novos produtos, novas metodologias, realizando em termos globais a vantagem competitiva dos nossos recursos naturais, promovendo um grande salto tecnológico na produção de medicamentos, quebrando o ciclo vicioso de competirmos com o mundo realizando os mesmos paradigmas de desenvolvimento tecnológico de medicamentos desenvolvido em países com biodiversidade que não se compara à brasileira (Bôas & Gadelha, 2007).

Sabendo de todas essas necessidades, a Organização Mundial de Saúde a algum tempo incentiva a utilização de plantas medicinais, mediante a Resolução WA 31.33 (1978) e 40.33 (1987), com o conteúdo que reafirma a importância das plantas medicinais nos cuidados com a saúde, recomendando entre outros aspectos a criação de programas globais para a identificação, validação, preparação, cultivo e conservação das plantas medicinais utilizadas na medicina tradicional, bem como assegurar o controle de qualidade dos fitoterápicos. (OLIVEIRA, et al., 2006)

No Brasil, o Ministério da Saúde baixou Diretrizes e Prioridades de Investigação em Saúde mediante a portaria 212 (1981), incluindo as plantas medicinais. Em 1988, a Comissão Nacional Interministerial de Planejamento e Coordenação (CIPLAN) insere a Fitoterapia como prática oficial da medicina e orienta sua inclusão nos serviços primários de saúde. Esta recomendação

condiciona o uso de plantas medicinais a estudos científicos, que incluem a investigação antropológica-botânica aliada à medicina popular tradicional popular; isolamento e caracterização de substâncias ativas; transformação química gerando novos fármacos, ensaios farmacológicos, toxicológicos, pré-clínicos e clínicos (OLIVEIRA, et al., 2006).

Em 2006, o decreto nº 5813, iniciou-se a *Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*, com finalidade de garantir acesso seguro e uso correto de plantas medicinais e fitoterápicas pela população, promover a utilização sustentável de biodiversidade brasileira e fortalecer a indústria nacional. (BRASIL, 2006.) Esse foi um importante passo conseguido no Brasil para incentivar comprovação cientificamente com pesquisas para a utilização de fitoterápicos e aumentar também a competitividade de um país que detém quase um terço da flora mundial e pouco utiliza essa vantagem ao seu favor (Bôas & Gadelha, 2007).

Mesmo com todos os incentivos descritos antes, a quantidade de espécies medicinais do Cerrado registradas com substâncias ativas para fabricação de medicamentos fitoterápicos, representando menos de 1% do total de espécies do bioma e, aproximadamente, 7% das espécies já utilizadas na medicina popular. Tais números reafirma a intensa necessidade de realização de estudos etnobotânicos das plantas nativas do Cerrado e estímulos para implantação de laboratórios que as utilizem economicamente (RODRIGUES & BARBOSA, 2012).

Sabendo da carência de informações e importância na pesquisa de novos compostos de um dos maiores biomas do mundo, cerrado, o trabalho teve como objetivo a escolha de uma planta ([REDACTED]) deste bioma que relativamente possui pouco estudado para desenvolver e validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar o marcador fitoquímico rutina no extrato aquoso de [REDACTED]. Segundo a RDC nº 48 da Anvisa, marcador é componente ou classe de compostos químicos (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.) presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos (BRASIL, RDC 48, 2006). Além de identificar os constituintes químicos e biológicos das suas folhas em diversos extratos (hexânico, aquoso, etanólico e fração clorofórmica do extrato etanólico).

A família [REDACTED] é composta por quatro gêneros: [REDACTED] [REDACTED] (HEGNAUER, 1981). O gênero [REDACTED] abrange cerca de 250 espécies de árvores tropicais, vastamente distribuídas na América do Sul, África e Madagascar (SANTOS; LIMA; SILVEIRA, 2003). Há muitas informações a respeito de espécies produtoras de [REDACTED] presentes neste gênero, encontrados em apenas 2 espécies e 4 variedades [REDACTED] [REDACTED] (Amazônia coca); [REDACTED] colombiana) e [REDACTED] (PLOWMAN, et al., 1982). Contudo, para a espécie [REDACTED] pouco tem sido relatado na literatura acerca de suas atividades químicas e biológicas (VIOLANTE, 2008).

Entre as propriedades etnofarmacológicas do gênero, destaca seu uso como estimulante, para induzir euforia, contra a fadiga, alívio da sensação de fome, problemas estomacais, cefaleia e dor de garganta. Também tem sido utilizada contra distúrbios hepáticos e renais, como anestésico local, afrodisíaco, anti-hemorragico, anti-inflamatório, cicatrizante e combate à febre. Farmacologicamente são estudados extratos de várias das espécies do gênero, sendo avaliado o efeito citotóxico, a atividade antibacteriana, atividade antiviral, entre outras (GONZÁLEZ-LAVAUT, et al., 2008). No que diz respeito à espécie [REDACTED], conhecida popularmente como [REDACTED], seu uso na medicina popular é restrito a processos inflamatórios e como planta abortiva (SOMAVILLA, 1998).

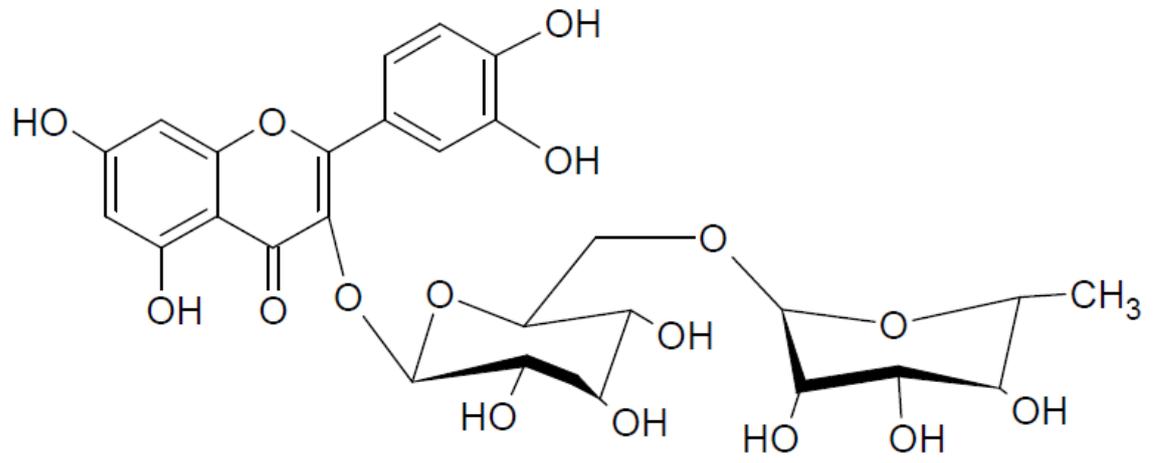
Os metabólitos secundários mais registrados na família [REDACTED] são alcalóides tropanicos, diterpenos, e flavonoides glicosídicos (ZUANAZZI, et al., 2001; GONZÁLEZ-GUEVARA, et al., 2006; BARREIROS, et al., 2007). Para os flavonoides identificam-se: flavonóis, flavanonas, flavanos, isoflavonas, flavonas e chalconas, já para os alcalóides, 93% dos registros correspondem a alcalóides do tipo tropano. Os órgãos da planta onde se isolou a maioria dos metabólitos secundários são as folhas, tronco, casca da raiz e casca de ramos (GONZÁLEZ-GARCÍA, et al., 2005).

Por meio de levantamento bibliográfico realizado no Scielo e Google Acadêmico foi localizado apenas um registro relativo a estudos sobre os metabólitos secundários bioativos da espécie [REDACTED]. Foram identificados no extrato etanólico dos galhos componentes identificados como misturas de triterpenos (ácidos ursólico e oleanólico) e diterpenos (7-oxo-16-hidroxi-abiet-15 (17)-en-19-al, 7-oxo-abiet-15 (17)-en-16-ol, 7 α ,16-di-hidroxi-abiet-15 (17)-en-19-al, ent-12 α -hidroxi-

Kaur-16-en-19-al e ent-7 α , 15 β -di-hidroxi-kaur-16-en-19-oato de metila) é o primeiro relato deste composto de forma natural. Além de misturas de diglicerídeos e diterpenos, flavonoides ombuína-3-rutinosídeo, catequina e epicatequina, o aminoácido L-aspartato de etila e os esteroides (6'-O-Acil)-3-b-Dglucopiranosil sitosterol e o 3-O-b-D-glucopiranosil sitosterol. O estudo químico do extrato etanólico das folhas resultou na obtenção do flavonoide quercetina-3-rutinosídeo, em quantidade significativa, e rutina (quercetina-3-rutinosídeo), além do diterpeno (E)-fitol (NASCIMENTO, 2012). Além disso, durante este trabalho foi identificado por RMN (Ressonância Magnética Nuclear) de ^{13}C e ^1H o flavonoide isoquercetrina no extrato etanólico das folhas de [REDACTED] e o flavonoide rutina na análise comparativa do padrão de rutina e o extrato aquoso das folhas por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

A rutina (Figura 1) é um flavonoide da subclasse dos flavonóis, essa substância é constantemente pesquisada e os resultados estão interessando constantemente as indústrias farmacêuticas. Dentre os flavonoides estudados a rutina tem se destacado em função das suas diversas atividades farmacológica (PEDRIALI, 2005). Entre as atividades terapêuticas da rutina, está a melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos aliado com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede destes vasos. Outros sintomas de fragilidade capilar também são melhorados, entre eles, a perda da acuidade visual e alterações do campo visual. Estes efeitos podem ser da rutina isoladamente, ou associada ao ácido ascórbico, cuja absorção melhora quando administrado junto com a rutina (PATHAK, et al., 1991).

A importância da rutina para as indústrias farmacêuticas, o desenvolvimento de método analítico e seu processo de validação para esta planta do cerrado é uma boa contribuição científica no que diz respeito ao estabelecimento de parâmetros de qualidade numa planta pouca estudada do cerrado brasileiro. Além disto, o estudo químico e biológico dos seus extratos auxilia no conhecimento de mais uma planta com potencial terapêutico que pode ser devidamente explorada para fins médicos e econômicos.

FIGURA 1: Estrutura da Rutina.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Os dados do trabalho foram omitidos para fins de processo de patente, assim sendo, não foi informada a família, espécie, gênero ou termos que identificasse a planta estudada.

Realizar o Trabalho de Conclusão de Curso através dos dados obtidos durante os Projetos de Iniciação Científica na graduação, sob a orientação das professoras Dra. Damaris Silveira e Dra. Yris Maria Fonseca.

Determinar a composição química e atividade biológica de extratos das folhas de [REDACTED] e utilizar a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para desenvolvimento e validação de método analítico.

