



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ALEXANDRE AUGUSTO BORGHI

INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE SECAGEM SOBRE O PERFIL QUÍMICO DOS
EXTRATOS DE MIKANIA LAEVIGATA E MIKANIA GLOMERATA, CARACTERIZAÇÃO
QUÍMICA, FRACIONAMENTO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
EXTRATOS ATRAVÉS DE ESTUDOS *IN VITRO*.

INFLUENCE OF THE DRYING PROCESS ON THE CHEMICAL PROFILE OF THE
EXTRACTS OF *MIKANIA LAEVIGATA* AND *MIKANIA GLOMERATA*, CHEMICAL
CHARACTERIZATION, FRACTIONATION AND EVALUATION OF THE EXTRACT
BIOLOGICAL ACTIVITIES THROUGH *IN VITRO* STUDIES.

CAMPINAS - SP

2019

ALEXANDRE AUGUSTO BORGHI

INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE SECAGEM SOBRE O PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DE *MIKANIA LAEVIGATA* E *MIKANIA GLOMERATA*, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, FRACIONAMENTO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS ATRAVÉS DE ESTUDOS *IN VITRO*.

INFLUENCE OF THE DRYING PROCESS ON THE CHEMICAL PROFILE OF THE EXTRACTS OF *MIKANIA LAEVIGATA* AND *MIKANIA GLOMERATA*, CHEMICAL CHARACTERIZATION, FRACTIONATION AND EVALUATION OF THE EXTRACT BIOLOGICAL ACTIVITIES THROUGH *IN VITRO* STUDIES.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Doutor em Ciências, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde.

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in the area of Drugs, Medicines and Supplies for Health.

Supervisor / Orientador (a): Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO ALEXANDRE AUGUSTO BORGHI, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ALEXANDRA CHRISTINE HELENA FRANKLAND SAWAYA.

CAMPINAS - SP
2019

Agencia de fomento: CAPES
Nº processo:0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B644i Borghi, Alexandre Augusto, 1980-
Influência do processo de secagem sobre o perfil químico dos extratos de *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata*, caracterização química, fracionamento e avaliação das atividades biológicas dos extratos através de estudos *in vitro* / Alexandre Augusto Borghi. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Mikania glomerata*. 2. *Mikania laevigata*. 3. Cromatografia contracorrente. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Sawaya, Alexandra Christine Helena Frankland, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of the drying process on the chemical profile of the extracts of *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*, chemical characterization, fractionation and evaluation of the extract biological activities through *in vitro* studies

Palavras-chave em inglês:

Mikania glomerata

Mikania laevigata

Countercurrent chromatography

High performance liquid chromatography

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Doutor em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Banca examinadora:

Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya [Orientador]

Paulo César Pires Rosa

José Luiz da Costa

Marcia Ortiz Mayo Marques

Patrícia de Oliveira Carvalho

Data de defesa: 25-02-2019

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7710-0080>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5664129630454346>

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Prof. Dr. Paulo César Pires Rosa

Prof. Dr. José Luiz da Costa

Profa. Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques

Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya, responsável pelo Laboratório de Metabolômica e Espectrometria de Massas – LabMetaMass, orientadora deste trabalho e amiga, que me ajudou muito na realização deste estudo e no meu crescimento profissional e intelectual.

Ao Departamento de Fisiologia Vegetal - Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo uso das instalações e infraestrutura para realização deste trabalho de pesquisa.

Ao Laboratório Central de Pesquisa pré-clínicas no Centro Integrado de Pesquisa Onco-hematológicas da infância e ao professor Dr. Gilberto Franchi, pelas análises com células neoplásicas.

Ao Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC) e ao professor Dr. Marcelo Lancellotti pelas análises antimicrobianas.

Ao professor Dr. Marcelo Menossi pelo uso do equipamento de leitura de microplacas para as análises antioxidantes.

À Profa. Dra. Stella Regina Zamuner responsável pelo Laboratório de Ciências da Reabilitação - Medicina, da Faculdade Nove de Julho, que permitiu a avaliação da citotoxicidade dos extratos.

À Profa. Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira, do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), pela realização dos testes da atividade de citotoxicidade e de ativação do PPAR- γ .

Aos professores Dra. Svetlana Ignatova e Dr. Peter Hewitson, pela orientação e amizade durante o período de Doutorado Sanduiche na Universidade de Brunel - Inglaterra, sempre com muita paciência.

Aos colegas de grupo, Claudia, Begoña, Vanessas, Elisa, Maria Isabel, Guilherme, Mariana. E em especial à colega de laboratório e amiga doutoranda Mara Junqueira Carneiro, pelo trabalho em conjunto tanto nas análises experimentais e quanto no desenvolvimento do trabalho.

Aos grandes amigos que fiz durante os minha trajetória na Pós-Graduação, que me ajudaram durante esta longa trajetória seja durante um café ou numa

conversa, Eduardo, Pedro, Luciano, Viktor, Franklin, Rafaela, Simone, Uiara, Vanessa, Vinicius e à todos os amigos que não foram citados, mas que cada um sabe o quanto contribuiu para o meu crescimento como pessoa e profissional.

À minha família, minha mãe Teresa Rafacho Borghi, minha avó Hilda Clara Rafacho, minhas irmãs Karen Elisa Borghi Guerra e Ana Claudia Borghi, meu cunhado Rodrigo de Jesus Guerra e ao meu sobrinho Matheus Borghi Guerra, por estarem comigo em todos os momentos da minha vida e por me darem suporte para ser quem sou hoje.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar como os métodos de secagem das folhas de *Mikania glomerata* Spreng. e *Mikania laevigata* Schultz influenciam no perfil de constituintes presentes nos extratos obtidos, avaliar a composição e atividade biológica de extratos hidroetanólicos e aquosos de ambas as espécies e obtenção de frações enriquecidas através de Cromatografia de Contra Corrente. Os processos de secagem avaliados foram secagem em estufa e secagem à sombra em temperatura ambiente. Todos os extratos obtidos foram analisados quanto à sua composição por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (UHPLC-MS) para obter seu perfil químico. Os extratos foram avaliados quanto a sua citotoxicidade por: avaliação do efeito sobre células musculares e epiteliais de epiderme e de brônquios; avaliação do efeito sobre células tumorais; transativação por gene repórter; ensaio antidesnaturação em albumina sérica bovina. Sua atividade antioxidante foi avaliada por 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e por ORAC_{FL}. E Atividade antimicrobiana foi avaliada por placa de ágar perfurado. Estes mesmos extratos foram submetidos ao processo de fracionamento por Cromatografia de Contra Corrente para a obtenção de frações enriquecidas e suas composições foram analisadas em corrida similar ao que os extratos originais foram submetidos em UHPLC-MS. Através dos resultados obtidos nesta tese, é nítida a impossibilidade que estas espécies sejam intercambiáveis para a produção de fármacos como é usualmente discutido, sendo as vias de ação em que cada espécie atua diretamente associada a sua composição. Os testes de citotoxicidade apontam que não há prejuízo para as células locais em concentração até 112,5 µg/mL e com o benefício de estimulação da proliferação celular, indicando potencial cicatrizante. A atividade antioxidante está relacionada ao tipo de extrato, principalmente à concentração de ácidos cafeoilquínicos e compostos fenólicos presentes. A maioria das cepas bacterianas estudadas foram inibidas em concentração dos extratos de até 5 mg/mL. Quando submetidos aos testes de secagem, o tecido vegetal apresentou-se mais próximo a composição original após a secagem em estufa, possivelmente devido a inativação de enzimas e micro-organismos responsáveis pela degradação. A obtenção de frações enriquecidas através da Cromatografia de Contra Corrente demonstrou que, apesar da complexidade dos extratos, este método é reprodutível quanto a obtenção de compostos, mesmo em concentração extremamente baixa no extrato original, robusta quanto ao aumento de escala e de baixa perda quando realizado o balanço de massas ao final do processo, menor que 17%.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate how the drying methods of leaves of *Mikania glomerata* Spreng. and *Mikania laevigata* Schultz influence on the profile of constituents present in their extracts, to evaluate the composition and biological activity of hydroethanolic and aqueous extracts of both species and obtaining enriched fractions by Counter Current Chromatography. The drying processes evaluated were oven drying and shade drying at room temperature. All extracts were analyzed for their composition by Ultra High Efficiency Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (UHPLC-MS) to obtain their chemical profile. The extracts were evaluated for their cytotoxicity by: evaluation of the effect on muscle and epithelial cells of the epidermis and bronchi; evaluation of the effect on tumor cells; transactivation by gene reporter; immunoassay in bovine serum albumin. Their antioxidant activity was evaluated by 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazila (DPPH) and by ORAC_{FL}. Antimicrobial activity was evaluated by perforated agar plate. These same extracts were subjected to the fractionation process by Counter Current Chromatography to obtain enriched fractions and their composition was analyzed in a similar run as the original extracts were submitted to UHPLC-MS. Through the results obtained in this thesis, it is clearly impossible for these species to be interchangeable for the production of drugs as is usually discussed, as the pathways of action in which each species acts directly associated with its composition. Cytotoxicity tests indicate that there is no damage to cells in concentrations up to 112.5 µg / mL and with the benefit of stimulation of cell proliferation, indicating potential healing. The antioxidant activity is related to the type of extract, mainly to the concentration of caffeoylquinic acids and phenolic compounds present. Most of the bacterial strains studied were inhibited at concentrations of extracts up to 5 mg / mL. When submitted to the drying tests, the plant tissue presented composition closer to the original composition than after drying in the greenhouse, possibly due to the inactivation of enzymes and microorganisms responsible for the degradation. The obtainment of enriched fractions through Counter Current Chromatography showed that, despite the complexity of the extracts, this method is reproducible in obtaining compounds, even when they are in extremely low concentration in the original extract, robust for scaling up and presented low loss when performed the mass balance at the end of the process, less than 17%.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Metabólitos da rota do isopreno. Onde: fpps = Farnesil difosfato sintase; ggs_{1/2} = Geranylgeranyl difosfato sintase; P450= Citocromo P450 monooxigenase ; GA₃ = Giberelina e GA₁₂ = aldeído giberélico (Adaptado: Trindade, 2012)..... 21

Figura 2 – Metabólitos da rota do ácido chiquímico Onde: PAL = fenilalanina amônio-liase; C4'H = trans-cinamato-4-hidroxilase; EPSP = 5- enolpiruvil-3-fosfochiquimato sintase; 4CL = 4-hidroxicinamoil-CoA ligase; HCT = hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato hidroxicinamoil transferase; HQT = hidroxicinamoil-CoA quinato hidroxicinamoil transferase; C3'H = p-coumaroil ester 3'-hidroxilase. (Adaptado: Souza, 2005; Comino *et al.*, 2009; Czelusniak, K. *et al.*, 2012). 22

FIGURAS CAPITULO 1

Figura 3 – Reação de captura do DPPH (Adaptado: Alves *et al.*, 2010) 29

Figura 4 – Quadro de diluição amostras para análise por BSA..... 36

Figura 5 – Gráfico de correlação entre a concentração de cumarina e a área dos picos para íon selecionado MS + *m/z* 147 para extratos de *M. laevigata*. 40

Figura 6 – Gráfico de correlação entre a concentração de cumarina e a área dos picos para íon selecionado MS+ *m/z* 147 para extratos de *M. glomerata*..... 40

Figura 7 – Gráfico de correlação entre a concentração de umbeliferona e a área dos picos para íon selecionado MS+ *m/z* 163 para extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*. 41

Figura 8 – Gráfico de correlação entre a concentração de ácido o-cumárico e a área dos picos para íon selecionado MS- *m/z* 163 para extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*..... 41

Figura 9 – Gráfico de correlação entre a concentração de ácido p-cumárico e a área dos picos para íon selecionado MS- *m/z* 163 para extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*..... 41

Figura 10 – Gráfico de correlação entre a concentração de ácido grandiflórico e a área dos picos para íon selecionado MS- *m/z* 317 para extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*. 42

Figura 11 – Gráfico de correlação entre a concentração de ácido clorogênico e a área dos picos para íon selecionado MS- *m/z* 353 para extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*. 42

Figura 12 – Gráfico de influência da matriz sobre a concentração de cumarina em curva de calibração elaborada em ♦ H₂O e ■ extrato de *M. glomerata* com cumarina abaixo do limite de quantificação..... 42

Figura 13 – Cromatogramas UHPLC – MS obtido para extrato de *M. glomerata*, onde: (A e B) Extração Hidroetanólica; (C e D) Extração aquosa; (A e C) ESI+ e (B e D) ESI-. 44

Figura 14 – Cromatogramas UHPLC – MS obtido para extrato de *M. laevigata*, onde: (A e B) Extração Hidroetanólica; (C e D) Extração aquosa; (A e C) ESI+ e (B e D) ESI-. 44

Figura 15 – Comparação do perfil dos cromatogramas obtidos para padrão de cumarina ($C_{\text{Cumarina}} = 100 \mu\text{g/mL}$) (A) Cromatogramas UHPLC – MS; (B) Cromatograma UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 147$, ES+, tR 4,0 – 5,2 min em mistura de padrões (cumarina, ácido o-cumárico, ácido p-cumárico, umbeliferona, ácido caurenóico e ácido clorogênico; Conc. 100 $\mu\text{g/mL}$ cada); (C) Espectro UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 147$ tR 4,88 min, fragmento principal $m/z = 91$; com os espectros UHPLC – MS/MS obtidos para o extrato hidroetanólico de amostras frescas de (D) *M. glomerata* e (E) *M. laevigata*. 45

Figura 16 – Comparação do perfil dos cromatogramas obtidos para padrão de ácido clorogênico ($C_{\text{Ác. Clorogênico}} = 100 \mu\text{g/mL}$) (A) Cromatogramas UHPLC – MS; (B) Cromatograma UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 353$, ES-, tR 1,2 – 2,2 min em mistura de padrões (cumarina, ácido o-cumárico, ácido p-cumárico, umbeliferona, ácido caurenóico e ácido clorogênico; Conc. 100 $\mu\text{g/mL}$ cada); (C) Espectro UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 353$ tR 1,83 min, fragmento principal $m/z = 191$; com os espectros UHPLC – MS/MS obtidos para o extrato hidroetanólico de amostras frescas de (D) *M. glomerata* e (E) *M. laevigata*. 46

Figura 17 – Comparação do perfil dos cromatogramas obtidos para padrão de umbeliferona ($C_{\text{Umbeliferona}} = 100 \mu\text{g/mL}$) (A) Cromatogramas UHPLC – MS; (B) Cromatograma UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 163$, ES+, tR 3,0 – 4,0 min em mistura de padrões (cumarina, ácido o-cumárico, ácido p-cumárico, umbeliferona, ácido caurenóico e ácido clorogênico; Conc. 100 $\mu\text{g/mL}$ cada); (C) Espectro UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 163$ tR 3,41 min, fragmento principal $m/z = 107$, (Extratos >LD). 47