Objetivos Específicos:

Realizar o estudo fitoquímico dos extratos hexânico e etanólico de folhas de [REDACTED]

Avaliar as possíveis atividades biológicas apresentadas pelos extratos brutos hexânico, etanólico, fração aquosa do extrato etanólico e extrato aquoso.

Desenvolver e validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar rutina no extrato aquoso de [REDACTED]

CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MÉTODOS GERAIS:

Todos os ensaios químicos e de atividade biológica foram realizados no laboratório de Ensaio Químico e no laboratório de Controle de Qualidade, ambas da Faculdade de Ciências da Saúde, UnB, sob a orientação das professoras Damaris Silveira e Yris Maria Fonseca.

2.1.1. – Cromatografia em coluna delgada (CCD):

Utilizada sílica gel ALUGRAM Sil G Machery-Nagel (60/0.2 mm) utilizando a visualização sob luz ultravioleta, seguida de revelação com vapor de iodo e/ou reagentes anisaldeído/ H_2SO_4 e/ou NP/PEG para visualização (Wagner & Bladt, 1996).

2.1.2. – Cromatografia em coluna (CC) (BARROS, 2008):

2.1.2.1. - Sílica gel Merck 60 A:

Foram realizadas colunas cromatográficas usando sílica gel Merck 60 A (0.063 - 0.200 mm) como fase estacionária, para a fase móvel foi utilizado inicialmente o solvente hexano como gradiente de eluição, aumentando a polaridade dessa fase com o acompanhamento de cromatografia em camada delgada (CCD) e formas de revelação anteriormente elucidadas.

2.1.3. – Análise Espectrométrica (BARROS, 2008):

Foi realizado no laboratório do Instituto de Química, UnB, pela professora Ines Sabinal Reck.

2.1.3.1. – Ressonância Magnética Nuclear (RMN):

Obtidos no espectrômetro VARIAN Mercury Plus (300MHz, 7,04T, E.U.A.) sondas de detecção inversa de 5mm de diâmetro interno. O solvente utilizado para diluir a amostra foi $CDCl_3$, referenciado com tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e as respectivas constantes de acoplamentos (J), em Hertz.

2.1.4. Ensaio Biológicos

2.1.4.1. – Atividade Citotóxica

2.1.4.1.1. – Teste de Toxicidade às Larvas de *Artemia salina* (MEYER et al., 1982):

Esse ensaio realizado de acordo com o método de Meyer (Meyer et al., 1982). Uma solução de sal marinho (36,5 g/L) foi preparada e ajustada, com uma solução 0,1M de NaOH, até pH 8-9. Esta solução foi utilizada para a eclosão dos ovos de *Artemia salina* e para o preparo da diluição do extrato hexânico da [REDACTED]. Os ovos de *Artemia salina* foram postos para eclodir em solução salina por 48 horas com aeração constante e expostos à luz.

O extrato foi solubilizado em 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e o volume completado para 20 mL com a solução salina. A partir desta solução foram preparadas diluições seriadas. O experimento foi realizado em triplicata. A cada tubo foram adicionadas 10 larvas de *A. salina*. Estes foram mantidos sobre iluminação e as larvas sobreviventes foram contadas após 24h horas. Dicromato de potássio foi usado como o padrão da referência.

2.1.4.1.2. - Germinação e Crescimento (BORGHETTI; FERREIRA, 2004)

Preparo das Sementes:

Sementes selecionadas de alface (*Lactuca sativa*) previamente tratadas com hipoclorito de sódio 2% por 3 minutos e lavadas com água destilada, foram colocadas para germinar em placas de petri de 9 cm de diâmetro. As placas foram previamente esterilizadas em autoclave, revestidas com papel de filtro Wathman nº1.

Preparo das amostras e controles:

As placas de Petri montadas com discos de papel-filtro foram umedecidas com 10 mL de solução adequada (hexano, etanol e água) dependendo do extrato analisado das folhas de [REDACTED] nas concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mg/mL.

Para o ensaio de germinação, após a adição da solução foram adicionados a cada placa 25 diásporos das espécies-alvos, foram distribuídas de forma aleatória sobre o papel. O conjunto foi mantido sobre condições de luminosidade e temperatura ambiente. Para cada tratamento foram feitas 3 repetições totalizando 75 sementes por grupo. Como controle, o mesmo procedimento foi utilizado, entretanto sem o extrato vegetal. A ocorrência de germinação das sementes foi monitorada nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. As sementes germinadas eram excluídas do experimento a cada intervalo de observação.

Para o ensaio de crescimento, após adição da solução foram adicionados a cada placa 10 diásporos das espécies-alvos, foram distribuídas de forma aleatória sobre o papel. O conjunto foi mantido sob as condições de luminosidade e temperatura ambiente. Para cada tratamento foram feitas 3 repetições totalizando 30 sementes por grupo. Como controle, o mesmo procedimento foi utilizado, entretanto, com a ausência do extrato vegetal. Os diásporos estavam em período de crescimento prévio de três dias foram escolhidas pelo tamanho de crescimento neste período, as medidas da radícula e das partes aéreas das 10 plântulas por placa foram feitas após sete dias de crescimento.

Análise Estatística:

Para a análise dos testes de germinação foi usada a variável: Taxa de inibição da germinabilidade, baseada na comparação entre controle e demais tratamentos. Sendo o resultado fornecido em porcentagem por meio da fórmula descrita por Condessa, 2011.

$$\text{TIG} = (\text{GC} - \text{GT})/\text{GC}.100\%$$

Onde:

TIG = taxa de inibição da germinabilidade;

GC = germinabilidade do controle;

GT = germinabilidade do tratamento;

Para a análise dos testes de crescimento foram usadas a variável: taxa de inibição do crescimento radicular, onde ocorre a comparação entre o controle e demais tratamentos. Sendo o resultado fornecido em porcentagem por meio da fórmula descrita por Condessa, 2011.

$$\text{TICR} = (\text{CRC} - \text{CRT})/\text{CRC}.100\%$$

Onde:

TICR = taxa de inibição do crescimento radicular;

CRC = comprimento da radícula no controle;

CRT = comprimento da radícula no tratamento.

Valores negativos de TICR indicam estímulo ao crescimento e os valores positivos indicam inibição do crescimento.

Os dados de crescimento foram submetidos Análise de Variância (**ANOVA**) não paramétrica seguido de Dunnet ($p < 0,05$). Os dados de germinabilidade foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) *oneway* seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na análise de germinação o parâmetro avaliado foi germinabilidade (G) e nos ensaios de crescimento foi avaliado o crescimento radicular (CR) após 7 dias em contato com os extratos testados.

2.1.4.2. Avaliação do potencial antioxidante pelo Modelo de Redução do Complexo de Fosfomolibdênio.

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de redução do complexo de fosfomolibdênio (PRIETO, 1999). Curvas padrão de três compostos de atividade antioxidante conhecida (BHT, ácido ascórbico e quercetina) foram construídas e comparadas às amostras. Para construção das curvas, alíquotas de 0,1 mL das soluções estoque (1mg/mL) e das diluições em etanol de cada composto e dos

extratos foram misturadas a 1 mL de reagente, em triplicata. A reação foi incubada a 95°C por 90 minutos e após resfriamento foram medidas as absorvâncias em 695 nm em cubetas de poliestireno (caminho óptico 1 cm). Para cada diluição foi preparado um controle com 1 mL da solução reagente + 0,1 mL da solução padrão de cada composto testado (de referência e extratos). Um branco preparado com 1 mL da solução reagente + 0,1 mL de etanol foi utilizado para zerar o aparelho.

O reagente foi preparado pela mistura de 0,025 L de solução aquosa de fosfato de sódio (Na_3PO_4 , 28 mM), 0,025 L de solução aquosa de molibdato de amônio tetrahidratado [$(\text{N}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4 mM,] e 0,025 L de solução aquosa de ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 0,6 M).

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa Prisma e curvas-padrão foram construídas pelo método de regressão linear.

A Tabela 1 apresenta a concentração das soluções de quercetina, média e desvios das absorvâncias utilizadas para a construção da curva-padrão (FIGURA 1), que apresentou boa linearidade ($r^2 = 0,994$).

A Tabela 2 apresenta a concentração das soluções de ácido ascórbico, média e desvios das absorvâncias utilizadas para a construção da curva-padrão (FIGURA 2), que apresentou boa linearidade ($r^2 = 0,989$).

A Tabela 3 apresenta a concentração das soluções de BHT, média e desvios das absorvâncias utilizadas para a construção da curva-padrão (FIGURA 3), que apresentou boa linearidade ($r^2 = 0,941$).

TABELA 1: Leitura de absorvâncias da quercetina para a construção da curva padrão.

Quercetina (mg/mL)	Absorvância a 695 nm			Média	DP
0,05	0,068	0,075	0,076	0,073	0,003

0,10	0,101	0,125	0,119	0,115	0,007
0,20	0,374	0,330	0,331	0,345	0,015
0,40	0,682	0,701	0,688	0,690	0,006
0,60	1,073	1,070	1,071	1,071	0,001
0,80	1,477	1,380	1,537	1,465	0,046
1,00	1,839	1,820	2,034	1,898	0,068

FIGURA 2: Atividade redutora da quercetina no método do fosfomolibdênio. Curva padrão construída com as absorbâncias obtidas com concentrações crescentes da quercetina.

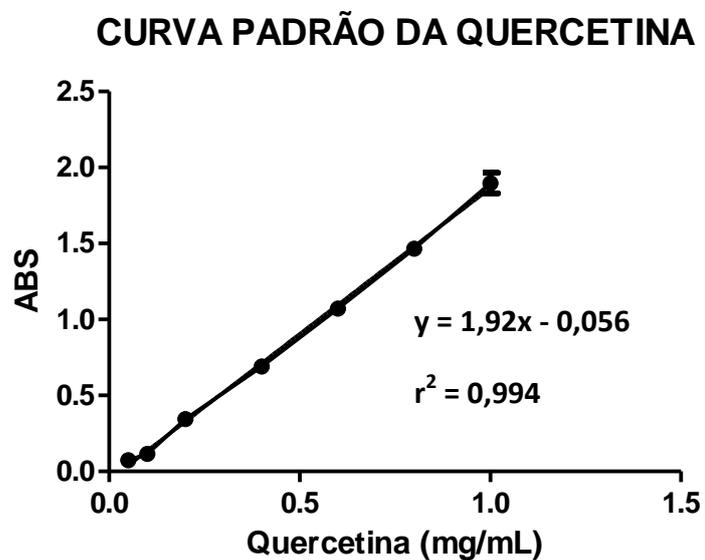


TABELA 2: Leitura de absorbâncias do ácido ascórbico para a construção da curva padrão.

Ácido Ascórbico (mg/mL)	Absorbância a 695 nm			Média	DP
0,05	0,175	0,216	0,203	0,198	0,0122
0,10	0,728	0,743	0,725	0,732	0,0056
0,20	1,349	1,244	1,293	1,295	0,0303
0,40	1,648	1,824	1,964	1,812	0,0914
0,60	2,332	2,346	2,205	2,294	0,0448
0,80	2,767	2,724	2,722	2,738	0,0147
1,00	3,275	3,283	3,243	3,256	0,0212

FIGURA 3: Atividade redutora do ácido ascórbico no método do fosfomolibdênio. Curva padrão construída com as absorbâncias obtidas com concentrações crescentes do ácido ascórbico.

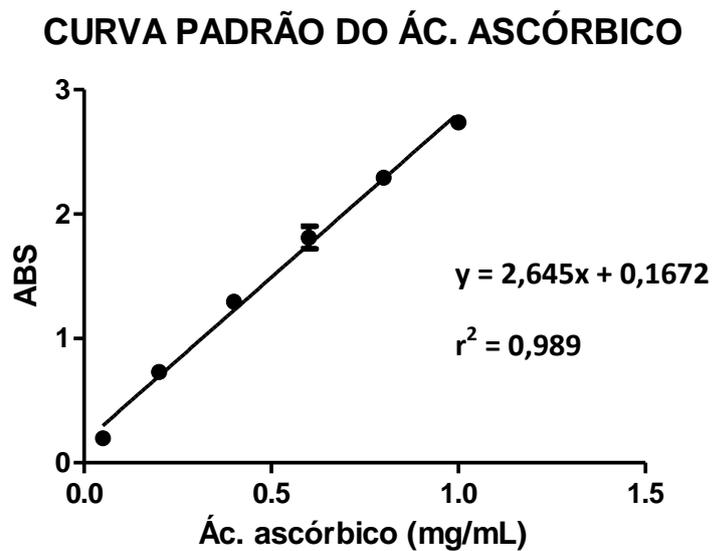
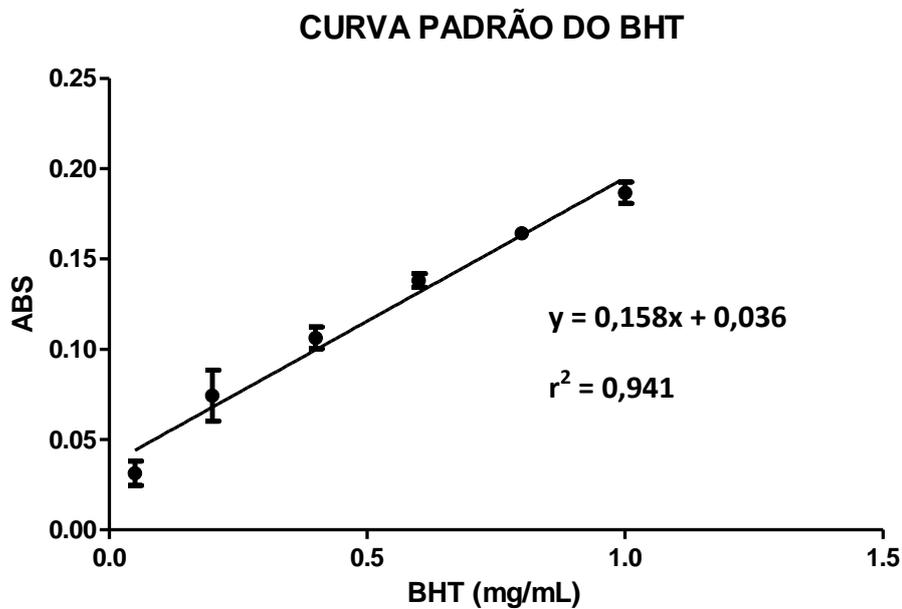


TABELA 3: Leitura de absorvâncias do BHT para a construção da curva padrão.

BHT(mg/mL)	Absorbância a 695 nm			Média	DP
0,05	0,036	0,040	0,018	0,031	0,007
0,10	0,089	0,088	0,046	0,074	0,014
0,20	0,103	0,118	0,098	0,106	0,006
0,40	0,137	0,145	0,132	0,138	0,004
0,60	0,167	0,160	0,166	0,164	0,002
0,80	0,198	0,178	0,184	0,187	0,006
1,00	0,231	0,243	0,228	0,234	0,008

FIGURA 4: Atividade redutora do BHT no método do fosfomolibdênio. Curva padrão construída com as absorvâncias obtidas com concentrações crescentes do BHT.

2.2. – PARTE EXPERIMENTAL

2.2.1. Descrição botânica:

Família: [REDACTED]

Espécie: [REDACTED]

Gênero: [REDACTED]

Sinonímia Popular: [REDACTED]

FIGURA 5: Planta adulta de [REDACTED]



2.2.2. Obtenção do material botânico:

Folhas de [REDACTED] foram coletadas na região do Park Way, Distrito Federal, pelo Professor da Universidade de Brasília (UnB) Dr. Christopher William Fagg. Uma exsicata foi depositada no Herbário da UnB e está em fase de catalogação.

2.2.3. Obtenção dos extratos brutos:

2.2.3.1. - Extrato hexânico bruto (EHB):

As folhas de [REDACTED] foram secas em estufa a 35° e posteriormente pulveriza. O material botânico pulverizado (669,31g) foi submetido à extração por maceração, utilizando hexano seguido de etanol como solvente. O processo de maceração foi repetido quatro vezes. As soluções obtidas foram filtradas e, após o processo de filtração, passaram pelo processo de concentração no rotavaporador, sob vácuo a uma temperatura de aproximadamente 40 °C. Após evaporação do solvente, foram obtidos os extratos brutos hexânico e etanólico (8,56g de rendimento 1,28% e 65,154 g de rendimento 9,73% respectivamente) o qual se constitui objeto deste estudo, como apresentado na Tabela 4.

TABELA 4: Rendimentos dos extratos brutos de [REDACTED]

Extrato	Folhas	Extrato	Rendimento
Etanólico	669,31g	65,154g	9,73%
Hexânico	669,31g	8,58g	1,28%

2.2.3.2. - Extrato etanólico bruto (EEB):

As folhas de [REDACTED] contendo (669,31g) foram submetidas à extração por maceração, utilizando primeiramente hexano como solvente, sendo que o processo de maceração foi repetido quatro vezes. Em seguida, o material botânico foi submetido à extração por etanol, sendo utilizado o mesmo método anterior. As soluções extrativas obtidas foram filtradas, passando em seguida pelo processo de concentração no rota-evaporador, à temperatura de aproximadamente 40 °C. Após evaporação do solvente, foram obtidos os extratos hexânico e etanólico brutos, sendo que o segundo objeto desse estudo forneceu (65,154 g, 9,73 % de rendimento).

2.2.3.3. – Fração Aquosa do Extrato Etanólico (FAEE):

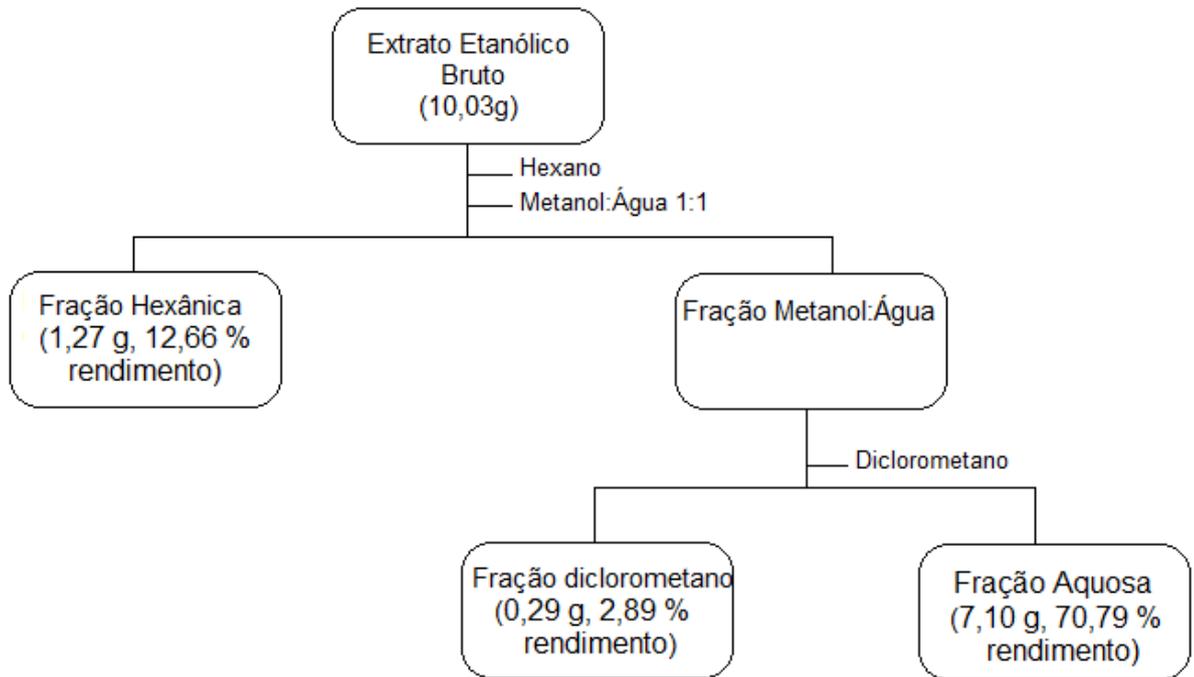
As folhas de [REDACTED] foram secas em estufa a 35°C e posteriormente pulverizadas. O material botânico pulverizado (669,31g) foi submetido à extração por maceração, utilizando hexano seguido de etanol como solvente. O processo de maceração foi repetido quatro vezes. As soluções obtidas foram filtradas e, após o processo de filtração, passaram pelo processo de concentração no rotavaporador, sob o vácuo a uma temperatura de aproximadamente 40 °C. Após evaporação do solvente, foram obtidos os extratos brutos hexânico e etanólico (65,154 g, 9,73 % de rendimento).

Foram separados 10,3g do extrato etanólico que, posteriormente, foram submetidos à filtração com diferentes solventes, fornecendo três frações diferentes de acordo com a polaridade. O método foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa foi utilizada como solvente a mistura metanol:água:hexano na proporção 1:1:2, na qual foram obtidas duas frações: a fração hexânica I (1,27 g, 12,66 % rendimento), e a fração hidrometanólica II (7,10 g, 70,79 % rendimento). Na segunda etapa, a fração de Metanol: Água foi submetida a uma nova partição com diclorometano na mesma proporção do volume da fração de Metano:Água na qual foi obtida a fração de diclorometano III (0,29 g, 2,89 % rendimento). Após a partição, foram obtidas três frações: hexânica, de diclorometano e aquosa (Tabela 5) (Fluxograma1).