Figura 18 – Comparação do perfil dos cromatogramas obtidos para padrão de ácido p-cumárico ($C_{\text{Ác. p-cumárico}} = 100 \mu\text{g/mL}$) (A) Cromatogramas UHPLC – MS; (B) Cromatograma UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 163$, ES-, tR 2,9 – 3,5 min em mistura de padrões (cumarina, ácido o-cumárico, ácido p-cumárico, umbeliferona, ácido caurenóico e ácido clorogênico; Conc. 100 $\mu\text{g/mL}$ cada); (C) Espectro UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 163$ tR 3,18 min, fragmento principal $m/z = 119$, (Extratos >LD). 47

Figura 19 – Comparação do perfil dos cromatogramas obtidos para padrão de ácido o-cumárico ($C_{\text{Ác. o-cumárico}} = 100 \mu\text{g/mL}$) (A) Cromatogramas UHPLC – MS; (B) Cromatograma UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 163$, ES-, tR 4,0 – 5,0 min em mistura de padrões (cumarina, ácido o-cumárico, ácido p-cumárico, umbeliferona, ácido caurenóico e ácido clorogênico; Conc. 100 $\mu\text{g/mL}$ cada); (C) Espectro UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 163$ tR 4,56 min, fragmento principal $m/z = 119$ 48

Figura 20 – Comparação do perfil dos cromatogramas obtidos para padrão de ácido caurenóico ($C_{\text{Ác. caurenóico}} = 100 \mu\text{g/mL}$) Cromatogramas UHPLC – MS; íon selecionado, $m/z = 301$, ES-, tR 8,0 – 9,5 min em mistura de padrões (cumarina, ácido o-cumárico, ácido p-cumárico, umbeliferona, ácido caurenóico e ácido clorogênico; Conc. 100 $\mu\text{g/mL}$ cada), não há fragmentação. 48

Figura 21 – Comparação do perfil dos cromatogramas obtidos para padrão de ácido grandiflórico ($C_{\text{Ác. grandiflórico}} = 74 \mu\text{g/mL}$) (A) Cromatogramas UHPLC – MS; (B) Cromatograma UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 301$, ES-, tR 6,0 – 8,0 min; (C) Espectro UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 317$ tR 7,01 min, não há fragmentação; com os espectros UHPLC – MS/MS obtidos para o extrato hidroetanólico de amostras frescas de (D) *M. glomerata* e (E) *M. laevigata*. 49

Figura 22 – Gráfico de relação concentração do extrato <i>versus</i> viabilidade celular, onde: (a) C2C12 - mioblasto muscular; (b) Tend – endotélio tímico; (c) BEAS - epitélio brônquico. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$	52
Figura 23 – Gráfico de atividade sobre células tumorais.	53
Figura 24 – Gráficos pré-teste para obtenção da concentração de ativação do PPAR- γ	54
Figura 25 – Gráficos de ativação do PPAR- γ	55
Figura 26 – Gráfico de inibição da desnaturação de albumina a 60 °C, onde: ■ Diclofenaco (padrão positivo); ■ <i>M. glomerata</i> et.; ■ <i>M. glomerata</i> aq.; ■ <i>M. laevigata</i> et.; ■ <i>M. laevigata</i> aq.	56

FIGURAS CAPITULO 2

Figura 27 – Fluxograma experimental sobre a influência do processo de secagem sobre o extrato hidroetanólico de <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i>	64
Figura 28 – Gráfico de perda por volatilização em secagem por ventilação forçada em estufa a 40 °C, comparativo de volatilização em cada tempo entre as espécies, ■ <i>M. laevigata</i> ■ <i>M. glomerata</i>	66
Figura 29 – Gráfico de perda por volatilização em secagem a sombra, comparativo de volatilização em cada tempo entre as espécies, ■ <i>M. laevigata</i> , ■ <i>M. glomerata</i> , Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey).	66
Figura 30 – Gráficos de variação de concentração de cumarina em $\mu\text{g/mL}$ e o tempo de secagem em horas para: <i>M. laevigata</i> seca em (a) estufa ou (b) sombra, e <i>M. glomerata</i> seca em (c) estufa ou (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$	68
Figura 31 – Gráficos de variação de concentração de ácido o-cumárico em $\mu\text{g/mL}$ e o tempo de secagem em horas para: <i>M. laevigata</i> seca em (a) estufa ou (b) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$	69
Figura 32 – Gráficos de variação de concentração de umbeliferona em $\mu\text{g/mL}$ e o tempo de secagem em horas para: <i>M. laevigata</i> seca em (a) estufa ou (b) sombra, e <i>M. glomerata</i> seca em (c) estufa ou (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$	70
Figura 33 – Gráficos de variação de concentração de ácido clorogênico em $\mu\text{g/mL}$ e o tempo de secagem em horas para: <i>M. laevigata</i> seca em (a) estufa ou (b) sombra, e <i>M. glomerata</i> seca em (c) estufa ou (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$	71
Figura 34 – Gráficos de variação de concentração de ácido dicafeoilquínico em $\mu\text{g/mL}$ e o tempo de secagem em horas para: <i>M. laevigata</i> seca em (a) estufa ou (b) sombra, e <i>M. glomerata</i> seca em (c) estufa ou (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$	71

Figura 35 – Gráficos de variação de concentração de ácido tricafeoilquínico em µg/mL e o tempo de secagem em horas para: *M. laevigata* seca em (a) estufa ou (b) sombra, e *M. glomerata* seca em (c) estufa ou (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$ 72

Figura 36 – Gráficos de variação de concentração de ácido caurenóico em µg/mL e o tempo de secagem em horas para: *M. laevigata* seca em (a) estufa ou (b) sombra, e *M. glomerata* seca em (c) estufa (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$ 73

Figura 37 – Gráficos de variação de concentração de ácido grandiflórico em µg/mL e o tempo de secagem em horas para: *M. laevigata* seca em (a) estufa (b) sombra, e *M. glomerata* seca em (c) estufa (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$ 74

Figura 38 – Gráficos de variação de concentração de ácido cupressênico em µg/mL e o tempo de secagem em horas para: *M. laevigata* seca em (a) estufa ou (b) sombra, e *M. glomerata* seca em (c) estufa ou (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$ 74

FIGURAS CAPITULO 3

Figura 39 – Representação gráfica do movimento de rotação e translação da coluna de separação CCC (Keay e Wood, 2008). 76

Figura 40 – Cromatograma UHPLC-MS em modo íons positivos e negativos dos extratos secos de: (A) Mget, (B) Mgaq, (C) Mlet e (D) Mlaq. Onde: (I) ácido clorogênico, (II) ácido dicafeoilquinico, (III) ácido grandiflórico, (IV) ácidos caurenóico e cupressênico, (V) cis-trans melilotosideo e ácido cafeico, (VI) ácido o-cumárico, (VII) cumarina. 83

Figura 41 – Análise de TLC dos extratos brutos: (A) desenvolvimento em hexano: acetona (4:1), (B) 254 nm e (C) Vanilina-ácido sulfúrico 1 %. Onde (1) Mgaq, (2) Mget, (3) Mlaq e (4) Mlet. 83

Figura 42 – Divisão do cromatograma do extrato de *Mikania glomerata* hidroetanólico em blocos de acordo com o tempo de eluição: (GI) 0-16min; (GII) 16,1-30min; (GIII) 30,1-57min; (GIV) 57,1-72min e (GV) 72,1-100min. 84

Figura 43 – Teste sistema solvente (10 mg Mget em 4 mL SS) analisados em HPLC. (A) HEMWat 14 – UP; (B) HEMWat 14 – LP; (C) HEMWat 14-A – UP; (D) HEMWat 14-A – LP; (E) HEMWat 17 – UP; (F) HEMWat 17 – LP; (G) HEMWat 17-A – UP; (H) HEMWat 17-A – LP; (I) SSB 1 – UP; (J) SSB 1 – LP. 85

Figura 44 – Teste sistema solvente (10 mg Mget em 4 mL SS) analisados em HPLC. (A) SSA – UP; (B) SSA – LP; (C) SSA 1 – UP; (D) SSA 1 – LP; (E) SSA 2 – UP; (F) SSA 2 – LP; (G) SSA 3 – UP; (H) SSA 3 – LP; (I) SSA 4 – UP; (J) SSA 4 – LP. 86

Figura 45 – Análise de TLC dos extratos brutos e sistemas solventes: (A) desenvolvimento em hexano: acetona (4:1), (B) 254 nm e (C) Vanilina-ácido sulfúrico 1 %. Onde (1)

Cumarina, (2) Umbeliferona, (3) ácido clorogênico, (4) SSA 3 –UP, (5) SSA 3 –LP, (6) SSA 4 –UP, (7) SSA 4 –LP, (8) SSA 23 –UP, (9) SSA 23 –LP, (10) Mlet e (11) MGet..... 87

Figura 46 – Análise de TLC dos extratos brutos e sistemas solventes: (A) desenvolvimento em hexano: acetona (4:1), (B) 254 nm e (C) Vanilina-ácido sulfúrico 1 %. Onde (1) MGet, (2) HEMWat 26-A –UP, (3) HEMWat 26-A –LP, (4) HEMWat 26–UP, (5) HEMWat 26–LP, (6) HEMWat 27-A–UP, (7) HEMWat 27-A–LP, (8) HEMWat 27–UP e (9) HEMWat 27–LP... 88

Figura 47 – MIDI, 456 mL (cada coluna), 4,0 mm diâmetro interno da coluna, 1250 rpm, 30 °C, Gradiente RP HEMWat 17A-27A em 120min após passagem do solvente, Mget em 40 mL LP-17A e 10 mL UP-17A, *loop* de 50 mL aquecido à 40°C, massa de amostra e numero de colunas: – 2,5 g, 1 coluna; – 4,0 g, 1 coluna; – 8,0 g, 2 colunas, comprimento de onda utilizado: (A) 360 nm e (B) 246 nm. 89

Figura 48 – Balanço de massas, em mg de agrupamento de frações obtidas por mg de amostra, em 120 min após passagem do solvente. Equipamento: ■ Spectrum, ■ MIDI. Extrato: (A) Hidroetanólico (Gradiente RP HEMWat 17A-27A) e (B) Aquoso (Gradiente NP HEMWat 11A-7A)..... 89

Figura 49 – MIDI, 912 mL, 4,0 mm diâmetro interno da coluna, 1250 rpm, 30 °C, Gradiente RP HEMWat 17A-27A em 120 min após passagem do solvente, 8,0 g amostra em 40 mL LP-17A e 10 mL UP-17A, *loop* de 50 mL aquecido à 40°C. Extrato: (A e B) *Mikania laevigata* hidroetanólico (C e D) *Mikania glomerata* hidroetanólico. Comprimento de onda utilizado: (A e C) 360nm, (B e D) 246nm. 90

Figura 50 – MIDI, 912 mL, 4,0 mm diâmetro interno da coluna, 1250 rpm, 30 °C, Gradiente NP HEMWat 11A-7A em 120 min após passagem do solvente, 4,0 g amostra em 80 mL LP-11A, *loop* de 100 mL aquecido à 40°C. Extrato: (A e B) *Mikania laevigata* aquoso (C e D) *Mikania glomerata* aquoso. Comprimento de onda utilizado: (A e C) 360nm, (B e D) 246nm. 90

Figura 51 – Análise de TLC das frações selecionadas de Mlet, (A) desenvolvimento em hexano: acetona (4:1), (B) 254 nm e (C) Vanilina-ácido sulfúrico 1 %. (MIDI, 912 mL, 4,0 mm diâmetro interno da coluna, 1250 rpm, 30 °C, Gradiente RP HEMWat 17A-27A em 120 min após passagem do solvente, fluxo 24mL/min, 8,0 g amostra em 40 mL LP-17A e 10 mL UP-17A, *loop* de 50 mL aquecido à 40°C). 95

Figura 52 – UHPLC-MS das frações enriquecidas de Mlet, enriquecida em componente específico. (MIDI, 912 mL, 4,0 mm diâmetro interno da coluna, 1250 rpm, 30 °C, Gradiente RP HEMWat 17A-27A em 120 min após passagem do solvente, fluxo 24mL/min, 8,0 g amostra em 40 mL LP-17A e 10 mL UP-17A, *loop* de 50 mL aquecido à 40°C). (I) ácido clorogênico, (II) cis-trans melilotosideo e ácido cafeico, (III) ácido dicafeoilquinico, (IV) ácido o-cumárico, (V) cumarina, (VI) ácido grandiflórico, (VII) ácidos caurenóico e cupressênico. 96

LISTA DE TABELAS

TABELAS CAPITULO 1

Tabela 1: Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de interesse biológico (Devasagayam <i>et al.</i> , 2004)	27
Tabela 2: Gradiente para avaliação cromatográfica.	32
Tabela 3: Padrões comerciais, razão massa/carga (<i>m/z</i>), modo de ionização (MS), faixa de tempo de retenção (tR) e Limite de detecção (LD)	40
Tabela 4: Comparação da composição dos extratos obtidos para amostras de <i>M. laevigata</i> , <i>M. glomerata</i>	50
Tabela 5: Composição dos extratos aquosos das duas espécies de <i>Mikania</i> (mg/g)	51
Tabela 6: Composição dos extratos hidroetanólicos das duas espécies de <i>Mikania</i> (mg/g)	51
Tabela 7: IC ₅₀ versus tempo de exposição (µg/mL).	57
Tabela 8: Capacidade antioxidante dos extratos por ORAC (µmol Trolox eq./g).	58
Tabela 9: Relação bactéria concentração de extratos hidroetanólicos que apresentaram atividade (halo).....	59

TABELAS CAPITULO 2

Tabela 10: Comparação da composição dos extratos obtidos para amostras de <i>M. laevigata</i> , <i>M. glomerata</i> , ensaio de secagem.....	67
--	----

TABELAS CAPITULO 3

Tabela 11: Sistemas solventes HEMWat. (Adaptado:Garrard (2005)).....	77
Tabela 12: Sistemas solventes utilizados para avaliação da separação em cada fase.	79
Tabela 13: Gradiente para avaliação cromatográfica.	80
Tabela 14: Massa total de extratos secos.....	82
Tabela 15: Padrões comerciais, razão massa/carga (<i>m/z</i>), modo de ionização (MS) e faixa de tempo de retenção (tR)	82
Tabela 16: Teste sistema solvente (10 mg Mget em 4 mL SS) analisados em HPLC	84
Tabela 17: Massa recuperada por conjunto de frações submetidas ao equipamento MIDI de acordo com a massa de extrato hidroetanólico utilizada inicialmente e tamanho da coluna de separação.	92
Tabela 18: Massa recuperada por conjunto de frações submetidas ao equipamento SPECTRUM de acordo com a massa de extrato hidroetanólico utilizada inicialmente e tamanho da coluna de separação.	93
Tabela 19: Massa recuperada por conjunto de frações submetidas ao equipamento MIDI de acordo com a massa de extrato aquoso inicial.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAPH – 2,2'-azobis (2-amidiopropano) diidroclorico
- AUC – Área abaixo da curva; do inglês Area Under the Curve
- BEBM – Meio Basal Epitélio Brônquico; do inglês Bronchial Epithelial Basal Medium
- CCC – Cromatografia de contra corrente
- CID – Dissociação induzida por colisão; do inglês Collision Induced Dissociation
- DMEM – Meio de Eagle Modificado por Dulbecco's; do inglês Dulbecco's Modified Eagle Medium.
- DP – Desvio padrão
- DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
- EI – ionização por elétrons; do inglês electron ionization
- ESI – Ionização por eletrospray; do inglês electrospray ionization.
- ET – transferência de elétrons; do inglês electron transfer
- FBS – Soro Fetal Bovino; do inglês fetal bovine serum
- HAT – transferência de átomo de hidrogênio; do inglês hydrogen atom transfer
- HEMWat – Sistema solvente para CCC formado por heptano: acetato de etila: metanol: água; do inglês heptane: ethyl acetate: methanol: water.
- IC₅₀ – Concentração inibitória 50
- K_D – constante de distribuição / partição
- LD – Limite de detecção
- LQ – Limite de quantificação
- m/z* – Relação massa-carga
- MS – Espectrometria de massas; do inglês mass spectrometry
- MS/MS – Espectrometria de massas sequencial
- Nd – Abaixo do limite de detecção.
- ORAC_{FL} – Capacidade de absorção do radical oxigênio (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
- RNS – Espécies reativas de nitrogênio; do inglês reactive nitrogen species
- ROS – Espécies reativas de oxigênio; do inglês reactive oxygen species
- TE – Trolox equivalente
- TQD – Detector Triplo Quadrupolo; do inglês triple quadrupole detector.
- Trolox – Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

UHPLC – Cromatografia líquida de ultra alta eficiência; do inglês ultra-high performance liquid chromatography.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	20
1.1.	<i>Mikania glomerata</i> Spreng. e a <i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip. ex Baker	20
2.	OBJETIVOS	23
2.1.	Objetivos Gerais	23

CAPITULO 1: ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS DE MIKANIA

1.	INTRODUÇÃO	24
1.1.	Processo inflamatório	25
1.2.	Outras atividades testadas	26
2.	OBJETIVOS	30
3.	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1.	Material vegetal	30
3.2.	Extração Hidroetanólica	30
3.3.	Extração Aquosa.....	31
3.4.	Análise Cromatográfica por UHPLC-MS.....	31
3.5.	Cultivo celular.....	32
3.5.1.	Avaliação do efeito sobre células musculares e epiteliais de epiderme e de brônquios.....	32
3.5.2.	Cultura de células	33
3.5.3.	Ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade dos extratos)	33
3.6.	Avaliação do efeito sobre células tumorais	34
3.7.	Transativação por gene repórter – luciferase em placa de 24 poços.	35
3.8.	Ensaio antidesnaturação em albumina sérica bovina (BSA).....	36
3.9.	Atividade antioxidante	37
3.9.1.	Por 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....	37
3.9.2.	Por ORAC _{FL}	38

3.10. Atividade antimicrobiana	38
3.10.1. Formação de halo em perfuração em Agar	38
4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	39
5. RESULTADOS	39
5.1. Composição dos extratos brutos por UHPLC-MS	39
5.2. Análise comparativa da fragmentação do íon selecionado padrão comercial e extrato vegetal em UHPLC-MS/MS.	44
5.3. Concentração dos compostos identificados em cada tipo de extrato	51
5.4. Avaliação da citotoxicidade e/ou processos regenerativos.....	52
5.4.1. Citotoxicidade dos extratos de <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> sobre células musculares, endoteliais e epiteliais.....	52
5.4.2. Citotoxicidade dos extratos de <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> em células tumorais .	53
5.4.3. Citotoxicidade e transativação do gene repórter PPAR- γ	54
5.4.4. Inibição da desnaturação em albumina sérica bovina (BSA).....	55
5.4.5. Comparação da atividade citotóxica.....	56
5.5. Atividade antioxidante	57
5.5.1. Atividade antioxidante por DPPH	57
5.5.2. Atividade antioxidante por ORAC _{FI}	58
5.5.3. Comparação da atividade antioxidante.....	58
5.6. Avaliação da atividade antibacteriana em placa de ágar perfurado.	59
6. CONCLUSÕES.....	59

CAPITULO 2: EFEITO DO PROCESSO DE SECAGEM

1. INTRODUÇÃO	61
1.1. Secagem e estabilização de matéria prima para fitoterápicos.....	61
2. OBJETIVOS	63
3. MATERIAL E MÉTODOS	63
3.1. Comparação de Métodos de secagem e armazenamento de tecido vegetal.....	63
3.2. Extração Hidroetanólica	64
3.3. Análise Cromatográfica por UHPLC-MS.....	65
4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	65
5. RESULTADOS	65
5.1. Interferência do processo de secagem na concentração de metabólitos secundários principais de <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i>	65
6. CONCLUSÕES.....	75

CAPITULO 3: OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ENRIQUECIDAS VIA CCC

1. INTRODUÇÃO	76
1.1. Cromatografia de contra corrente (CCC).....	76
2. OBJETIVOS	78
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	78
3.1. Seleção sistema de solventes.....	78
3.2. Análise cromatografica por HPLC-DAD	79
3.3. Procedimento de separação cromatografia de contra corrente de alta eficiência (CCC).....	80
3.3.1. SPECTRUM:	80
3.3.2. MIDI:	80
3.3.2.1. Otimização do tamanho da amostra MIDI.....	81
3.4. Cromatografia em camada delgada.....	81
3.5. Análise por UHPLC-MS das frações	81
4. RESULTADOS	82
4.1. Quantidade e Composição dos extratos secos	82
4.2. Seleção sistema de solventes.....	84
4.3. Desenvolvimento do método por CCC	88
4.4. Balanço de Massa	91
4.5. Composição das Frações	95
5. CONCLUSÕES.....	97
CONCLUSÕES FINAIS:.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

APÊNDICE:

Apêndice 1: UHPLC-MS frações agrupadas de extratos hidroetanólicos.	109
Apêndice 2: UHPLC-MS frações agrupadas de extratos aquosos.....	113
Apêndice 3: Comprovante de Cadastro de Acesso ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen)	117
Apêndice 4: Declaração de que o trabalho não versou sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a biossegurança.....	118
Apêndice 5: Declaração de que a tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.....	119

1. INTRODUÇÃO GERAL

O mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 44 bilhões, segundo a consultoria Analyze and Realize (Brasil, 2012). De acordo com a Associação Brasileira de Empresas do Setor Fitoterápico, não há dados oficiais sobre o tamanho desse mercado brasileiro, e as estimativas variam entre US\$ 350 milhões e US\$ 550 milhões (Brasil, 2012).

Asteraceae é uma família que contribui com valiosas espécies de plantas medicinais possuindo atividade antioxidante descrita e reconhecidamente usadas como fitoterápicos, tais como: *Calendula officinalis* (calêndula), *Cynara scolymus* (alcachofra), *Echinacea purpurea* (equinácea), *Matricaria recutita* (camomila), *Tanacetum parthenium* (tanaceto), *Mikania glomerata* (guaco) e *Arnica montana* (arnica) (Ferreira, 2008).

Dentre as plantas desta família, um gênero de grande interesse é o das *Mikánias*, pois várias plantas deste gênero apresentam ação antiedematogênica, antidiarreica, anti-inflamatória, antimalárica, antimicrobiana, antimutagênica, anti-hemorrágica, anticoagulante, antiulcerosa, broncodilatadora, antiofídica e efeitos hipoglicemiantes (Maiorano *et al.*, 2005; Gasparetto *et al.*, 2011; Collaço *et al.*, 2012).

1.1. *Mikania glomerata* Spreng. e a *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker

Dentre as principais espécies medicinais pertencentes ao gênero *Mikania*, encontram-se a *Mikania glomerata* Spreng. e a *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker, popularmente chamadas de guaco, ambas de ocorrência na Mata Atlântica brasileira, crescendo desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul, podendo, também, ser encontradas na Bahia, Paraguai e noroeste da Argentina (Lima *et al.*, 2003).

De acordo com Santos *et al.* (2006) e Czelusniak, K. E. *et al.* (2012), a *M. glomerata* faz parte da Farmacopeia Brasileira desde a primeira edição em 1929, e a *M. laevigata* só foi incluída na quarta edição em 2005.

Na composição química das duas espécies de *Mikania* estão presentes diversos componentes como: cumarina, lupeol, ácido α -isobutiriloxi-caur-16-en-19-oico, além de óleos essenciais, entre eles sesquiterpenos e diterpenos do tipo caurano, caurenol e ácidos caurenóico, grandiflórico e cinamoilgrandiflórico. Outros metabólitos secundários como β -sitosterol, friedelina, estigmasterol, taninos hidrolisáveis, flavonoides e saponinas são citados (Santos *et al.*, 2006; Czelusniak, K. E. *et al.*, 2012). Porém o marcador químico destas espécies na Instrução Normativa 5 (Registro Simplificado de Fitoterápicos) é somente a cumarina (Brasil., 2008).

As proporções dos metabólitos estão intimamente relacionadas à idade e desenvolvimento da planta (desenvolvimento foliar, surgimento de novos órgãos, processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos), temperatura, altitude, índice pluviométrico, radiação UV, composição atmosférica, disponibilidade de nutrientes e água no solo, herbivoria e ataque de patógenos. O teor de cumarina, por exemplo, apresenta alterações significativas com relação às variações na intensidade de luz, tendo maior produção em pleno sol (Czelusniak, K. E. *et al.*, 2012).

As rotas biossintéticas para a produção dos compostos majoritários do metabolismo secundário para ambas as espécies estão apresentados nas Figuras 1 e 2, sendo estes influenciados pelas características genéticas e das condições de estresse em que o organismo vegetal se encontra, orientando a produção de maior quantidade de um determinado composto em detrimento de elaboração de outro.

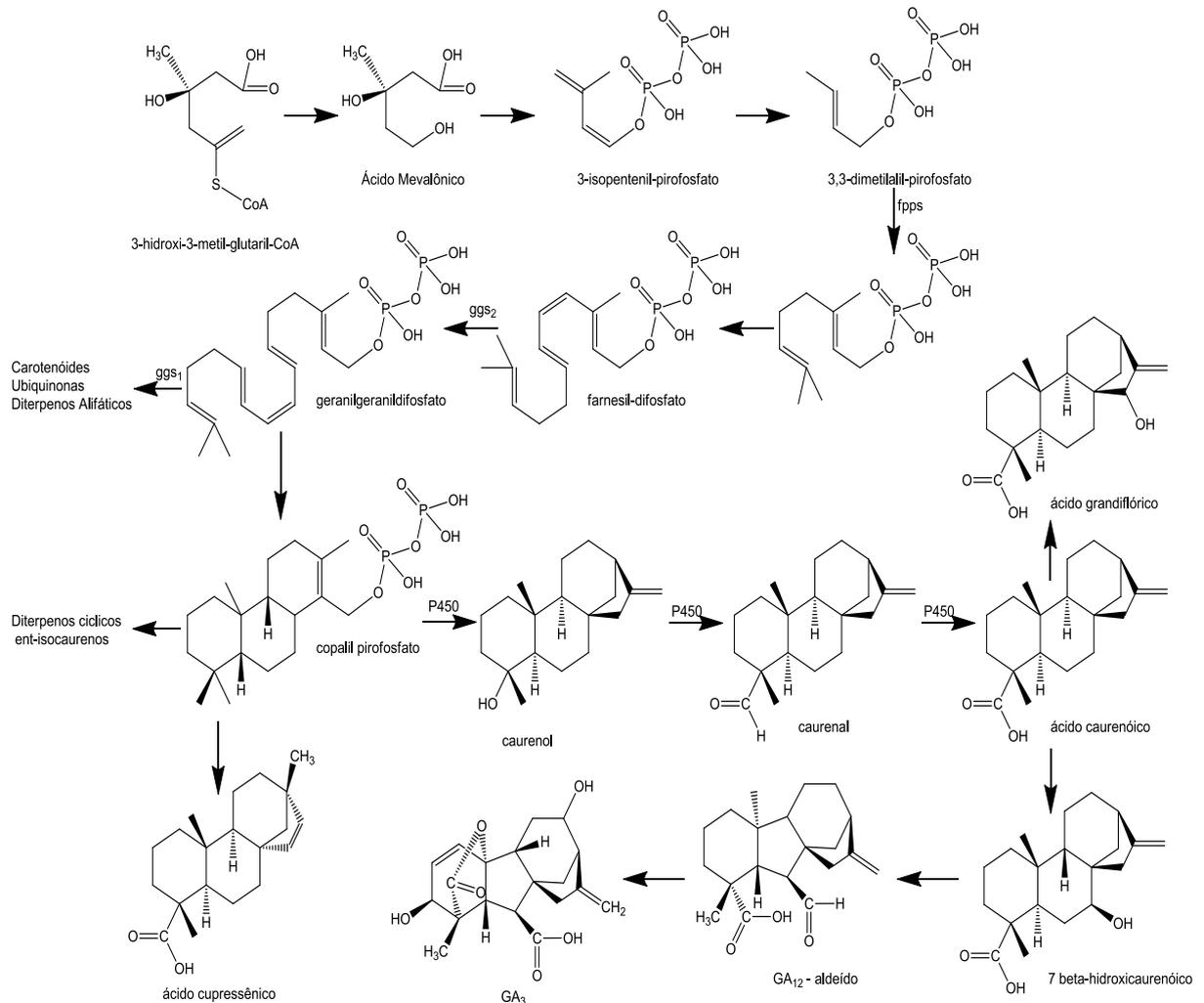


Figura 1 – Metabólitos da rota do isopreno. Onde: fpps = Farnesil difosfato sintase; ggs_{1/2} = Geranylgeranil difosfato sintase; P450= Citocromo P450 monooxigenase ; GA₃ = Giberelina e GA₁₂ = aldeído giberélico (Adaptado: Trindade, 2012).