TABELA 5: Rendimentos das frações derivadas do extrato etanólico.

<i>Frações</i>	<i>Massa</i>	<i>Rendimento</i>
I	1,27g	12,66%
II	7,10g	70,79%
III	0,29g	2,89%

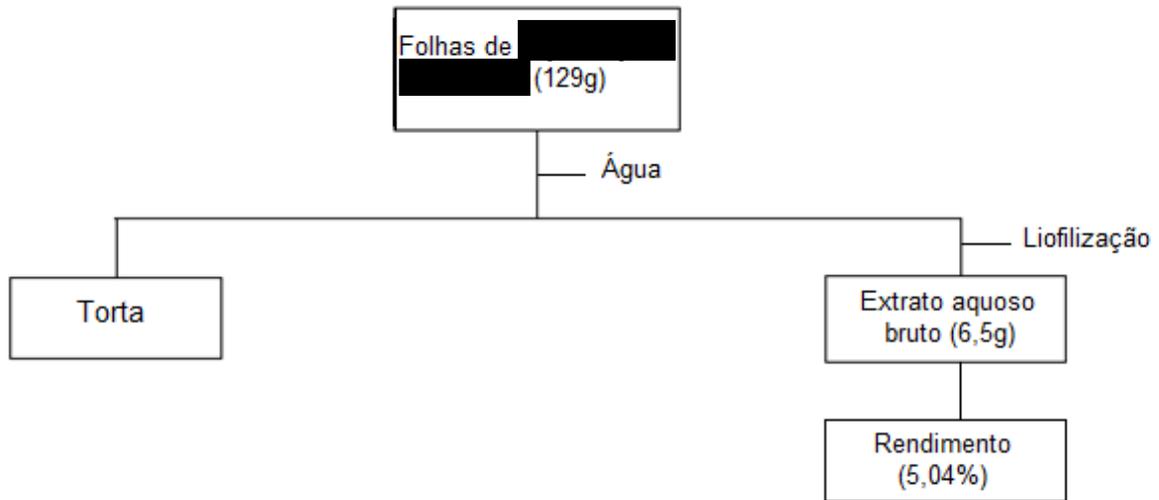
FLUXOGRAMA1: Esquema da partição do extrato etanólico



2.2.3.4. – Extrato Aquoso Bruto (EAB):

Parte do material botânico pulverizado (129 g) foi submetida à extração por infusão, utilizando água destilada (3L) a aproximadamente 70 °C. A mistura foi deixada arrefecer até aproximadamente 40 °C, sendo então submetida à filtração. Após congelamento, a solução extrativa foi submetida à liofilização, fornecendo o extrato aquoso bruto liofilizado (Fluxograma 2).

FLUXOGRAMA 2: Obtenção do extrato aquoso bruto liofilizado de [REDACTED]



2.2.4. – Isolamento e Identificação de constituintes químicos das folhas de [REDACTED]

2.2.4.1. – Fitoquímica do extrato hexânico (EHB)

Parte do extrato hexânico bruto (5g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (CC), monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD). As frações retiradas da CC que apresentaram semelhança por CCD foram reunidas e posteriormente purificadas por métodos clássicos e submetidas à análise (CCD) com substâncias padrão. Foram colhidas 176 frações e reunidas em 38 grupos.

Grupo 35 (frações 160-168)- Obtida diretamente a partir de cromatografia em coluna do extrato hexânico bruto das folhas de [REDACTED] a partir do eluente hexano: acetato de etila (9:1).

2.2.4.2. – Fitoquímica do Extrato etanólico bruto (EEB):

O extrato etanólico (5,324g) foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel (altura= 27 cm; diâmetro= 4,1cm),

utilizando a seguinte ordem de eluição: Hexano; Hexano:Acetato de Etila; Acetato de Etila: Metanol; Metanol, em diferentes proporções.

As frações (50mL) foram coletadas, concentradas à secura sob vácuo e monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD). As frações com perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas em grupos. (Tabela 6)

Nas colunas cromatográficas (CC) foi utilizada sílica gel 60G. A cromatografia em camada delgada (CCD) foi desenvolvida utilizando placas cromatográficas de sílica 60G, utilizando o reagente anisaldeído/ H₂SO₄ para visualização.

As frações foram submetidas a lavagem com solvente, recristalização e/ou cromatografia em camada delgada preparativa (CCP), permitindo o isolamento de substâncias purificadas. A caracterização química dessas foi realizada a partir de métodos espectrométricos de análise (RMN de ¹H e ¹³C).

TABELA 6: Resultados das frações obtidas da cromatografia em coluna de sílica gel (CC).

Número da fração	Peso do Frasco	Peso da Substância	Número da fração	Peso do frasco	Peso da Substância
1 até 19	16,0468g	0,0116g	181-186	16,2078g	0,0149g
20	15,7595g	(-0,0008g)	187-207	15,4676g	0,0484g
21	16,21g	0,0007g	208-224	15,7927g	0,0258g
22	15,7865g	0,0006g	225-233	16,8516g	0,0192g
23	16,9823g	(-0,0004g)	234-237	15,6080g	0,0688g
24	15,6114g	0,0001g	238-239	16,2632g	0,0045g
25 até 40	16,4955g	0,0029g	240-264	16,449g	0,0409g
41	15,9652g	0,0009g	265-273	15,8356g	0,0193g
42 até 58	15,3462g	0,0008g	274-279	16,2718g	0,0123g
59 até 67	15,0607g	0,0766g	280	16,6040g	0,0027g
59 até 67 i	15,0607g	0,0165g	281	16,5530g	0,017g
59 até 67	15,9375g	0,0679g	282	24,8087g	0,588g
A					
68	15,8127g	0,0054g	283	24,7903g	0,4507g

69-73 a 75-85	16,2395g	0,033g	283i	24,7903g	0,1521g
69-73 a 75-85 i	16,2395g	0,0037g	283A.1.1	50,6557g	0,0612g
69-73 a 75-85 ^a	25,2095g	0,0287g	283A.1.2.1	24,7445g	0,0168g
74	16,0915g	0,0027g	283A.1.2.2	24,5847g	0,1321g
86-87	16,0485g	0,0025g	283A.2	25,3531g	0,0423g
88	15,5131g	0,0014g	283A.3.1	24,7516g	0,0408g
89 até 114	15,8887g	0,0865g	283A.3.2	24,7651g	0,0125g
115-117	15,7549g	0,0359g	284	15,9871g	0,3061g
118-145	16,3697g	0,038g	285	16,2570g	0,1991g
146-164	16,1278g	0,042g	286-287	24,8320g	0,3728g
165-171	15,9405g	0,0153g	28 8	16,1010g	0,1396g
172-180	15,8432g	0,0224g	289 ultima Fração	24,7472g	0,7759g

2.3. Avaliação do perfil cromatográfico por CLAE e determinação de rutina no extrato aquoso de XXXXXXXXXX

Condições cromatográficas:

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) LaChrom Elite (Hitachi, Tokyo, Japan), contando com bomba L2130, injetor L2200, forno para coluna L2300, mantido a 25 °C e detector L2455 DAD (Hitachi, Tokyo, Japan). O detector foi ajustado para coletar dados na faixa de 230 nm e 400 nm, sendo extraído um cromatograma em 354 nm. A fase móvel foi constituída de solução aquosa de ácido fosfórico 1% (Bomba A) e acetonitrila (Bomba B), sendo o gradiente de eluição demonstrado na Tabela 7. O fluxo de fase móvel foi 0,6 mL/min. A coluna utilizada foi PurospherStar RP C18e (150 x 4.6 mm, 5 mm, Merck, Germany) (Part. n°945681), acoplada a pré-coluna de mesmas características (4 x 4; 5 mm particlesize, Merck, Germany). Os dados foram adquiridos por EZChrom Elite software (version 3.3.2 SP1 Scientific Software. Inc.).

TABELA 7: Gradiente de eluição na análise por CLAE.

Tempo (min)	Bomba A	Bomba B
0	90%	10%
40	70%	30%
50	50%	50%
55	90%	10%

Preparação da amostra:

O equivalente a 10mg de extrato aquoso liofilizado de [REDACTED] foi pesado, exatamente, sendo dissolvidos em 1,2 mL de H₂O e 0,8 mL de MeOH grau UV/CLAE (5mg/mL). A solução obtida foi posteriormente filtrada.

2.3.1. Validação da metodologia

A metodologia analítica acima descrita foi validada de acordo com a RE nº 899, de 29 de maio de 2003 – ANVISA e o guia internacional para o setor industrial, Q2Bvalidação de procedimentos analíticos: Metodologia (ICH, 1996).

2.3.1.1. Seletividade

A seletividade do método, que é a capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, foi verificada pela análise de produtos de degradação da amostra por indução de hidrólise ácida/ básica. Desta forma, foi pesado 17,5 mg de extrato aquoso de [REDACTED] solubilizado em 1 mL de HCl 1N ou NaOH 1N, sendo posteriormente incubada a 60°C por 60 minutos. Após resfriamento, a solução foi neutralizada com 1mL de NaOH 1N ou HCl 1N, respectivamente e adicionada 1,5mL de metanol (5mg/mL). Realizou a análise por CLAE em triplicata (3n), comparou-se o tempo de retenção (TR) e as áreas obtidas do pico referente à rutina, nas amostras preparadas sem indução de hidrólise ácida/ básica, com amostras após indução de hidrólise ácida/básica.

2.3.1.2. Linearidade

A linearidade, que busca demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, foi avaliada através do método de regressão linear de 3 (três) curvas de calibração autênticas, usando-se 7 (sete) concentrações (7,8; 15; 63; 125; 250; 500; 1000 µg/mL). Foi determinado o coeficiente de correlação (r), intercepta, inclinação e desvio padrão relativo. O flavonoide rutina foi empregado nos ensaios de linearidade.

2.3.1.3. Precisão

Na repetibilidade, 6 (seis) replicatas de extrato aquoso de [REDACTED] 100% da concentração do teste, foram analisadas por CLAE no mesmo dia. A precisão inter-dia foi determinada em triplicata e analisada em três dias diferentes com o mesmo analista. Sendo a repetibilidade e precisão inter-dia expressa como desvio padrão relativo (DPR). Determinado pela equação:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Onde: DP= Desvio padrão; CMD= Concentração média determinada.

2.3.1.4. Limite de Detecção (LD)

A estimativa do limite de detecção, menor quantidade do analito (rutina) presente em uma amostra que pode ser detectado, foi feita com base no desvio padrão da resposta e da inclinação. Determinado pela equação:

$$\text{LD} = \frac{3,3 \sigma}{\text{IC}}$$

Onde: σ = é o desvio padrão do y-intercepta, de 3 curvas de calibração; IC = é a inclinação da curva de calibração.