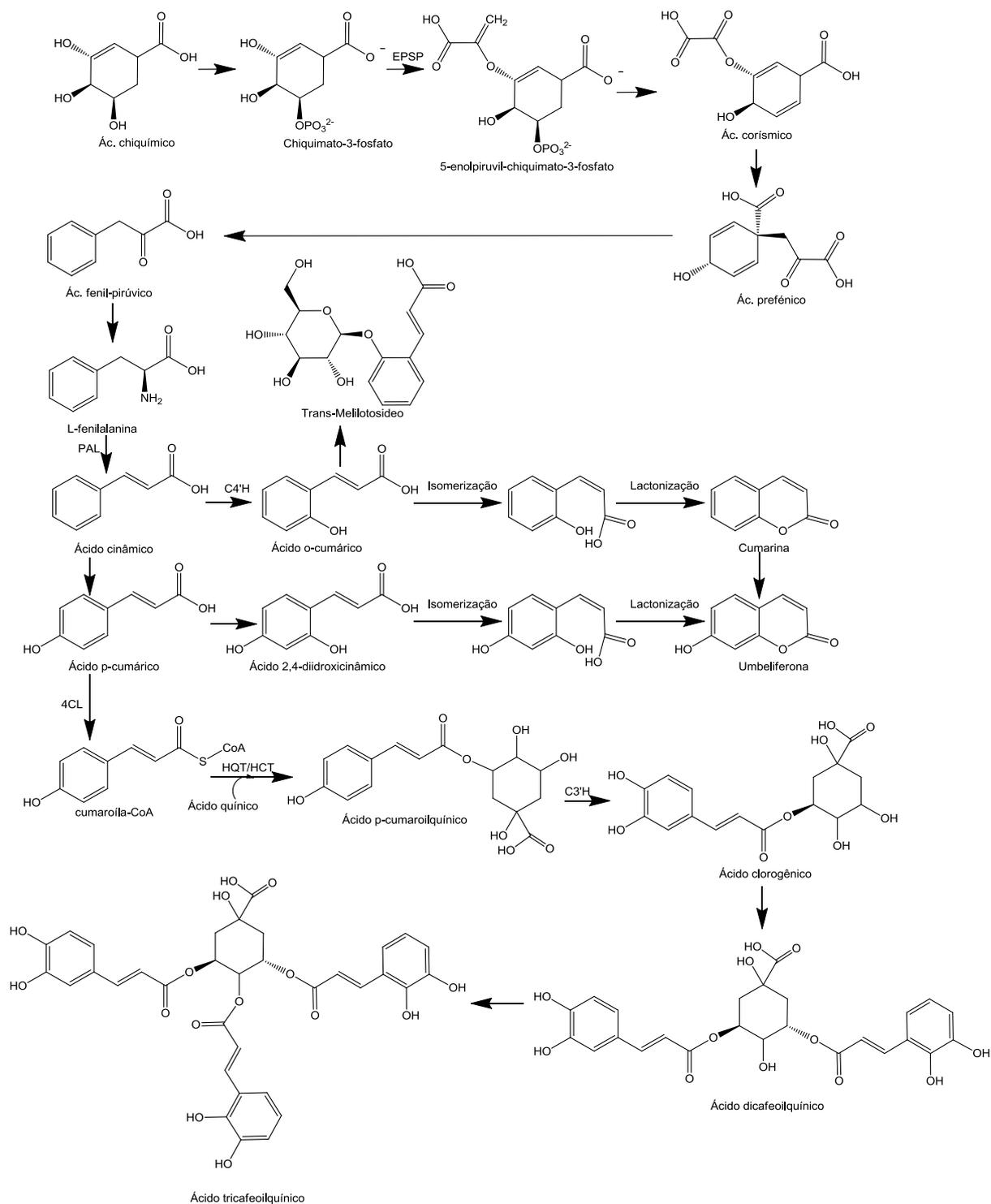


Figura 2 – Metabólitos da rota do ácido chiquímico Onde: PAL = fenilalanina amônio-liase; C4'H = trans-cinamato-4-hidroxilase; EPSP = 5- enolpiruvil-3-fosfochiquimato sintase; 4CL = 4-hidroxicinamoil-CoA ligase; HCT = hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato hidroxicinamoil transferase; HQT = hidroxicinamoil-CoA quinato hidroxicinamoil transferase; C3'H = p-coumaróil ester 3'-hidroxilase. (Adaptado: Souza, 2005; Comino *et al.*, 2009; Czelusniak, K. *et al.*, 2012).

Os componentes dos extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata* possuem propriedades estruturais, químicas e físicas semelhantes, no entanto a *M. laevigata* contém uma maior quantidade de cumarina, que lhe conferiu o nome popular de “guaco cheiroso”

devido ao forte odor característico (Ferreira, 2008; Alves *et al.*, 2009; Collaço *et al.*, 2012). De acordo com Suyenaga *et al.* (2002) devido à maior concentração de cumarina presente, a *M. laevigata* é mais eficiente que a *M. glomerata* sobre a inibição do processo inflamatório. Porém outros autores encontraram maiores teores de cumarina em *M. glomerata* (Santos *et al.*, 2006). Por estes motivos, ainda há necessidade de estudos comparativos da atividade e composição de extratos destas duas espécies.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar as diferenças do perfil químico de extratos das folhas de *Mikania glomerata* Spreng., e *Mikania laevigata* Schultz submetidas a diferentes técnicas de secagem, obter de frações enriquecidas os principais componentes por Cromatografia de Contra Corrente (CCC), e avaliar a atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante dos extratos.

CAPITULO 1: ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS DE MIKANIA.

1. INTRODUÇÃO

As propriedades farmacológicas do guaco são atribuídas principalmente à presença de cumarina (1,2-benzopirona), mas este não é o único componente bioativo presente. Foi proposto que o fitocomplexo (cumarina com ácido o-cumárico) seria o responsável pela atividade terapêutica associada ao tratamento da pneumonite alérgica (Santos *et al.*, 2006). As propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes têm sido atribuídas à dihidrocumarina, que tem sido relatada como sendo um dos principais compostos em extratos hidroalcoólicos de guaco (Gasparetto *et al.*, 2011). O siringaldeído mostrou inibição da prostaglandina sintetase (COX-2) e atividade antioxidante. Já o ácido caurenóico, apresentou propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória e efeitos relaxantes da musculatura lisa (Gasparetto *et al.*, 2011).

Já foram avaliadas, em vários trabalhos publicados, as atividades antiofídicas para serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Philodryas*, para as duas variedades de guaco na busca de alternativas viáveis em substituição ou complementação a aplicação do soro antiofídico específico para cada gênero. As propriedades antiofídicas relatadas para a *M. laevigata* foram relacionadas à alta concentração de cumarina presente principalmente em suas folhas, diminuindo a permeabilidade vascular e a fixação de leucócitos no local da inflamação (Collaço *et al.*, 2012; Czelusniak, K. E. *et al.*, 2012). Segundo Mors *et al.* (2000), a cumarina está presente em 40% das plantas referenciadas como antiofídicas. Já o mecanismo de ação exercido por extratos de *M. glomerata*, sobre o veneno de serpente, ocorre através da inibição da atividade da fosfolipase A₂ (PLA₂) exógeno, presente no veneno (Maiorano *et al.*, 2005; Stuaní Floriano *et al.*, 2009; Collaço *et al.*, 2012).

Outro processo inflamatório onde a aplicação do guaco é bastante utilizada é durante crises de asma, caracterizado pela obstrução e inflamação das vias aéreas, através de liberação do fator de necrose tumoral (TNF- α) e de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, e resposta broncodilatadora exagerada (Santos *et al.*, 2006; Genov e Solé, 2007). O extrato de guaco administrado por via subcutânea reduziu a permeabilidade vascular, a migração de leucócitos e a adesão aos tecidos inflamados. A cumarina foi capaz de inibir a migração de neutrófilos para o local afetado (Czelusniak, K. E. *et al.*, 2012).

1.1. Processo inflamatório

A inflamação é uma reação complexa envolvendo componentes celulares e moleculares. É uma resposta inespecífica a uma agressão específica. O agente responsável pela agressão pode ser de natureza química, física ou biológica (Zhou *et al.*, 2007). A inflamação é essencial para a manutenção da saúde dos indivíduos, pois é a maneira pela qual o organismo reage contra agentes potencialmente danosos como bactérias, vírus e outros patógenos; e apresenta como principais componentes: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, ativação, adesão e transmigração celular (Silva, 2012).

A resposta inflamatória é caracterizada por quatro sinais cardinais: dor, rubor, calor e tumor. Esses efeitos são estabelecidos por eicosanoides clássicos, como as prostaglandinas e leucotrienos, que exercem importantes funções como mediadores locais e exercem expansivas ações em resposta de interesse na inflamação (Silva, 2012).

A origem destes mediadores pode ser plasmática (fatores do complemento e bradicinina) ou celular (histamina, serotonina, prostaglandinas, fator ativador plaquetário, leucotrienos, bradicinina, óxido nítrico, neuropeptídeos e citocinas), que se liga a receptores específicos nas células-alvos, podendo, inclusive, estimular a liberação de outros mediadores (Zhou *et al.*, 2007; Coutinho *et al.*, 2009).

A estabilização da membrana lisossomal é importante para limitar a resposta inflamatória através da prevenção da libertação de constituintes lisossomais como neutrófilos ativados. As enzimas lisossomais liberadas durante a inflamação produzem várias desordens tanto na inflamação aguda ou crônica. As drogas anti-inflamatórias não esteroidais atuam quer pela inibição dessas enzimas ou pela estabilização da membrana celular, impedindo a lise destas células (Kumar *et al.*, 2012; Anandarajagopal *et al.*, 2013).

As citocinas constituem uma família de peptídeos com diversas atividades biológicas e são produzidas, principalmente, por linfócitos e macrófagos. A regulação da produção de diferentes citocinas pode desempenhar um papel tanto anti-inflamatório como imunomodulador. Entre as citocinas que devem ser avaliadas, podemos citar: interleucinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, o TNF- α e o interferon- γ . (Andrade *et al.*, 2006). Os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias resultam em respostas inflamatórias agravadas, induzindo em macrófagos a expressão de genes que codificam as enzimas envolvidas no processo inflamatório, como a ciclooxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX) (Silva, 2012; Hsu *et al.*, 2013).

A COX é uma enzima responsável pela conversão de ácido araquidônico em

prostaglandinas, tais como PGD_2 , PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$, mediadores de inflamação e dor. A COX-1 é uma isoforma presente na regulação do metabolismo normal das células de muitos tecidos. A COX-2 é uma isoforma induzida que produz prostanóides, responsáveis por estímulos pró-inflamatórios, como PGE_2 (Ferrari, 2008).

O TNF- α é conhecido como um mediador importante em muitos eventos inflamatórios dependentes de citocinas, ligando-se a receptores específicos denominados de receptores de TNF promovendo a resposta imune e a inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, podendo ainda, desencadear o gatilho para apoptose celular no local da infecção (Genov e Solé, 2007).

O óxido nítrico (NO) é um mediador inflamatório produzido através da ativação de macrófagos estimulados pela ação de citocinas e lipopolissacarídeos (LPS), podendo atuar tanto no desenvolvimento de reações inflamatórias quanto na atividade bactericida ou antiparasitária dessas células, sendo produzido por uma família de enzimas conhecidas como NOS. Os macrófagos expressam a sintase do óxido nítrico induzível (iNOS), e produzem grandes quantidades de NO. A superprodução de NO, parece estar associada com numerosas condições patológicas (Dirsch *et al.*, 1998; Andrade *et al.*, 2006).

Algumas doenças autoimunes, como glomerulonefrite, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico, promovem a produção de auto-antígenos de hipersensibilidade do tipo III, devido à desnaturação das proteínas celulares *in vivo* (Bhaskar e Mohite, 2010; Chopade *et al.*, 2012). Vários fármacos anti-inflamatórios como a indometacina, diclofenaco de sódio, ácido salicílico e ácido flufenâmico possuem a capacidade de inibir a desnaturação de proteínas (Williams *et al.*, 2008; Sakat *et al.*, 2010).

1.2. Outras atividades testadas

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos contendo um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais, altamente instáveis, com meias-vidas curtas e quimicamente muito reativos, tendo a capacidade de causar danos ao reagir com quase todas as moléculas com as quais entram em contato (Devasagayam *et al.*, 2004).

Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) /Nitrogênio (RNS) é um termo usado para identificar radicais e alguns não-radicais que se apresentam como agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidos em radicais (Halliwell, 1996; Pal, 2013). A Tabela 1 mostra alguns dos principais radicais livres de interesse biológico provenientes do metabolismo celular. São produzidos para ajudar na manutenção da homeostase celular ou regulação de reações de redução e oxidação (redox) em tecidos saudáveis (Devasagayam *et al.*, 2004).

Tabela 1: Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de interesse biológico (Devasagayam *et al.*, 2004)

Espécies Reativas	Símbolo	Meia-vida (em seg)	Reatividade
Espécies reativas de oxigênio:			
Superóxido	O ₂ ^{•-}	10 ⁻⁶ s	Gerado na mitocôndria, em sistema cardiovascular e outros.
Radical hidroxila	•OH	10 ⁻⁹ s	Altamente reativo, gerado durante sobrecarga de ferro e situações semelhantes em nosso corpo.
Peróxido de Hidrogênio	H ₂ O ₂	Estável	Formado em nosso corpo pelo amplo número de reações, formando radicais potentes como •OH.
Radical peroxila	ROO•	Segundos	Reativo e formado de lipídios, proteínas, DNA, açúcares etc., durante o dano oxidativo.
Hidroperóxido orgânico	ROOH	Estável	Reage com íons metálicos formando espécies reativas
Oxigênio singlete	¹ O ₂	10 ⁻⁵ s	Altamente reativo formado por fotosensibilidade e reações químicas.
Ozônio	O ₃	Segundos	Presente como poluente atmosférico, pode reagir com várias moléculas, produzindo ¹ O ₂ .
Espécies reativas de nitrogênio:			
Óxido nítrico	NO•	Segundos	Neurotransmissor e regulador da pressão sanguínea, pode gerar potentes oxidantes durante estados patológicos.
Peróxinitrito	ONOO ⁻	10 ⁻³ s	Formado a partir do NO [•] e superóxido, é altamente reativo.
Ácido peróxinitroso	ONOOH	Ligeiramente estável	Forma protonada do ONOO ⁻ .
Dióxido de nitrogênio	NO ₂	Segundos	Formado pela poluição do ar.

É cada vez mais presente a associação de patogêneses de doenças humanas à presença dos radicais livres, incluindo câncer, aterosclerose, doenças inflamatórias, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, catarata, diabetes, distúrbios metabólicos (Pal, 2013).

A peroxidação lipídica que inclui uma série de reações em cadeia relacionadas a radicais livres também está associada a diferentes tipos de distúrbios biológicos, sendo de grande importância o uso de antioxidantes, particularmente os de origem natural para prevenir

tais problemas. Nos últimos anos, é crescente a busca por compostos fitoquímicos com propriedades de inibição do processo oxidativo, afim de substituir o uso de drogas sintéticas para o tratamento de complicações metabólicas sérias. Nesse sentido, a pesquisa tem se concentrado na identificação de plantas e outros organismos (fungos, micro-organismos etc), além do isolamento de compostos ativos provenientes de recursos naturais com alta capacidade antioxidante (Kumar *et al.*, 2010; Mahesh *et al.*, 2011; Pal, 2013).

A maioria dos compostos ativos com propriedades antioxidantes de origem vegetal estão associados à classe dos flavonoides, isoflavonoides, flavonas, antocianinas, cumarinas, catequinas, isocatequinas, lignanas, taninos e outros compostos polifenólicos (Kumar *et al.*, 2010; Mahesh *et al.*, 2011; Pal, 2013).

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências, por isso, atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, devido nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente as “atividade antioxidante total” de uma amostra (Prior *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005).

Após a constatação do mecanismo de reação antioxidante, em 2005, foi publicada uma revisão com os métodos atualizados para avaliar a capacidade antioxidante, sendo estes agrupados por mecanismo de reação: transferência de elétrons (ET) ou transferência de átomos de hidrogênio (HAT) (Huang *et al.*, 2005). Nenhum destes métodos avalia a capacidade de prevenção da oxidação, mas sim a capacidade de reagir com radicais livres já formados. O HAT segue um mecanismo de reação competitiva: um antioxidante e um substrato competem pelo radical livre, como seria o caso do $ORAC_{FL}$, sendo avaliado a cinética da reação (Huang *et al.*, 2005). Já as reações de ET avaliam através de reação redox a capacidade de um antioxidante de reduzir um radical livre, como é o caso do DPPH (Huang *et al.*, 2005).

A atividade antioxidante avaliada através do ensaio de DPPH é baseada na medida da absorbância de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), na faixa entre 515 a 520 nm. Quando está na presença de um composto antioxidante, o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio do DPPH recebe um átomo de hidrogênio do antioxidante, a solução violeta passa a apresentar uma coloração amarela e a absorbância diminui, Figura3. Sendo assim, a redução do DPPH é monitorada pelo decréscimo da absorbância no comprimento de onda (Huang *et al.*, 2005; Cabral *et al.*, 2009).

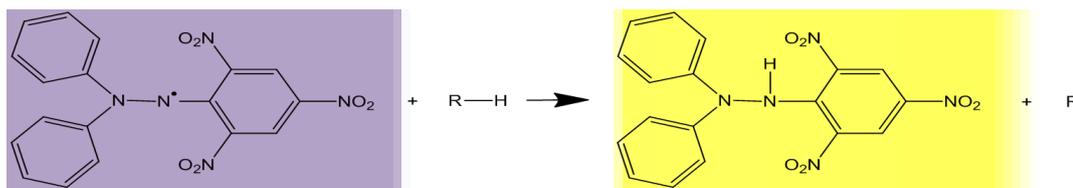


Figura 3 – Reação de captura do DPPH (Adaptado: Alves *et al.*, 2010).

Para o método de ORAC_{FL} a fluoresceína é utilizada como sonda fluorescente e juntamente com o AAPH - cloreto de (2,2'-azobis (2-amidiopropano)), que em 37°C induz a formação de radical peroxila. O método consiste na medida do decréscimo da fluorescência da fluoresceína, como consequência da perda de sua conformidade ao sofrer danos oxidativos. Quando um composto antioxidante é adicionado, este reage com os radicais, doando um átomo de hidrogênio, inibindo ou retardando a perda de intensidade da fluorescência (Ou *et al.*, 2001; Prior *et al.*, 2003).

No trabalho de Ares *et al.* (2010), foram estudadas a correlação entre a concentração de compostos polifenólicos totais (TPP), tipo de extração e a atividade antioxidante de três espécies nativas: *Achyrocline satureioides* (Marcela), *Baccharis trimera* (Carqueja) e *Mikania guaco* (Guaco). Os resultados obtidos demonstram que os polifenóis presentes nos extratos aquosos são os que apresentam maior atividade antioxidante pelo teste do DPPH. Os extratos de *Mikania* foram os que apresentaram menor atividade, principalmente os mais apolares. Como foi testada, apenas a relação TPP de cada tipo de extrato e Atividade por DPPH o estudo concluiu que não só os polifenóis são responsáveis pelas atividades antioxidantes apresentadas, cabendo um estudo mais aprofundado de outros compostos.

As propriedades antimicrobianas de substâncias e óleos essenciais, provenientes do metabolismo secundário de plantas, são de conhecimento popular há séculos, mas estão sendo confirmadas cientificamente apenas recentemente (Duarte, 2006).

Por outro lado, os micro-organismos que causam prejuízos à saúde humana estão apresentando-se cada vez mais resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos, o que incentiva ainda mais a pesquisa por antibióticos de ocorrência natural, com alvos dentro das células diferentes daqueles já conhecidos dos antibióticos e cujo uso combinado com medicamentos já existentes apresentem um efeito sinérgico contra patógenos resistentes (Duarte, 2006; Hemaishwarya *et al.*, 2008).

Os testes preconizados pela Farmacopeia Brasileira para se avaliar a atividade antimicrobiana seja para produtos de origem natural quanto sintético, é o método da micro

diluição em placa e a concentração mínima inibitória (MIC) e comparados com a atividade de antibióticos padrões (Duarte, 2006).

Não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições superiores. Aligiannis *et al.* (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de MIC, considerando como: forte inibição - MIC até 500 µg/mL; inibição moderada – MIC entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição - MIC acima de 1600 µg/mL.

2. OBJETIVOS

- A. Comparar a composição química de extratos hidroetanólicos e aquosos de folhas de *M. laevigata* e *M. glomerata*.
- B. Avaliar a influência dos extratos brutos obtidos sobre linhagens celulares normais e tumorais, quanto a sua toxicidade e efeitos sobre estas.
- C. Avaliar os possíveis mecanismos de inibição do processo inflamatório atribuídos a *M. glomerata* e a *M. laevigata*.
- D. Avaliar a atividade antimicrobiana por teste *in vitro*.
- E. Avaliar as propriedades antioxidantes dos extratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Matrizes de plantas adultas de guaco, das espécies *M. glomerata* e *M. laevigata*, obtidas do CPQBA-UNICAMP, já estão adaptadas e crescendo no campo experimental do Instituto de Biologia, UNICAMP. As suas exsiccatas foram depositadas no herbário do IB, UNICAMP sob registro nº 102046 para a *M. laevigata* e nº 102047 para a *M. glomerata*. Ao longo do ano foram coletadas folhas desenvolvidas e saudáveis destas plantas para fazer os extratos aquosos e hidroetanólicos. Após a coleta as folhas foram congeladas e liofilizadas. O pó das folhas foi obtido por trituração com nitrogênio líquido, e mantido em frascos fechados, protegidos da luz e umidade.

3.2. Extração Hidroetanólica

O preparo dos extratos hidroetanólicos foi realizado de acordo com a Farmacopeia

Brasileira 1ª edição (Dias Da Silva, 1926). A extração foi realizada por maceração obtendo-se 60g de folha fresca de guaco em pó em 300 mL de solução hidroetanólica 70% sob agitação, em banho de ultrassom, por 30 minutos e filtrado, com renovação do líquido extrator em intervalos de 30 minutos (um total de 3 renovações) (Melo, 2013). Estes extratos foram analisados por UHPLC-MS e posteriormente o solvente foi eliminado em concentrador a vácuo (SpeedVac). O extrato pós secagem apresentou-se como um semissólido verde. Sendo este mantido sob refrigeração.

3.3. Extração Aquosa

Devido ao uso popular das folhas de guaco em chás (infusos e decoctos) o pó das folhas frescas de ambas as espécies também foram extraídos com água ultra-pura. Estes extratos aquosos foram obtidos mantendo 60 g de folhas pulverizadas em infusão com 300 mL de água purificada Milli-Q aquecida a 60 °C em banho de ultrassom por 30 minutos e filtradas. Estes extratos foram analisados por UHPLC-MS, depois o solvente é evaporado por liofilização. O extrato pós secagem apresentou-se como um pó marrom; sendo este mantido sob refrigeração.

3.4. Análise Cromatográfica por UHPLC-MS

O método utilizado foi validado por Melo e Sawaya (2015), para quantificação de cumarina e ácido clorogênico como marcadores das duas espécies de guaco, sendo possível à utilização destes dados para quantificação e isolamento dos outros componentes dos extratos. De acordo com a RE nº 899 da ANVISA (Brasil, 2003), o método é seletivo, linearidade de r^2 0,97 e 0,98 para cumarina e ácido clorogênico (preconiza-se 0,99), respectivamente, limite de detecção de 0,32 e 4,18 µg/mL e limite de quantificação de 3,30 e 20,38 µg/mL de cumarina e de ácido clorogênico, respectivamente, preciso, pois ambos apresentaram $CV \leq 5\%$ e exato, pois recuperação dentro da faixa entre 95 e 105%.

Foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência–UPLC® Acquity da Waters com uma coluna C18 BEH Acquity Waters (1,7µm x 2,1mm x 50mm) com temperatura do forno em 30 °C. A eluição feita por gradiente com fluxo de 200 µL/min, utilizando como fase móvel A água purificada (Milli-Q) com 0,1% de ácido fórmico e como fase móvel B acetonitrila (grau cromatográfico), de acordo com o sistema de gradiente mostrado na Tabela 2. Sendo injetado 4 µL de cada amostra armazenada no auto injetor do equipamento a 20 °C.

Tabela 2: Gradiente para avaliação cromatográfica.

Tempo (min)	% eluente A (água purificada com 0,1 % de ácido fórmico)	% eluente B (acetonitrila)
Início	90	10
4,00	75	25
8,00	0	100
8,50	0	100
8,51	90	10
10,00	90	10

A detecção foi feita por um espectrômetro de massas triplo-quadrupolar (TQD Acquity da Waters) com fonte de ionização por eletrospray (ESI), realizando varredura em modo positivo e modo negativo nas seguintes condições: capilar de ± 3000 V, cone de ± 35 V, extrator de 1,0 V, temperatura da fonte de 150 °C e temperatura de dessolvatação de 300 °C.

Alíquotas dos extratos hidroetanólicos e aquosos foram diluídas na proporção 100 μ L extrato: 100 μ L etanol 70%: 800 μ L água e analisadas por UHPLC com detecção por espectrometria de massas durante todos os períodos de ensaios. Nas análises, foram quantificados inicialmente os teores de: cumarina (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), ácido o-cumárico (Sigma-Aldrich, 97%), ácido p-cumárico (Sigma-Aldrich, 97%), umbeliferona (Sigma-Aldrich, 99%), ácido caurenóico (Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$) e de ácido clorogênico (Sigma-Aldrich, $> 95\%$) comparando-se a área dos picos com uma curva de calibração construída a partir da diluição seriada de uma solução estoque de padrões preparados na concentração de 1 mg/mL em metanol. Outros compostos identificados ao longo do estudo foram quantificados por comparação com padrões quando possível, assim como através da relação área dos picos de cumarina, ácido o-cumárico, ácido p-cumárico, umbeliferona, ácido clorogênico, ácido caurenóico (padrões comerciais), ácido cupressênico e ácido grandiflórico (padrões isolados doados) x concentração do composto, possibilitando estimar a concentração destes outros componentes.

3.5. Cultivo celular

3.5.1. Avaliação do efeito sobre células musculares e epiteliais de epiderme e de brônquios

A fim de avaliar as possíveis interferências relacionadas à utilização dos extratos sobre os mais diversos tipos celulares, os quais estariam presentes em um organismo vivo com interação direta extrato / tecido, fez-se necessária uma análise prévia de qual seria a interferência relacionada a esta interação. Para estes testes foram utilizadas as linhagens celulares C2C12 (mioblasto muscular isolado de células satélites de camundongos adultos),

tEnd (hibridomas de endotélio tímico murinico) e BEAS-2B (epitélio brônquico humano), avaliando-se a viabilidade e proliferação celular, sendo estes realizados em parceria com o Laboratório de Ciências da Reabilitação - Medicina, da Faculdade Nove de Julho, sob supervisão da Profa. Dra. Stella Regina Zamuner.

3.5.2.Cultura de células

As linhagens C2C12 e tEnd foram cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado com 10 % de soro fetal bovino e gentamicina. Para a linhagem BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™) o meio base para o desenvolvimento desta linhagem celular é BEBM (Lonza / Clonetics Corporation) suplementado com todos os aditivos exceto o GA-1000 (gentamicina-mistura de anfotericina B) fornecido com o kit (Não filtrar meio completo). Cultivados em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

Após a multiplicação celular, o tapete celular sofreu desaderência da garrafa de cultura através de solução de tripsina 0,5% / EDTA 0,2% (Sigma) por 15 min/37 °C, transferidas para tubos de 50 mL e centrifugadas por 5 min a 25 x g (~ 1.200 rpm) em temperatura aproximada de 10 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 10 mL de meio de cultura. A concentração celular deve ser ajustada para 1 x 10⁵ células/mL. Em seguida, 100 µL da suspensão celular foram adicionadas em cada poço em placas de 96 poços e incubadas a 37°C por 24 hrs para que ocorra a aderência celular.

3.5.3.Ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade dos extratos)

A viabilidade das células foi avaliada em triplicata após 3 h de exposição contínua aos extratos e medida através do ensaio colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) a formazan. Nessa técnica, a quantidade de formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis. Após a aderência celular, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de meio de cultura contendo os extratos de *Mikania* diluídos em meio de cultura proporcional a célula empregada, nas seguintes concentrações: 1500; 150 e 15 µg/mL. Os controles utilizados foram meio de cultura. Após a adição dos extratos, as placas foram incubadas por 3 hrs e, em seguida, o meio de cultura contendo os extratos é substituído por um meio sem soro e contendo o corante MTT 0,5 mg/mL, filtrado em membrana de 0,22 µm. As células foram incubadas por 4 hrs, tempo necessário para ocorrer à redução do MTT à formazan. Em seguida, a solução de MTT foi descartada e 50 µL

de isopropanol foram adicionados em cada poço para dissolver os cristais de formazan formados nas mitocôndrias. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 620 nm. A viabilidade celular relativa e proliferação celular dos tratamentos foi quantificada em porcentagem de absorbância, sendo o controle de crescimento com meio de cultura considerado como 100%.

3.6. Avaliação do efeito sobre células tumorais

A atividade citotóxica foi avaliada pelo método MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) em parceria com o Laboratório Central de Pesquisas pré-clínicas no Centro Integrado de Pesquisas Onco-hematológicas da infância, sob supervisão de Gilberto C. Franchi Jr. e Alexandre E. Nowill.

As linhagens celulares utilizadas neste estudo, obtidas do banco de células do Centro Integrado de Pesquisas Onco-hematológicas da Infância (CIPOI), UNICAMP, foram: B15 (Naumovski *et al.*, 1988), RS4 (Stong *et al.*, 1985), NB4 (Lanotte *et al.*, 1991), CEM (Foley *et al.*, 1965), K562 (Lozzio e Lozzio, 1975), HL60 (Gallagher *et al.*, 1979), T-ALL (Santoli *et al.*, 1993), HEL (Martin e Papayannopoulou, 1982), NALM6 (Hurwitz *et al.*, 1979), JURKAT (Weiss e Stobo, 1984), REH (Matsuo e Drexler, 1998) e Ramos (Klein *et al.*, 1975).

As células foram cultivadas em frascos de 25 cm³ contendo meio RPMI 1640 (Sigma R6504) suplementado com 10% de soro fetal (Gibco 16000-004), 1% de penicilina (10000 IU/mL) e estreptomicina (10 mg/mL) (Gibco 15070). Foram mantidas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e o meio foi trocado a cada 48 horas.