2.3.1.5. Limite de Quantificação (LQ)

A determinação da menor quantidade de rutina que pode ser quantificada na análise por CLAE no extrato aquoso de [REDACTED] foi feita com base no desvio padrão da resposta e da inclinação. Determinado pela equação:

$$LQ = \frac{10 \sigma}{IC}$$

Onde: σ = é o desvio padrão do y-intercepta, de 3 curvas de calibração; IC = é a inclinação da curva de calibração.

2.3.1.6. Exatidão

Para avaliação da exatidão, foram realizadas 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta (80, 100 e 120%, respectivamente), com 3 (três) réplicas cada. Sendo expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

A exatidão do procedimento analítico em questão foi verificada pelo método de adição de padrão. Desta forma, para obtenção dos valores teóricos, foi calculada a concentração final da amostra a 100% (0,15 mg/mL) e posteriormente 80% e 120% (0,12 e 0,18 mg/mL), sendo alcançadas com 500 μ L do extrato a 100% (0,15 mg/mL) somadas as concentrações variadas do padrão rutina, como evidenciado na Tabela 8.

TABELA 8: Concentração teórica para análise da exatidão de [REDACTED]

Concentração (%)	Extrato	Rutina adicionada	Concentração Final
80 %	0,075 (mg/mL)	0,045 (mg/mL)	0,12 (mg/mL)
100 %	0,075 (mg/mL)	0,075 (mg/mL)	0,15 (mg/mL)
120 %	0,075 (mg/mL)	0,105 (mg/mL)	0,18 (mg/mL)

Os valores da rutina foram obtidos com solução mãe do padrão (1mg/mL), deste retirado 180; 300 e 420 μ L, e acrescido metanol 50% até o volume de 2mL, respectivo às concentrações de 0,09; 0,15 e 0,21 mg/mL. Para conseguir os valores mencionados na Tabela 8, retirou-se de cada alíquota 500 μ L.

Após adição de padrão às amostras, as soluções foram filtradas e 10 μ L foram injetados em cromatógrafo líquido, seguindo as condições analíticas descritas anteriormente.

2.3.1.7. Robustez

A robustez do método cromatográfico foi determinada por análise das amostras sob diferentes condições, mudanças como variação de comprimento de onda (344-364nm), fluxo (0,4-0,8mL/min), temperatura (23-27°C) e modificação da coluna do CLAE foram adotadas. Os efeitos nos parâmetros tempo de retenção e área dos picos foram observados.

TABELA 9: Variações do método para determinação da robustez.

Comprimento de onda	Fluxo	Temperatura
344nm	0,4mL/min	23°C
354nm*	0,6mL/min*	25°C*
364nm	0,8mL/min	27°C

* Parâmetro normal do método proposto.

2.4. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística GraphPadPrism[®] (versão 3.0, 1999). Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS –

Estudo Químico e Biológico.

3.1. Identificação de Substâncias Presentes do Extrato Hexânico das folhas de [REDACTED]

3.1.1. Lupeol:

EHB 01 (frações 160-168), obtidas a partir de cromatografia em coluna do extrato hexânico bruto das folhas de [REDACTED] submetida à CCD (eluente: hexano/ acetato de etila (8/2) em comparação com padrão de lupeol, utilizando a técnica de co-eluição, sugeriu a presença desse composto. A concordância foi feita visualmente entre os padrões e o extrato eluído.

3.2. Ensaios Biológicos do Extrato Hexânico das folhas de [REDACTED]

3.2.1. Atividade Citotóxica:

3.2.1.1. Avaliação da Atividade Alelopática:

O extrato hexânico bruto das folhas de [REDACTED] apresentou atividade inibitória da germinação de sementes de *Lactuca sativa* nas concentrações testadas (250ppm, 500ppm e 1000ppm) sendo necessária a realização de novos experimentos com doses mais elevadas para confirmação dos resultados obtidos.

3.2.1.2. Teste de toxicidade às larvas de *Artemia salina*:

O extrato hexânico bruto não apresentou atividade citotóxica frente as larvas de *Artemia salina*, nas concentrações testadas (1mg/mL, 0,5mg/mL, 0,25mg/mL), quando comparado ao controle.

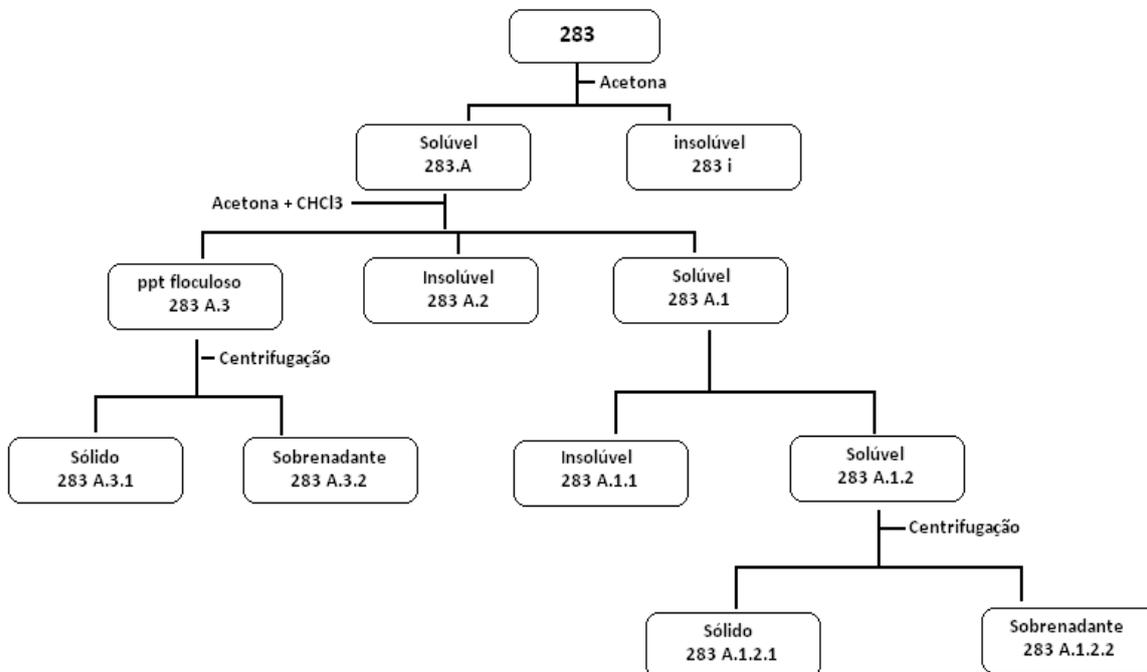
3.3. Identificação de Substâncias Presentes no Extrato Etanólico das folhas de [REDACTED]

3.3.1. Purificação da Isoquercetrina:

Fração 283: Tratada em Acetona, forneceu uma parte solúvel (283 A) e uma insolúvel (283 i). Ao ser adicionado CHCl_3 no 283A (totalizando Acetona: CHCl_3 2:1), forneceu precipitado floculoso (o sobrenadante de 283A foi chamado de 283 A.1.), A parte insolúvel de 283 A foi chamada de (283A.2) e o floculoso foi separado e centrifugado o sobrenadante foi chamado de (282 A.3.2) e o sólido (283 A.3.1). A fração 283 A.1 foi centrifugada, onde apresentou um sobrenadante e um precipitado, o precipitado foi chamado de (283 A.1.1) ou (E 02) e o sobrenadante foi novamente centrifugado e a parte solúvel foi chamado de (283 A.1.2.2) e a parte sólida de (283 A.1.2.1). (Fluxograma 3).

A análise por CCD do extrato bruto e frações, utilizando o reagente de Dragendorff, não revelou a presença de alcaloides. A CCD da fração 283, em comparação com amostra padrão dos flavonóides quercetina, rutina e quercitrina, sugeriram a presença de quercitrina.

FLUXOGRAMA 3: Esquema de purificação amostra 283.



3.3.2. Identificação Isoquercetrina:

Análise de espectro de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra ESE 02

(Etanólico):

A fração ESE 02 foi obtida a partir de cromatografia em coluna da fração 283A.1.1, resultante do fracionamento do extrato etanólico das folhas de (Fluxograma 3), e apresentou-se como um sólido (22,8 mg), solúvel em Acetona;

O espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3), forneceu sinais referentes a hidrogênios aromáticos dentre eles um par de dupletos em $\delta 6,39$ e $\delta 6,2$ ($J = 2\text{Hz}$); além de sinais em $\delta 7,84$ ($d, j = 2,1\text{ Hz}$), $\delta 7,58$ ($dd, J = 8,7$ e $2,4\text{Hz}$) e $\delta 6,86$ ($d, J = 8,4\text{ Hz}$) característicos de hidrogênios fenólicos de esqueleto do tipo flavonol. Foram observados sinais adicionais que caracterizam a presença de açúcar ligado ao flavonol com destaque para o deslocamento em $\delta 5,17$ ($1\text{H}, d, J = 7,8\text{Hz}$) característico ao hidrogênio do carbono anomérico ($\text{C}2''$) da glicose (BARROS, 2008; DE DEUS FONSECA *et al.*, 2007).

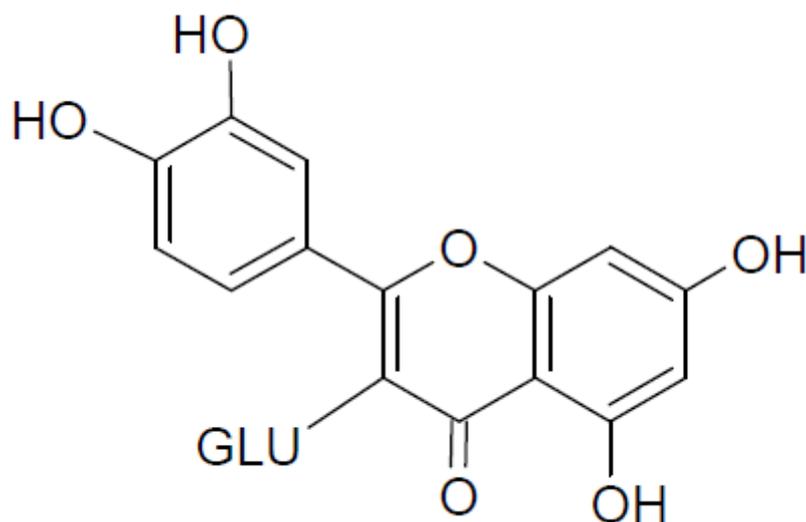
A análise do espectro RMN de ^{13}C (75 MHz, MeOD_4) exibiu 20 sinais majoritários dos quais os deslocamentos em $158,4\ \delta$; $135,7$ e $179,5$ foram atribuídos aos carbonos $\text{C}2$, $\text{C}3$ e $\text{C}4$ do esqueleto flavonol, respectivamente. A presença do açúcar foi reforçada pelos sinais em, $105,3$ referente ao carbono anomérico da glicose e em $104,5$ que caracteriza o carbono $\text{C}6''$ na forma livre ((BARROS, 2008; SILVA, *et al.*, 2005). A comparação dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C com espectros de flavonóis já descritos na literatura (Tabela 10) sugere que ESE02 seja constituído, majoritariamente, pelo glicosilflavonol isoquercitrina.