Os extratos ou o controle positivo sulfato de vincristina ((Tecnocris[®], Eurofarma Laboratórios Ltda) em concentração de 30 µg/mL foram adicionados às células e após 48 horas de incubação as placas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Foi adicionado ao pellet, 10 µL de MTT (Sigma, M5665) dissolvido em 100 µL de tampão fosfato (Sigma P4417), e foram incubados por 4 horas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Decorrido esse tempo, as placas foram centrifugadas novamente e o sobrenadante removido. Aos cristais de formazan insolúveis foram adicionados 150 µL de isopropanol e, em seguida a absorbância foi medida em leitor de Elisa Synergy (Bio Tek Highland Park, Winooski, USA) em 570 nm. O teste foi realizado em triplicata. O valor de CE₅₀ foi calculado utilizando o *software* GraphPad Prism 6.

3.7. Transativação por gene repórter – luciferase em placa de 24 poços.

A atividade de citotoxicidade e de ativação do PPAR- γ foi avaliada em parceria com o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), sob supervisão da Profa. Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira.

O princípio desse ensaio é a transfecção transitória das células com um plasmídeo contendo o gene para super-expressão do receptor nuclear de interesse (pBIND PPAR γ :GAL4); um segundo plasmídeo contendo o gene repórter de Luciferase de Fire-Fly (GAL4) cuja transcrição é regulada pelo elemento responsivo do receptor nuclear em estudo (pGRE-luc); e um terceiro plasmídeo (pRL) para expressão constitutiva do gene repórter de Luciferase de Renilla para controlar a eficiência do protocolo de transfecção. Para o controle negativo de expressão, ao invés da transfecção com pBIND PPAR γ :GAL4 utiliza-se o plasmídeo pBLUE que não promove a expressão do gene repórter de luciferase de Fire-Fly.

As células 293-T (células embrionárias do rim) foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 24 poços a $2,5 \times 10^5$ células/poço com meio DMEM 10% FBS. Após atingirem 70% de confluência, o meio de cultura foi trocado para 500 μ L DMEM incompleto e as células foram transfectadas utilizando-se o reagente Lipofectamina 2000[®] (Life Technologies). Foi feito mix contendo os plasmídeos e o reagente Lipofectamina 2000[®] na proporção de 2 μ L de Lipofectamina 2000[®] para 1500 ng de plasmídeo. O mix experimental possui os plasmídeos pBIND PPAR γ :GAL4, pGRE-luc e pRL; o mix do controle possui os plasmídeos pBLUE, pGRE-luc e pRL. É adicionado 400 ng de cada um dos plasmídeos por poço. Foi feito um mix com os plasmídeos e o meio de cultura, e um segundo tubo com Lipofectamina 2000[®] e o meio de cultura. Os dois tubos são incubados separadamente por 5 min. Depois o mix com plasmídeo foi adicionado sobre a Lipofectamina 2000[®] com meio de cultura. O mix foi incubado por 20 minutos em temperatura ambiente e gotejado na superfície do respectivo poço com as células. Após 4 horas de transfecção foram feitos os tratamentos com 5 μ L de solução etanólica de *Mikania*, nas concentrações de 100; 50; 25 e 12,5 mg/mL, conferindo uma concentração final por poço de 1000; 500; 250 125 μ g/mL e para o controle negativo apenas meio de cultura. Após 36 horas da transfecção dos plasmídeos, o meio de cultura das células foi descartado e foi utilizado o kit Dual Luciferase[®] Assay Reporter System (Promega) para leitura do ensaio.

Para avaliação da citotoxicidade aparente dos extratos foi utilizado o parâmetro indireto da luminescência da degradação do substrato da luciferase de renilla, chamado a

partir de agora de ‘valor de Renilla’. A expressão da luciferase de *Renilla* é utilizada como controle de transfecção, o esperado é que todas as células apresentem a mesma proporção de transfecção e um sinal de luminescência parecido para a degradação do substrato da luciferase de *Renilla* (valor de *Renilla*). Se esse sinal for muito menor em relação ao dos controles positivos e negativos da placa, podemos atribuir à diminuição do sinal dos poços tratados a uma citotoxicidade dos extratos, pois devido à morte celular não haveria transcrição da luciferase de *Renilla*. Esse parâmetro é indireto e foi utilizado somente como teste rápido para avaliar qual concentração dos extratos seria utilizada.

3.8. Ensaio antidesnaturação em albumina sérica bovina (BSA)

De acordo com trabalhos publicados por Mizushima e Kobayashi (1968) e Puglia *et al.* (2006), o ensaio se baseia na capacidade do extrato em inibir a desnaturação da proteína (BSA), provocada pela temperatura elevada. Quando a BSA é aquecida, ele sofre desnaturação e expressa antígenos associados à hipersensibilidade do tipo III. Desta forma este ensaio é passível de aplicação para os compostos com capacidade de estabilizar a proteína em processo de desnaturação. As consequências da perda estrutural das proteínas desnaturadas resultam na diminuição da solubilidade em água.

Para realização dos ensaios, 2 mg dos extratos brutos, frações ou diclofenaco de sódio (padrão positivo) foram dissolvidos em 20 μL de DMSO e 980 μL de tampão fosfato (pH 7,4), obtendo-se uma solução teste de 2 mg/mL. O controle negativo foi obtido utilizando-se 20 μL de DMSO e 980 μL de tampão fosfato (pH 7,4). Em placa de 96 poços foi realizada a seguinte montagem, como apresentada na Figura 4.

	PADRÃO			AMOSTRA 1			AMOSTRA 2			AMOSTRA 3		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50 μL controle negativo											
B	150 μL de H_2O + 50 μL AMOSTRA (2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)											
C	100 μL de AMOSTRA (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)											
D	50 μL de tampão pH 7,4 + 50 μL de AMOSTRA (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)											
E	50 μL de tampão pH 7,4 + 50 μL de AMOSTRA (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)											
F	50 μL de tampão pH 7,4 + 50 μL de AMOSTRA (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)											
G	50 μL de tampão pH 7,4 + 50 μL de AMOSTRA (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)											
H	50 μL de tampão pH 7,4 + 50 μL de AMOSTRA (62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)											
	descarte											

Figura 4 – Quadro de diluição amostras para análise por BSA.

Foram adicionados 150 μL de solução BSA a 1% nos poços das linhas A, C, D, E, F, G e H e incubar a 37 °C numa incubadora durante 15 min, obtendo-se uma concentração final de 1000 $\mu\text{g/mL}$. A desnaturação foi induzida, mantendo as misturas a 60 °C em um Banho Maria durante 10 min. Após o tempo de desnaturação as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e a turbidez medida em 660 nm em espectrofotômetro. Calculou-se a porcentagem de inibição da desnaturação através da Equação 1.

$$\% \text{ estabilização da proteína} = 100 - \frac{[\text{Absorbância do teste} - \text{Absorbância do branco}]}{\text{Absorbância do teste em água}} * 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

3.9. Atividade antioxidante

3.9.1. Por 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A atividade antioxidante foi avaliada através do ensaio de DPPH. Esse ensaio se baseia na medida do decaimento da absorbância em 515 nm da solução de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila contendo substâncias antirradicalares. O teste foi realizado em uma placa de micro diluição de 96 poços de acordo com a metodologia descrita por Huang *et al.* (2005) e Cabral *et al.* (2009). Para cada amostra foram feitas diluições seriadas para obter uma concentração final de amostra nos poços de 200 $\mu\text{g/mL}$ até 6 $\mu\text{g/mL}$, adicionados 100 μL de tampão acetato 0,1M (pH 5,5), e 50 μL de uma solução metanólica de DPPH ($2,77 \times 10^{-4}$) e foi realizada uma curva de calibração usando quercetina como padrão. Esta substância foi utilizada como controle positivo da reação e como controle negativo usaram-se os diluentes. O progresso da reação foi medido pela absorbância usando um espectrofotômetro ($\lambda = 517 \text{ nm}$) realizando medidas a cada 10 minutos durante um total de 60 minutos. A porcentagem de redução do DPPH foi calculada segundo a Equação 2.

$$\% \text{ DPPH} = 100 - \left(\frac{[\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco}]}{\text{Absorbância do controle}} * 100 \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

Posteriormente, foi calculada a equação da hipérbole a partir do valor da porcentagem de redução do DPPH, e com esses dados se calcula o valor de CE_{50} para cada amostra. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.9.2. Por ORAC_{FL}

A capacidade antioxidante dos extratos também foi mensurada utilizando-se o ensaio ORAC_{FL} com fluoresceína como sonda fluorescente e AAPH (cloreto de (2,2'-azobis (2-amidipropano)) como fonte de radicais livres. Os experimentos foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços de acordo com metodologia descrita por Ou *et al.* (2001) e Prior *et al.* (2003). Para tanto foram preparadas soluções estoques dos extratos (50 mg/mL), em etanol/DMSO (50:50) e diluídas 100, 500, 1000, 5000 e 10000 vezes com tampão fosfato (pH 7,05), adicionando 50 µL de cada diluição nos poços, junto com 100 µL de fluoresceína e finalmente 50 µL de AAPH. O Trolox ((ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) - análogo da vitamina E) é usado como substância de referência nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,50; 25,00 e 50,00 µM, empregando-se o mesmo sistema diluente. A leitura foi realizada utilizando-se filtro fluorescente (excitação $\lambda=485\text{nm}$ e emissão $\lambda=528\text{nm}$) em leitor de microplaca monitorando-se a cinética de reação a cada 2 min por um período de 70 minutos (temperatura=37°C). Os resultados foram expressos como µmol de Trolox equivalente (TE) por grama de extrato ou fração (µmol de TE/g). Como controle positivo utiliza-se a quercetina e como controle negativo a solução diluente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.10. Atividade antimicrobiana

3.10.1. Formação de halo em perfuração em Agar

Foi efetuado um ensaio biológico *in vitro* frente a bactérias (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *S. pyogenes* e *E. coli*) cepas padrão ATCC. Inicialmente foi realizada uma determinação preliminar da atividade antimicrobiana das amostras pelo método de difusão em ágar, empregando-se o método de poço em camada dupla, inicialmente descrito por Grove e Randall (1955). No plaqueamento, para as bactérias, a camada base foi obtida pela adição de 20,0 mL de Müller Hinton Medium (Difco)-MH, em placas de 20 x 150 mm. Após a solidificação adicionam-se 5,0 mL de MH (5×10^8 UFC/mL) obtendo-se, assim, a camada *seed*. A seguir foram confeccionados poços com 5,0 mm de diâmetro e em cada poço aplicados 20 µL das soluções controle (positivo e negativo) e dos extratos, nas concentrações de 5,00 mg/mL e 2,50 mg/mL. Como controles positivos foi usada bacitracina (0,20 UI/mL) e como controles negativos os solventes usados. As placas-testes foram incubadas durante 24 horas a 37°C. Decorrido o período de incubação, as zonas de inibição do desenvolvimento microbiano foram mensuradas em termos de diâmetro (halo) e aro da borda do poço a início

do desenvolvimento, em milímetros.

4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Todos os ensaios foram realizados no mínimo em triplicata. Os valores dos ensaios foram representados como a média \pm erro padrão da média dos três experimentos e os dados obtidos a partir deste estudo foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) seguido teste "t" de student. Sendo a diferença considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

Os extratos (aquosos e hidroetanólicos de *M. glomerata* e *M. laevigata*) foram comparados em relação à sua atividade anti-inflamatória, medida pelos diversos métodos descritos, e a sua composição química. Os teores de cumarina, ácido o-cumárico, ácido p-cumárico, umbeliferona, ácido caurenóico, ácido grandiflórico, ácido cupressênico e ácido clorogênico de cada extrato foram quantificados. Para comparar o perfil obtido no cromatograma de cada extrato, foram extraídas as áreas dos picos encontrados e estas informações foram correlacionadas com os resultados das análises, procurando indicadores de compostos que sejam responsáveis pela sua atividade anti-inflamatória.

O método de avaliação do efeito sobre células musculares e epiteliais de epiderme e de brônquios possibilitou avaliar a toxicidade e as características de regeneração tecidual em órgãos de efeito direto com o processo inflamatório.

Os testes de atividade antioxidante possibilitaram avaliar a concentração necessária para que ocorra a inibição e neutralização de moléculas potencialmente danosas a células, como radicais livres, e que possuem estreita ligação com o desencadeamento da resposta inflamatória, em relação ao controle positivo com potencial conhecido.

Já a avaliação do potencial inibitório a proliferação bacteriana proporcionou um perfil de atividade para cada extrato, indicando a concentração mínima capaz de inativar bactérias patogênicas e possivelmente envolvidas no processo inflamatório.

5. RESULTADOS

5.1. Composição dos extratos brutos por UHPLC-MS

A concentração presente em cada amostra é determinada através da equação da reta obtida através da análise da curva de calibração preparada com uma mistura de padrões comerciais para cada componente de interesse em meio aquoso similar ao utilizado na leitura das amostras. As curvas de cada componente são apresentadas nas Figuras 5 - 11 e

estruturadas para que as concentrações observadas no conjunto de amostras estejam alocadas no centro da linha de tendência, adequando assim a equação da reta ao bloco de amostras analisado. Os tempos de retenção e o limite de detecção estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Padrões comerciais, razão massa/carga (m/z), modo de ionização (MS), faixa de tempo de retenção (tR) e Limite de detecção (LD)

Composto	m/z	MS	tR (min)	LD ($\mu\text{g/mL}$)
Cumarina	147	+	4,78 - 4,98	0,32
Umbeliferona	163	+	3,32 - 3,52	1,00
Ácido p-cumárico	163	-	3,08 - 3,28	1,00
Ácido o-cumárico	163	-	4,47 - 4,67	0,75
Ácido caurenóico	301	-	8,81 - 9,05	0,50
Ácido cupressênico	301	-	9,50 - 9,70	0,50
Ácido grandiflórico	317	-	6,92 - 7,12	5,00
Ácido clorogênico	353	-	1,73 - 1,93	4,18

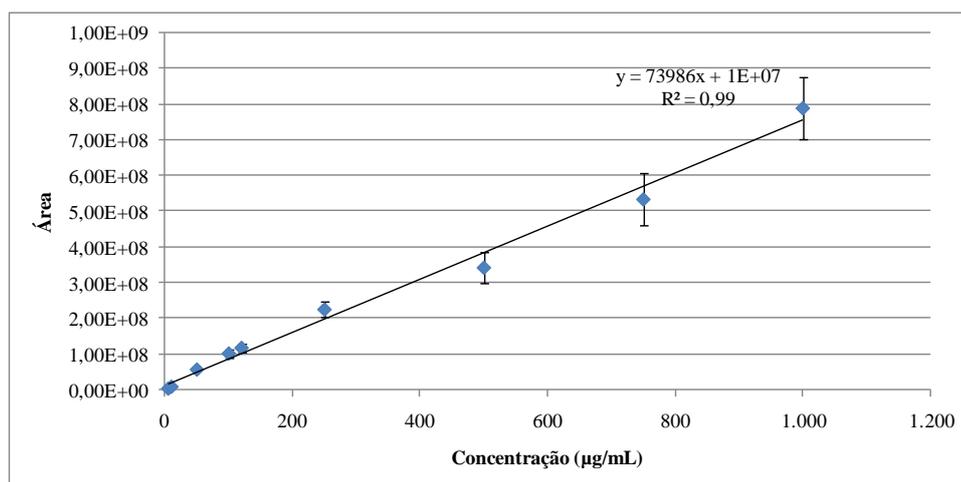


Figura 5 – Gráfico de correlação entre a concentração de cumarina e a área dos picos para íon selecionado MS + m/z 147 para extratos de *M. laevigata*.