TABELA 10: Comparação dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra ESE 02 com espectros de flavonóis já descritos na literatura.

C	^1Iso			C	^1Iso		
	ESE0 2 (δ)	Quercitrin a(δ)	^2Iso Quercitri na (δ)		ESE0 2 (δ)	quercitri na (δ)	^2Iso quercitrin a(δ)
2	158,4	157,4	158,5	1''	105,3	103,5	104,5

3	135,7	134,5	135,7	2"	75,0	74,8	75,8
4	179,5	178,4	179,8	3"	77,1	77,2	78,4
5	162,9	162,1	163,1	4"	70,0	70,4	71,3
6	99,8	99,1	100,0	5"	77,1	77,5	78,2
7	166,0	165,5	166,0	6"	61,9	61,6	62,7
8	94,7	93,8	94,8				
9	158,7	158,2	159,1				
10	105,3	104,5	105,8				
1'	122,8	122,1	123,3				
2'	116,1	115,1	116,1				
3'	145,8	149,0	145,9				
4'	149,9	145,0	149,9				
5'	117,7	116,6	117,7				
6'	122,9	122,1	123,2				

FIGURA 6: Estrutura da Isoquercetrina.



3.4. Ensaio Biológico do Extrato Etanólico das folhas de [REDACTED]

3.4.1. Atividade Citotóxica:

3.4.1.1. Avaliação da Atividade alopática:

O extrato etanólico bruto não foi capaz de inibir a germinação de sementes de sementes de *Lactuca sativa*, nas concentrações estudadas.

3.4.1.2. Teste de toxicidade às larvas de *Artemia salina*:

O extrato etanólico bruto não apresentou atividade citotóxica frente as larvas de *Artemia salina*, nas concentrações testadas (1mg/mL, 0,5mg/ml, 0,25mg/mL), quando comparado ao controle.

3.4.2. Atividade antioxidante:

Na avaliação do potencial antioxidante, o extrato etanólico apresentou atividade cerca de 6,3 vezes maior que o BHT, 0,33 que o Ácido Ascórbico e 0,57 que a Quercetina. O potencial antioxidante foi avaliado através das curvas padrões elucidado na metodologia do teste, sendo utilizado no eixo y a média da absorção do referido extrato que foi de 1,029.

3.5. Ensaio Biológico da Fração Aquosa do Extrato Etanólico das folhas de [REDACTED]

3.5.1. Atividade Citotóxica:

3.5.1.1. Avaliação da Atividade alopática:

- Crescimento:

A fração apresentou inibição dose-depedente do crescimento radicular da *Lactuca sativa* quando comparada ao controle, com seguintes TIGR 46% (1mg/mL), 71,3%(2mg/mL), 81,7 % (4 mg/mL) resultados estes elucidados na tabela 11. O crescimento das partes aéreas (epicótilo) quando comparada ao controle foi inibido moderadamente havendo resposta apenas nas concentrações maiores de 2mg/mL e

4mg/mL com as seguintes TIRC: 11,32% (1mg/mL), 24,84% (2mg/mL), 44,65% (4mg/mL) resultados estes elucidados na tabela 12.

TABELA 11: Efeito alelopático do extrato de folhas de [REDACTED] no crescimento radicular (comprimento mm) de sementes de *Lactuca sativa*.

	Concentração do extrato (mg/mL)			
	0	1	2	4
Comprimento (mm)	40,4	21,8	11,6	7,4
TIRC	-	46%	71,3%	81,7%

TABELA 12: Efeito alelopático do extrato de folhas de [REDACTED] no crescimento (comprimento mm) das partes aéreas (epicótilo) de sementes de *Lactuca sativa*.

	Concentração do extrato (mg/mL)			
	0	1	2	4
Comprimento (mm)	31,8	28,2	23,9	17,6
TIRC	-	11,32%	24,84%	44,65%

-Germinação:

A fração aquosa do extrato etanólico das folhas de [REDACTED] não apresentou diferença estatística na germinabilidade da *Lactuca sativa*, com seguintes TIG 14,78% (4 mg/mL), 3,78% (2 mg/mL) e 14,78% (1 mg/mL).

TABELA 13: Germinabilidade (G) e respectiva taxa de inibição da germinabilidade (TIG) de sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao extrato aquoso as fração etanólica de folhas de [REDACTED] com resposta dose-dependente ao final de 5 dias.

Concentração do extrato (mg/mL)			
---------------------------------	--	--	--

	0	1	2	4
G(%)	97,33	82,66	93,33	82,66
TIG	-	14,78% ± 5,13	3,78% ± 2,08	14,78% ± 1,53

3.5.1.2. Teste de toxicidade às larvas de *Artemia salina*:

A fração aquosa do extrato etanólico de [REDACTED] não apresentou toxicidade frente às larvas de *A. salina* com $DL_{50} > 1000$ ppm nas concentrações de 1mg/mL, 0,5mg/mL, 0,25mg/mL.

3.5.2. Atividade antioxidante:

Quanto à atividade antioxidante, o [REDACTED] mostrou resultados significativos para a fração aquosa do extrato etanólico, com potencial antioxidante cerca de 4 vezes (4,18) maior que o BHT e moderadamente em relação ao Ácido Ascórbico (0,2) e Quercetina (0,39). O potencial antioxidante foi avaliado através das curvas padrões elucidado na metodologia do teste, sendo utilizado no eixo y a média da absorção do referido extrato que foi de 0,697.

3.6. Ensaio Biológicos do Extrato Aquoso Bruto das folhas de [REDACTED]

3.6.1. Atividade Citotóxica:

3.6.1.1. Avaliação da Atividade alopática:

- Crescimento:

O extrato aquoso das folhas de [REDACTED] apresentou inibição dose-dependente do crescimento radicular da *Lactuca sativa* com significância nas três concentrações testadas quando comparada ao controle, com as seguintes TIGR: 48,39% (1 mg/mL), 80,08% (2mg/mL), 80,01% (4mg/mL). Não houve inibição do crescimento das partes aéreas da espécie testada sob a ação do extrato aquoso nas concentrações testadas quando comparada ao controle.

-Germinação:

Os grupos tratados com o extrato aquoso não apresentaram diferença estatística sobre a germinação das sementes de *Lactuca sativa* nas concentrações testadas, quando comparados ao controle, com seguintes TIG 8,25% (1 mg/mL), 5,15% (2 mg/mL) e 14,43% (4 mg/mL).

3.6.1.2. Teste de toxicidade às larvas de *Artemia salina*:

O extrato aquoso de [REDACTED] não apresentou toxicidade frente às larvas de *A. salina* nas concentrações de 1mg/mL, 0,5mg/mL, 0,25mg/mL com $DL_{50} > 1000\text{ppm}$.

3.6.2. Atividade antioxidante:

Na avaliação do potencial antioxidante, o extrato aquoso apresentou atividade cerca de 3,7 vezes maior que o BHT, 0,17 que o Ácido Ascórbico e 0,35 que a Quercetina. O potencial antioxidante foi avaliado através das curvas padrões elucidado na metodologia do teste, sendo utilizado no eixo y a média da absorção do referido extrato que foi de 0,613.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO –

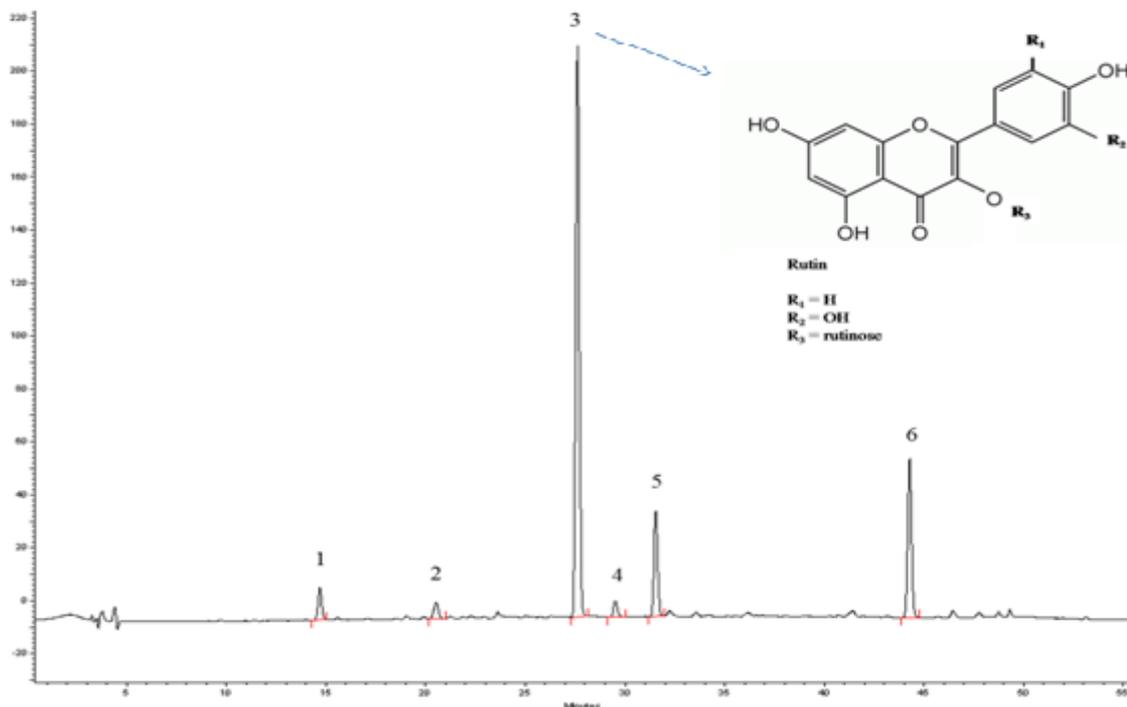
**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE
PARA DETERMINAÇÃO DE RUTINA NO EXTRATO AQUOSO DE**



4.1. Perfil Cromatográfico:

Foi observado frente ao método descrito que a amostra de extrato aquoso de [REDACTED] apresentou seis principais picos de substâncias, sendo possível identificar duas delas, rutina e isoquercetrina, conforme demonstrado na Figura 7.