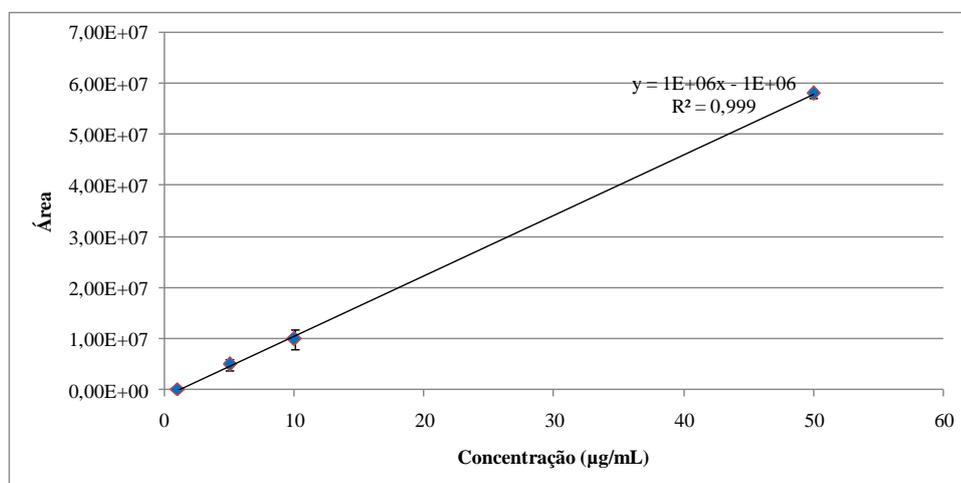


Figura 6 – Gráfico de correlação entre a concentração de cumarina e a área dos picos para íon selecionado MS + m/z 147 para extratos de *M. glomerata*.

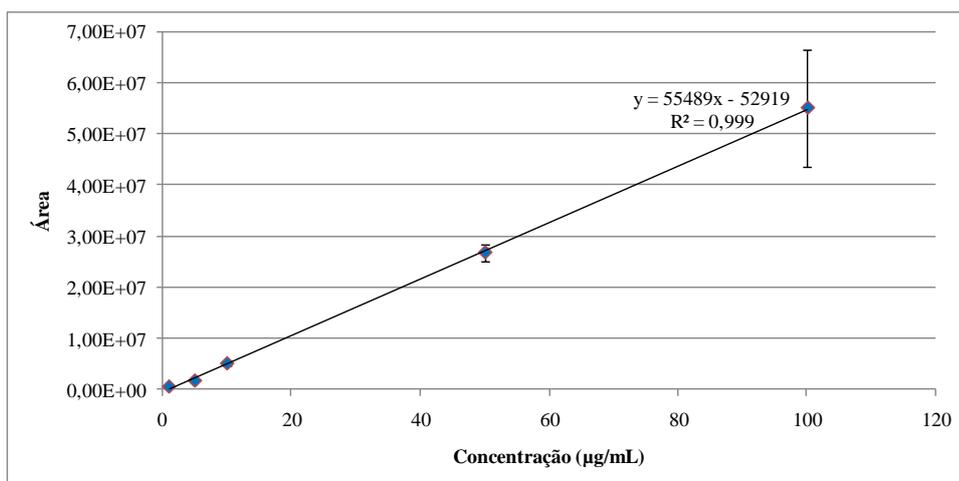


Figura 7 – Gráfico de correlação entre a concentração de umbeliferona e a área dos picos para íon selecionado MS+ m/z 163 para extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

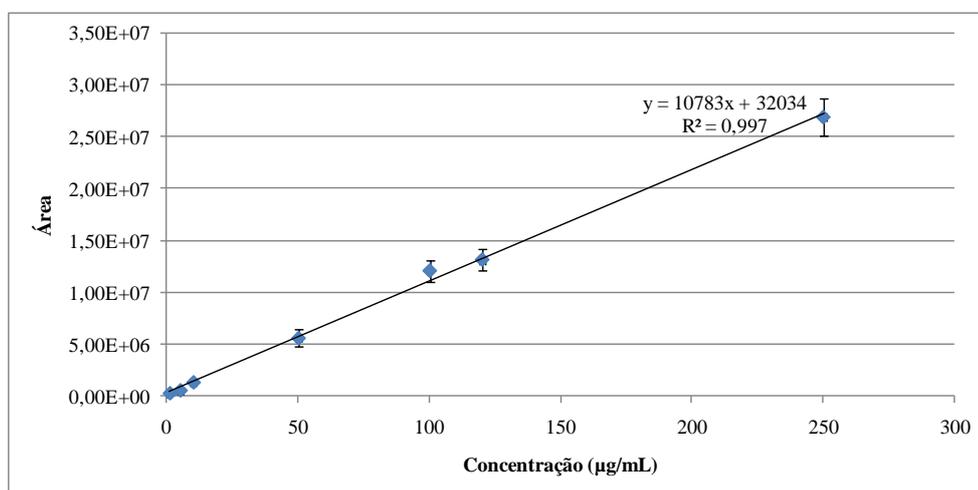


Figura 8 – Gráfico de correlação entre a concentração de ácido o-cumárico e a área dos picos para íon selecionado MS- m/z 163 para extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

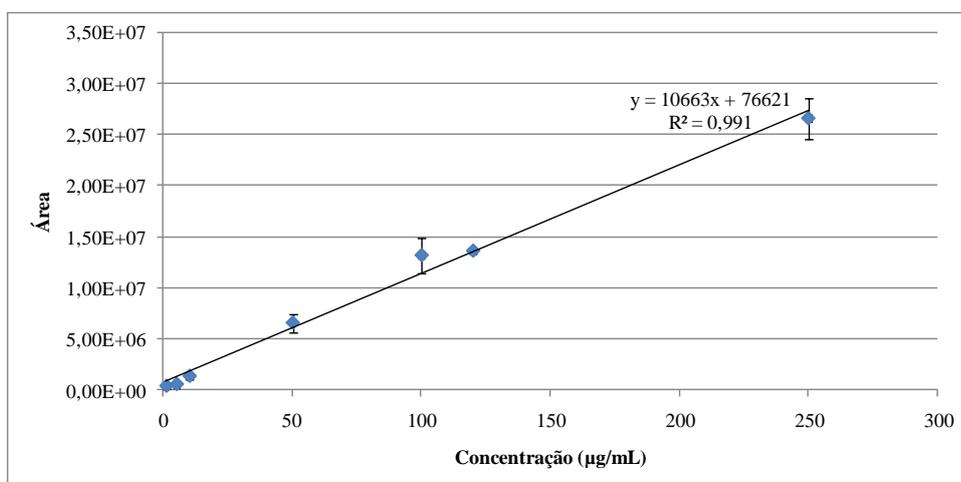


Figura 9 – Gráfico de correlação entre a concentração de ácido p-cumárico e a área dos picos para íon selecionado MS- m/z 163 para extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

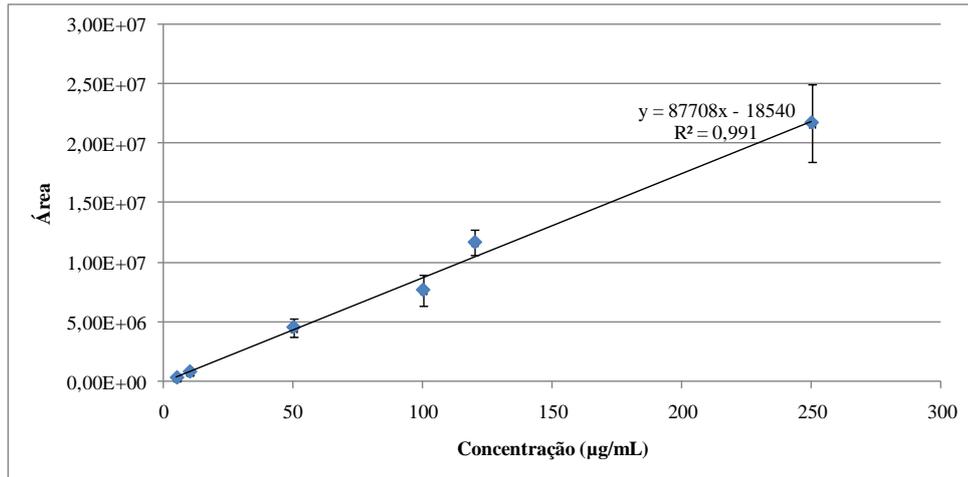


Figura 10 – Gráfico de correlação entre a concentração de ácido grandiflórico e a área dos picos para íon selecionado MS- m/z 317 para extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

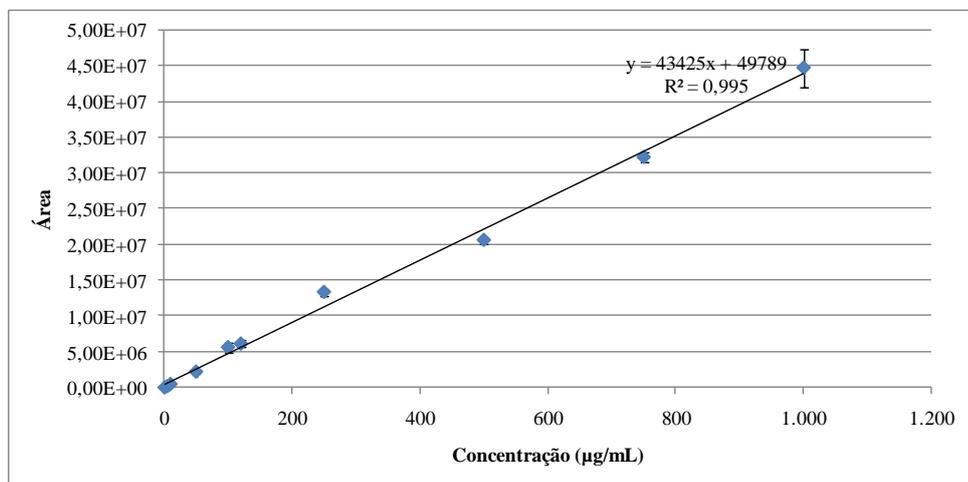


Figura 11 – Gráfico de correlação entre a concentração de ácido clorogênico e a área dos picos para íon selecionado MS- m/z 353 para extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

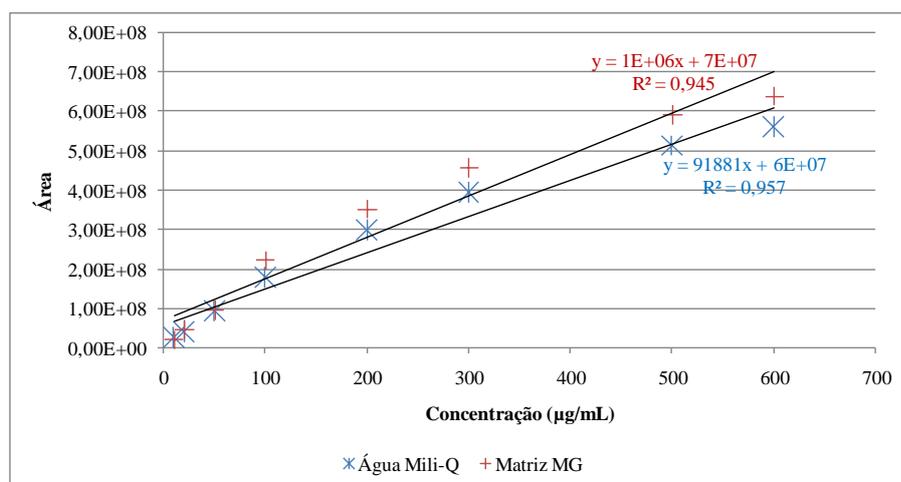


Figura 12 – Gráfico de influência da matriz sobre a concentração de cumarina em curva de calibração elaborada em H_2O e \blacksquare extrato de *M. glomerata* com cumarina abaixo do limite de quantificação.

O gráfico comparativo apresentado na Figura 12 demonstra que ocorre efeito de matriz quando comparada a curva elaborada em meio aquosos ou em extrato matriz. De acordo com Pinho *et al.* (2009), as curvas de calibração podem ser ajustadas para eliminação da influência da matriz, igualando-se as equações de linearização obtidas para as duas curvas. A Equação 3 para obtenção da concentração real presente na amostra, quando utilizado a equação em que as soluções-padrão foram preparadas em solvente puro, onde a constante B da função de correção representa a relação entre os coeficientes e a constante A representa a razão entre os coeficientes angulares originais.

$$X_{pm} = AX_{ps} + B \rightarrow X_{pm} = \left(\frac{a_{ps}}{a_{pm}}\right)X_{ps} + \left[\frac{(b_{ps}-b_{pm})}{a_{pm}}\right] \text{ (Eq.3)}$$

Em que:

X = Concentração

a = coeficiente angular

b = coeficiente linear

ps = padrão em solvente puro

pm = padrão em extratos da matriz

Segundo mesmo trabalho, quando apenas o coeficiente angular (a) nas duas curvas analíticas para o mesmo composto é diferente, significa que os componentes da matriz introduzem um erro sistemático proporcional e a função de correção pode ser corrigida pela Equação 4.

$$X_{pm} = AX_{ps} \text{ (Eq. 4)}$$

Quando apenas o coeficiente linear (b) difere, quando se comparam as duas curvas, significa que houve um erro sistemático constante, e a função de correção pode ser corrigida pela Equação 5.

$$X_{pm} = X_{ps} + B \text{ (Eq. 5)}$$

Para quando ambos os erros ocorrem, sendo os dois coeficientes distintos para as duas curvas, utiliza-se a função completa na Equação 3.

Para a obtenção da concentração real de cumarina presente na amostra, utilizou-se neste caso a Equação 4.

5.2. Análise comparativa da fragmentação do íon selecionado padrão comercial e extrato vegetal em UHPLC-MS/MS.

Os cromatogramas obtidos para cada uma das espécies empregadas e o tipo de extração estão apresentados nas Figuras 13 e 14.