FIGURA 7: Perfil cromatográfico de [REDACTED] por CLAE.



4.2. Seletividade

A amostra foi exposta às condições de estresse de hidrólise ácida e básica para verificar se o método é capaz de separar impurezas e produtos de degradação do composto referência rutina. A seletividade foi comprovada, com a comparação da média das alterações do tempo de retenção, pureza e área do pico referente à rutina. Os tempos de retenção, área e lambda máximo dos picos nas amostras sobre estresse ácido/básico e amostras não submetidas ao estresse está demonstrado na Tabela 14.

Quando forçada a hidrólise ácida, foi observado que houve degradação da amostra, por apresentar redução no seu teor de rutina e a formação de produtos de

degradação, já que na amostra não submetida a estresse apresentou 6 picos principais e 10 picos com hidrólise ácida.

No meio básico houve maior degradação da amostra, sendo também formados produtos de degradação e redução na área dos picos. O tempo de retenção obtidos nos métodos sobre estresse (ácido/básico) apresentou semelhança, sem relativa interferência, comparado ao extrato sem processo de hidrólise, demonstrando que o método mantém seletivo frente a produtos de degradação.

TABELA 14: Degradação forçada de [REDACTED] por hidrólise ácida (HCl 1N) e básica (NaOH 1N).

Hidrólise	Tempo de retenção	Área	λ_{max} .
Básica			
Pico 6	43,84 ± 0,017	860.735±84.717,09	256, 353
Pico 9	48,29 ± 0,010	101.070,30±1.188,11	256, 350
Pico 10	48,88± 0,009	92.435±890,95	266, 343
Ácida			
Pico 3 (Rutina)	27,04±0,03	342.472,70±33.634,17	256, 354
Pico 5	30,98±0,03	120.232,30±10.562,94	266, 349
Pico 6	40,73±0,03	264.790,30±41.115,32	256, 382
Pico 7	43,81±0,02	12.719.920±101.284,65	255, 354
Pico 8	45,85±0,02	132.322,30±28.610,28	372, 366
Pico 9	48,28±0,02	125.575±11.110,85	255, 354
Pico 10	48,86±0,01	106.033,70±8.311,92	267, 349
Extrato^a			
Pico 1	14,10±0,010	629.912±20.581,58	285, 324
Pico 2	19,99±0,004	384.798±13.040,65	279, 312
Pico 3 (Rutina)	27,06±0,004	11.401.223±368.755,20	255, 353

Pico 4	28,94±0,004	381.710,7±12.334,10	271, 351
Pico 5	30,99±0,001	2.059.206±66.230,43	266, 346
Pico 6	43,82±0,004	3.475.705±104.211,10	255, 353

Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos.

^aExtrato sem processo de hidrólise.

4.3. Linearidade

A partir das absorbâncias médias obtidas na faixa de concentração estudada (7,80-1000,00 µg/mL) a equação da reta foi calculada e o coeficiente de correlação (r) foi determinado utilizando o programa GraphPadPrism[®].

O coeficiente de correlação encontrado (r), o intercepta, a inclinação e desvio padrão relativo são demonstrados na Tabela 15. Segundo a RE nº 899, de 29 de maio de 2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação deve ser de (0,99), sendo obtido um valor médio de 0,9997 no experimento (Tabela 15). A curva obtida demonstrou que os resultados da metodologia analítica são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. A Figura 8 representa a curva de regressão linear obtida.

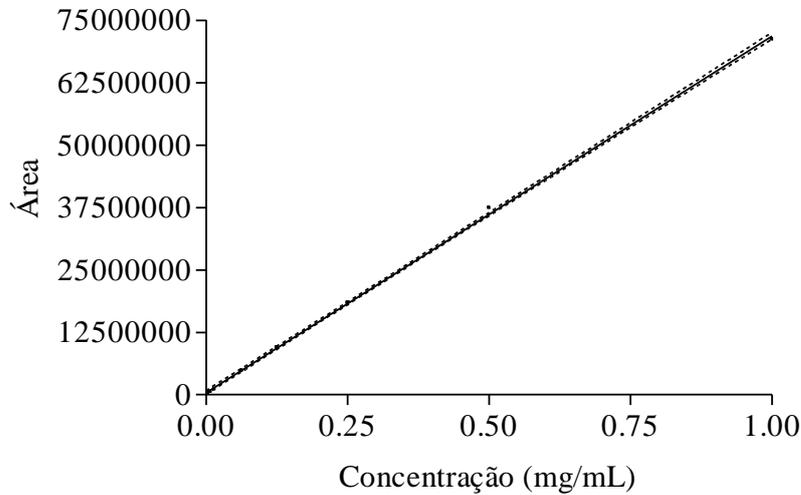
TABELA 15: Linearidade de rotina na análise do método por CLAE.

	Concentração (µg/mL)	Inclinação	Intercepta	R
Rutina	7,80-1.000,00	71.400.000 ± 409.200	423.500 ± 178.500	0,9997

Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos.

r – coeficiente de correlação.

FIGURA 8: Curva de regressão linear obtida para rutina frente ao método proposto, com os dados disponíveis na tabela 15.



4.4. Precisão

Na repetibilidade avaliada a partir da análise de 6 determinações de igual concentração (5mg/mL), o desvio padrão relativo médio encontrado foi de 3,02%. Na análise inter-dia foi encontrado uma variação de 2,85% (Tabela 16), sendo estes resultados indicativos de boa precisão já que a literatura não admite valores superiores a 5%.

TABELA 16: Precisão do método para quantificação de rutina em [REDACTED]

	Área do pico	RSD (%)
Repetibilidade^a	11.540.512,17±348.000	3,02%
Precisão inter-dia^b	11.807.824,50±336.300	2,85%

Os resultados representam a media ± desvio padrão.

^a Seis replicatas foram analisadas no mesmo dia.

^b Três triplicatas foram analisadas em três dias diferentes.

4.5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção e limite de quantificação encontrado para rutina frente ao método proposto foi de 0,19 e 0,60 µg/mL, respectivamente. Os parâmetros de cálculos são apresentados na Tabela 17.

TABELA 17: Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) do método proposto.

	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Inclinação (Slope)	Devio do y- intercepta	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
Rutina	1,9 – 15,0 $\mu\text{g/mL}$	73.350.000	4419	0,19	0,60

4.6. Exatidão

A exatidão do método proposto para a concentração teórica de rutina de 0,12, 0,15 e 0,18 mg/mL foi de 99,17%, 98,00% e 99,45%, respectivamente (Tabela 18).

TABELA 18: Exatidão do método por CLAE.

	Rutina adicionada (mg/mL)	Rutina encontrada (mg/mL)	Recuperação (%)
A	0,12 (mg/mL)	0,119 \pm 0,0024	99,17 \pm 2,11
B	0,15 (mg/mL)	0,147 \pm 0,0014	98,00 \pm 0,98
C	0,18 (mg/mL)	0,179 \pm 0,0002	99,45 \pm 0,13

A – Concentração baixa (80%), B- Concentração intermediária (100%), C- Alta concentração (120%). Os resultados são a média e desvio padrão de 3 testes.

4.7. Robustez

A variação dos parâmetros comprimento de onda e temperatura (Tabelas 19-20) não alterou significativamente os valores de área e tempo de retenção de uma solução de extrato aquoso de XXXXXXXXXX preparada de forma normal. Demonstrando através dos resultados abaixo que o método é robusto.

TABELA 19: Resultados da variação de comprimento de onda no ensaio de robustez.

Comprimento de onda	Área	Tempo de retenção
344 nm	10.338.804±25.872,270	27,21333±0,011
354 nm	10.719.677±8.100,615	27,21333±0,011
364 nm	9.716.180±27.168,910	27,21±0,010

TABELA 20: Resultados da variação de temperatura no ensaio de robustez.

Temperatura	Área	Tempo de retenção
23°C	10.786.111±11.619,02	27,56667±0,011
25°C	10.737.803±31.913,98	27,21333±0,011
27°C	10.758.930±11.036,63	26,85567±0,015

No que diz respeito à variação do parâmetro fluxo (Tabela 21) notou-se importantes alterações da área e tempo de retenção. Resultados abaixo. Observa-se que a velocidade de fluxo é um parâmetro importante a ser bem acompanhado, pois o mesmo tem grande influência na separação das substâncias e pureza dos picos.

TABELA 21: Resultados da variação de fluxo no ensaio de robustez.

Fluxo	Área	Tempo de retenção
0,4	12.636.885±552.967,20	32,92433±0,233
0,6	10.737.803±31.913,98	27,21333±0,011
0,8	6.169.859±27.273,99	23,82667±0,006

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

Análise fitoanalítica da planta [REDACTED] endêmica do Distrito Federal.

O extrato hexânico de folhas de [REDACTED] apresentou baixa toxicidade utilizando como modelo larvas de *Artemia salina*, pelo qual amostras que apresentam $DL_{50} > 1000\text{ppm}$ são consideradas inativas. Esse resultado foi corroborado por aqueles apresentados no teste de germinação de sementes de *L. sativa*. Até onde vai nosso conhecimento, é a primeira vez que a presença de lupeol é relatada para essa espécie. Lupeol é um triterpeno que apresenta diversas atividades biológicas, tais como atividades anti-tumorais, antioxidantes e liberadores de mediadores da resposta imunológica. Atividade sobre a proliferação de queratinócitos na pele, atividades nefro-protetoras tanto na exposição crônica ao cádmio, quanto na redução da excreção de oxalato em determinadas patologias e que causaria danos no túbulo renal também são efeitos farmacológicos deste composto (NOLDIN, et al, 2003).

O extrato etanólico de folhas de [REDACTED] apresentou baixa toxicidade utilizando como modelo larvas de *Artemia salina*, pelo qual amostras que apresentam $DL_{50} > 1000\text{ppm}$ são consideradas inativas. Esse resultado foi corroborado por aqueles apresentados no teste de germinação de sementes de *L. sativa*, também utilizado como modelo para atividade citotóxica. Até onde vai nosso conhecimento, é a primeira vez que a presença de glicosilflavonol isoquercitrina é relatada para essa espécie. Isoquercitrina é um flavonoide que apresenta diversas atividades biológicas, tais como antimicrobiana e antioxidante (CONDESSA, 2011). Na avaliação do potencial antioxidante, o extrato etanólico apresentou alta atividade cerca de 6,3 vezes maior que o BHT, 0,33 que o Ácido Ascórbico e 0,57 que a Quercetina o que reforça o potencial do composto isoquercitrina no extrato.

A fração aquosa do extrato etanólico das folhas de [REDACTED] não apresentou toxicidade *in vitro* frente às larvas de *Artemia salina*, pelo qual amostras que apresentam $DL_{50} > 1000\text{ppm}$ são consideradas inativas corroborando estudo feito com o extrato etanólico bruto que deu origem a fração objeto deste estudo. Em relação à atividade alelopática a fração hidrometanólica apresentou baixa toxicidade no modelo de germinação de sementes de *Lactuca sativa*, já em relação ao crescimento radicular a fração apresentou inibição dose-dependente e o crescimento

das partes aéreas foi inibido moderadamente. No modelo de redução do complexo de fosfomolibdênio a fração hidrometanólica mostrou considerável potencial antioxidante quando comparada ao BHT. Estes resultados podem estar relacionados à presença de compostos fenólicos indicados pela análise farmacognóstica.

O extrato aquoso de folhas de [REDACTED] apresentou baixa toxicidade no modelo utilizando larvas de *Artemia salina*, pelo qual amostras que apresentam $DL_{50} > 1000$ ppm são consideradas inativas. Esse resultado foi corroborado por aqueles apresentados no teste de germinação (utilizado também como modelo para atividade citotóxica) e crescimento das partes aéreas de sementes de *L. sativa*, ocorrendo inibição dose-dependente apenas do crescimento radicular. Ainda sobre testes biológicos, o extrato apresentou significativa atividade antioxidante pelo modelo de redução do complexo de fosfomolibdênio quando comparado ao BHT. Estes resultados podem estar relacionados à presença de compostos fenólicos indicados pela análise farmacognóstica.

O presente trabalho conseguiu mostrar o desenvolvimento de uma rápida e confiável técnica de CLAE para determinação do flavonoide rutina no extrato aquoso de folhas de [REDACTED]. Sendo assim, validado de acordo com todos os parâmetros determinados tanto nacionalmente quanto internacionalmente.

A linearidade foi excelente por ultrapassar o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação de (0,99) proposto pela RE nº 899, de 29 de maio de 2003. No que diz respeito à precisão, o método conseguiu demonstrar excelente proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla, em CLAE, de uma mesma amostra, sendo obtidos valores bem inferiores ao admitido de 5% pela RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

Além disso, o método foi exato e robusto, sendo informado corretamente seu limite de detecção e quantificação. Sabendo-se, ainda, neste trabalho, que a rutina, foi detectada a partir de um produto natural (mistura de substâncias) e não de uma amostra isolada, reforça-se a ideia que os resultados do método (abaixo dos determinados pelos guias utilizados para essa validação) foram bastante significativos nos parâmetros analisados.

A quantidade de espécies medicinais do Cerrado registradas com substâncias ativas para fabricação de medicamentos fitoterápicos, representando menos de 1% do total de espécies do bioma e, aproximadamente, 7% das espécies já utilizadas na

medicina popular. Tais números afirmam a intensa necessidade de realização de estudos etnobotânicos das plantas nativas do Cerrado e estímulos para implantação de laboratórios que as utilizem economicamente (RODRIGUES & BARBOSA, 2012).

O desenvolvimento desenvolvido a partir da visão moderna dos sistemas nacionais de inovação, desenvolvimento local e, no caso, a partir de cada bioma, representa uma alternativa concreta e viável para chegarmos a novos produtos, novas metodologias, realizando em termos globais a vantagem competitiva dos nossos recursos naturais, promovendo um grande salto tecnológico na produção de medicamentos, quebrando o ciclo vicioso de competirmos com o mundo realizando os mesmos paradigmas de desenvolvimento tecnológico de medicamentos desenvolvido em países com biodiversidade que não se compara à brasileira (Bôas & Gadelha, 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

1. AGUIAR, L.C.G.G.; BARROS, R.F.M., *Plantas medicinais cultivadas em quintais de comunidades rurais no domínio do cerrado piauiense (Município de Demerval Lobão, Piauí, Brasil)*. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.3, p.419-434, **2012**.
2. BARREIROS, M. L.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; LOPES, L. M. X.; SÁ, M. S.; COSTA, J. F. O.; ALMEIDA, M. Z.; QUEIRÓZR, L.P.; SANT'ANA, A. E. G., *Ryanodane diterpenes from two [REDACTED]* Rev. Phytochemistry, v. 68, p. 1735-1739, **2007**.
3. BARROS, I. M. C.; *Contribuição ao Estudo Químico e Biológico de Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae)*. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília 194p., Brasília, DF, **2008**.
4. BÔAS, G.K.V.; GADELHA, C.A.G., *Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional*. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 23(6):1463-1471, **2007**.
5. BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G; *Germinação, do básico ao aplicado*. Ed Artmed. PortoAlegre, RS, **2005**.
6. BRASIL, *Portaria n.º 212, de 11 de setembro de 1981*. Define o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação em saúde. Diário Oficial da União, Brasília, setembro, **1981**.
7. BRASIL, RE nº 899, de 29 de maio de 2003; *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, **2003**.
8. BRASIL, RDC Nº. 48, de 16 de Março de 2004; normatização do registro de medicamentos fitoterápicos, **2004**.
9. BRASIL, *Resolução CIPLAN n.º 08, de 08 de março de 1988*. Implanta a prática da fitoterapia nos serviços de saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, março, **1988**.
10. CONDESSA, M. B; *Avaliação da atividade antioxidante e alelopática de plantas medicinais*. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília, Brasília, DF, **2011**.
11. DE DEUS FONSECA, A. P. N.; DE FÁTIMA SILVA, G. D.; DE JESUS CARVALHO, J.; SALAZAR, G.; DUARTE, L. P.; SILVA, R. P.; JORGE, R. M.;

TAGLIATI, C. A.; ZANI, C. L.; DE ALMEIDA ALVES, T. M. *Estudo fitoquímico do decocto das folhas de MaytenustruncataReissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto*. Rev. Quím. Nova, v. 30, n. 4, **2007**.

12. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, *Decreto Nº 5.813, de 22 de Junho de 2006; Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*, junho, **2006**.

13. GONZÁLEZ-GARCÍA, K.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; GONZÁLEZ-GUEVARA, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S., *Género [REDACTED] Análisis de La Información Científica*. Rev. Acta Farm. Bonaerense. 24 (2): 284-90, **2005**.

14. GONZALEZ-GUEVARA, J. L.; VÉLEZ-CASTRO, H.; GONZÁLEZ-GARCÍA, K. L.; PAYO-HILL, A. L., GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; MOLINA-TORRES, J.; PIETRO-GONZÁLEZ, S., *Flavonoid glycosides from Cuban [REDACTED] species*. Rev. Biochemical Systematics and Ecological, v. 34, p. 539-542, **2006**.

15. GONZÁLEZ-LAVAUT J.A.; GARCÍA, G. N.; GORDO Á. O. & VÉLEZ-CASTRO H., *Una Entidad Química Aislada de [REDACTED] Britton: Palmitato de β -Amirina*. Rev. Lat. Am. J. Pharm.27 (1): 85-8, **2008**.

16. HASENCLEVER, L., *Diagnóstico dos desafios e oportunidades no mercado de Plantas Medicinais e Fitoterápicos brasileiro*. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - CGEE. Ciência, Tecnologia e Inovação. Resumo Executivo, **2009**.

17. HEGNAUER, R., *Chemotaxonomy of [REDACTED] (including some ethnobotanical notes on old world species)*. Journal of Ethnopharmacology, v.3, n.2-3, p.279-292, march./may., **1981**.

18. International Conference on Harmonization (ICH), *ICH Harmonized tripartite guideline, Topic Q2B; Note for guidelines on Validation of Analytical Procedures: Methodology*, **1996**.

19. MEYER, B.; FERRIGNI, N. R.; PUTMAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHEIN, J. L.; *Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents*, Plantamédica, 45:31-34, **1982**.

20. NASCIMENTO, C. J.; VIOLANTE, I. M. P.; GARCEZ, W. S.; POTT, A.; GARCEZ, F. R., *Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from [REDACTED]* Phytochemistry Letters, v. 5, 401-406, **2012**.

21. NOLDIN, V. F.; FILHO, V. C.; MONACHE, F. D.; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A., *Composição Química e Atividades Biológicas das Folhas de **Cynara scolymus** L. (Alcachofra) Cultivada no Brasil*. Química Nova, Vol. 26, nº 3, 331-334, **2003**.
22. OLIVEIRA, A.B.; LONGHI, J.G.; ANDRADE, C.A.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D., *A normatização dos fitoterápicos no Brasil*. Rev. Visão acadêmica, vol. 7, nº2, **2006**.
23. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA (UNESCO); *Culture and Health: Orientation Texts: World Decade for Cultural Development 1988-1997*. Document CLT/DEC/PRO. Paris, 129 p, **1996**.
24. PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K., *Flavonoids as medicinal agents: recent advances*. Fitoterapia, Amsterdam, v. 57, n. 5, p. 371-389, 1991.
25. PEDRIALI, C. A., *Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes*. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, **2005**.
26. PLOWMAN, T., *The Identification of [REDACTED]* Rev. Bot. J. Linn. Soc. 84, 329-353, **1982**.
27. PRIETO, P.; PINEDA, M.; ANGUILAR, M., *Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin*. Rev. Anal Biochem, 269(2): 337-41, **1999**.
28. RODRIGUES, W.; BARBOSA, G. F., *Plantas Medicinais: Uma Alternativa Econômica para Conservação do Cerrado Brasileiro?* Informe Gepec, Toledo, v. 16, nº 1, p. 160-175, **2012**.
29. SANTOS, C. C.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R., *Micromolecular secondary [REDACTED]* Biochemical Systematics and Ecology, v.31, p.661-664, **2003**.
30. SILVA, D. A.; COSTA, D. A.; SILVA, D. F.; SOUZA, M. F. V.; AGRA, M. F.; MEDEIROS, I. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R.; *Flavonóides glicosilados de Herissantia tubae (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e testes*

farmacológicos preliminares do canferol 3, 7-di-O-a-L-ramnopiranosídeo. Rev. bras. Farmacognosia, v. 15, n. 1, **2005**.

31. SOMAVILLA, N.S., *Utilização de plantas medicinais por uma comunidade garimpeira do sudoeste mato-grossense*. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, **1998**.

32. VIOLANTE, I. M. P., *Avaliação do Potencial Antimicrobiano e Citotóxico de Espécies Vegetais do Cerrado da Região Centro-Oeste*. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, **2008**.

33. WAGNER, H.; BLADT, S., *Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas*. Berlim: Springer, 2: 384, **1996**.

34. ZUANAZZI, J. A.; TREMEA, V.; LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T., *Alkaloids of [REDACTED] species from Southern Brazil*. Biochemical, Systematics and Ecology, v. 29, p.819-825, **2001**.