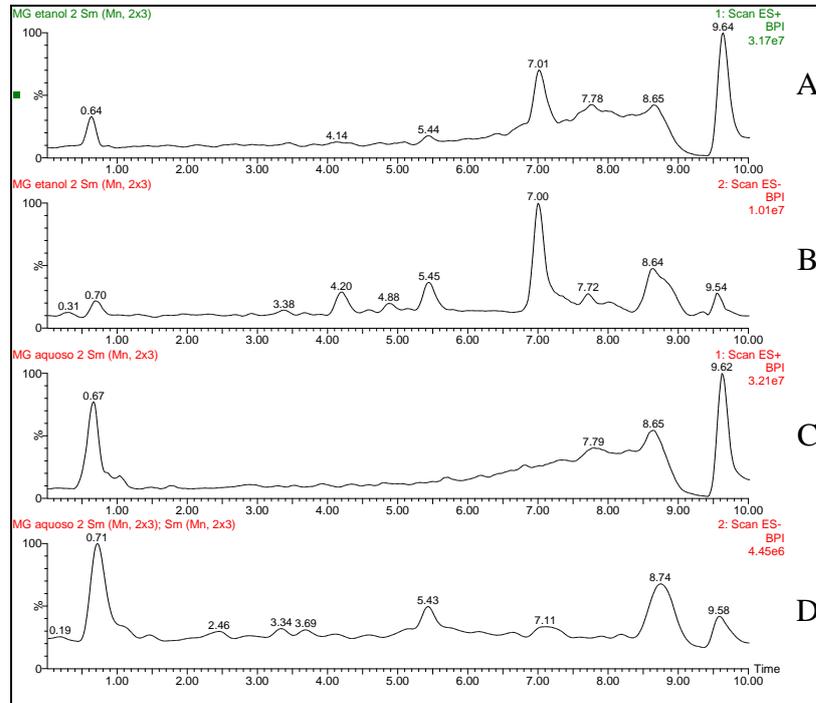


Figura 13 – Cromatogramas UHPLC – MS obtido para extrato de *M. glomerata*, onde: (A e B) Extração Hidroetanólica; (C e D) Extração aquosa; (A e C) ESI+ e (B e D) ESI-.

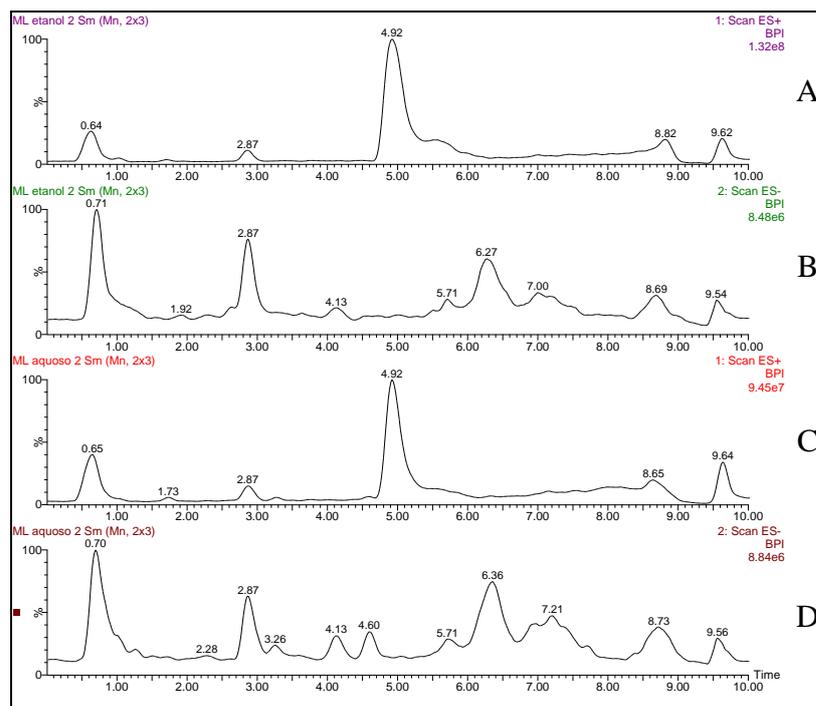


Figura 14 – Cromatogramas UHPLC – MS obtido para extrato de *M. laevigata*, onde: (A e B) Extração Hidroetanólica; (C e D) Extração aquosa; (A e C) ESI+ e (B e D) ESI-.

Visando a confirmação da identidade dos compostos identificados apresentados para as amostras de *M. laevigata* e *M. glomerata*, foram desenvolvidas análises de íon fragmento, comparando-se entre os provenientes da fragmentação dos padrões comerciais e destes mesmos íons observados nas amostras. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 15–21 e no Tabela 4.

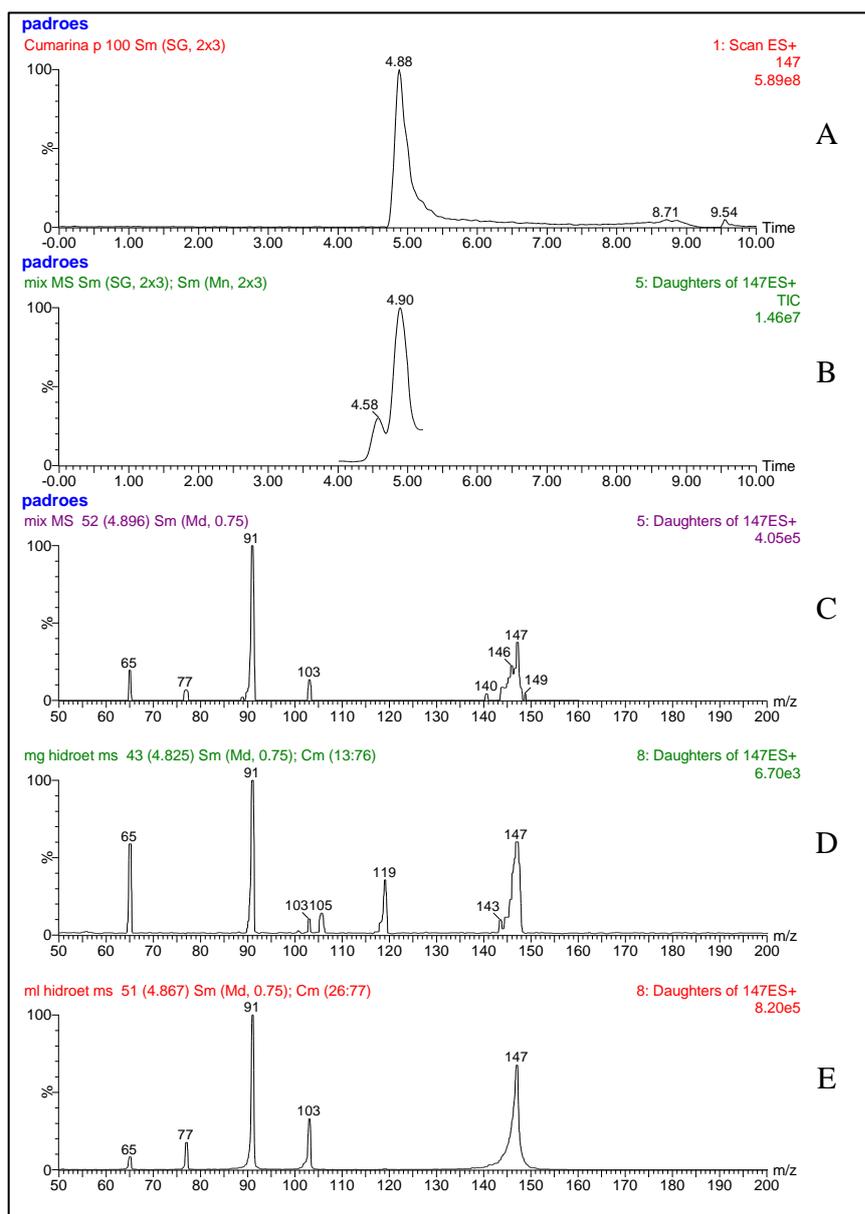


Figura 15 – Comparação do perfil dos cromatogramas obtidos para padrão de cumarina ($C_{\text{Cumarina}} = 100 \mu\text{g/mL}$) (A) Cromatogramas UHPLC – MS; (B) Cromatograma UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 147$, ES+, tR 4,0 – 5,2 min em mistura de padrões (cumarina, ácido o-cumárico, ácido p-cumárico, umbeliferona, ácido caurenóico e ácido clorogênico; Conc. 100 µg/mL cada); (C) Espectro UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 147$ tR 4,88 min, fragmento principal $m/z = 91$; com os espectros UHPLC – MS/MS obtidos para o extrato hidroetanólico de amostras frescas de (D) *M. glomerata* e (E) *M. laevigata*.

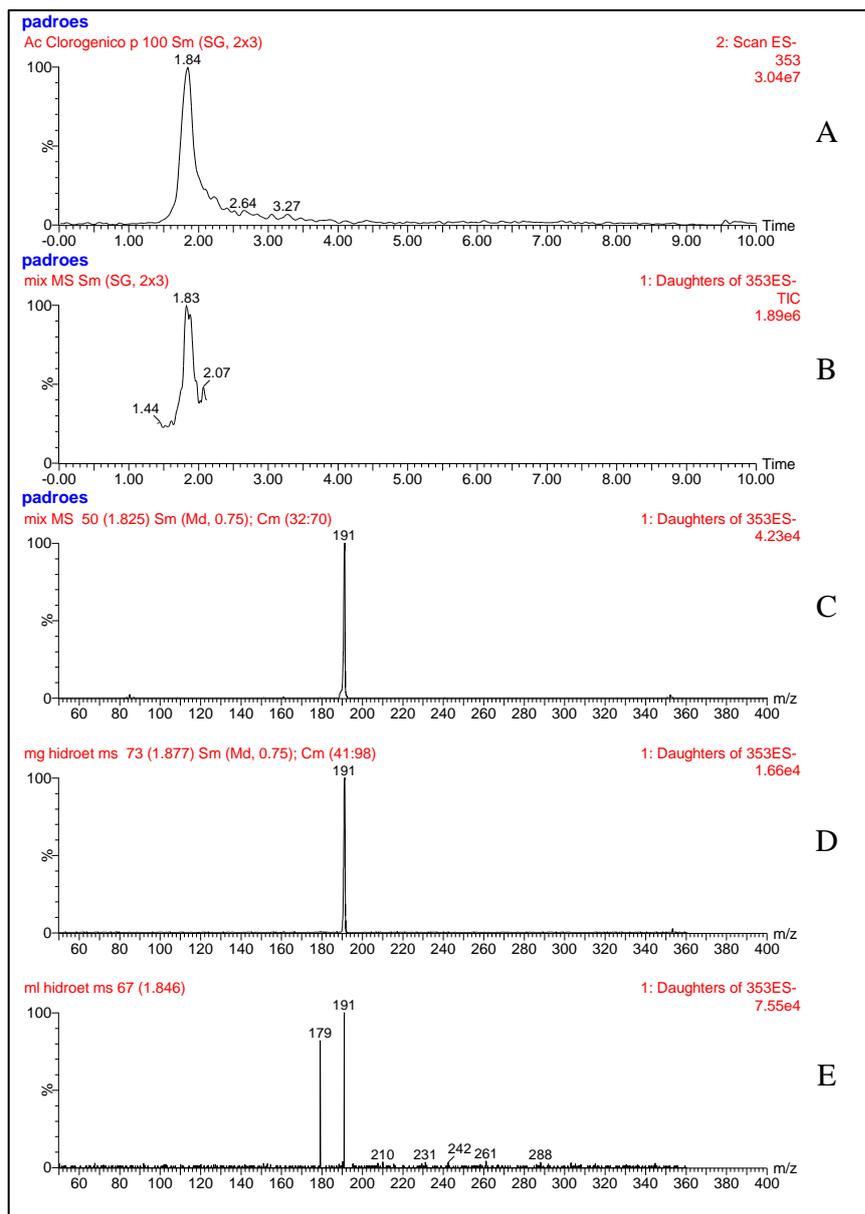


Figura 16 – Comparação do perfil dos cromatogramas obtidos para padrão de ácido clorogênico ($C_{\text{Ác. Clorogênico}} = 100 \mu\text{g/mL}$) (A) Cromatogramas UHPLC – MS; (B) Cromatograma UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 353$, ES-, tR 1,2 – 2,2 min em mistura de padrões (cumarina, ácido o-cumárico, ácido p-cumárico, umbeliferona, ácido caurenóico e ácido clorogênico; Conc. $100 \mu\text{g/mL}$ cada); (C) Espectro UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 353$ tR 1,83 min, fragmento principal $m/z = 191$; com os espectros UHPLC – MS/MS obtidos para o extrato hidroetanólico de amostras frescas de (D) *M. glomerata* e (E) *M. laevigata*.

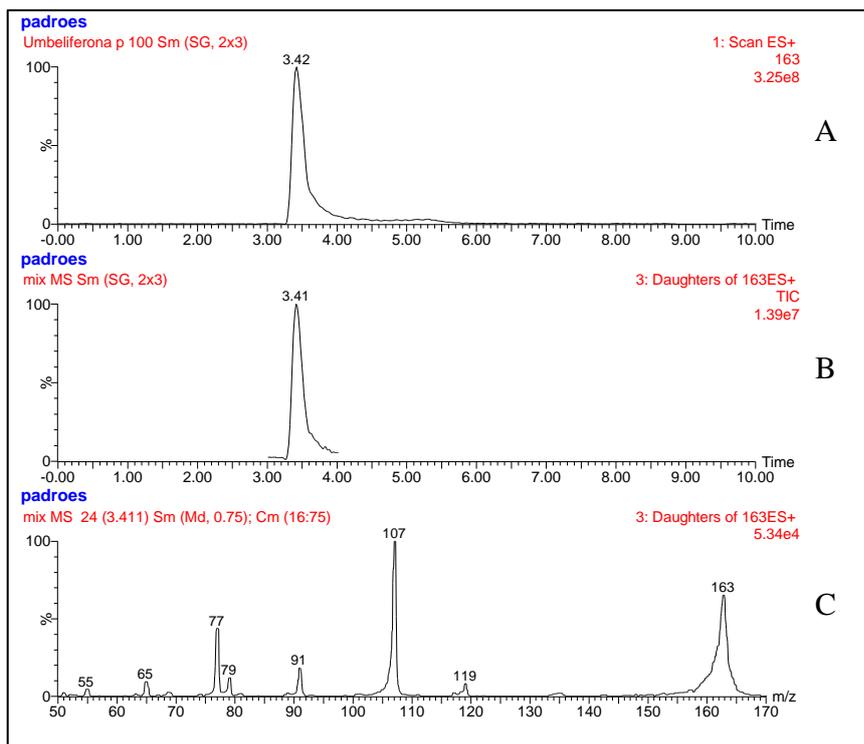


Figura 17 – Comparação do perfil dos cromatogramas obtidos para padrão de umbeliferona ($C_{\text{Umbeliferona}} = 100 \mu\text{g/mL}$) (A) Cromatogramas UHPLC – MS; (B) Cromatograma UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 163$, ES+, tR 3,0 – 4,0 min em mistura de padrões (cumarina, ácido o-cumárico, ácido p-cumárico, umbeliferona, ácido caurenóico e ácido clorogênico; Conc. 100 $\mu\text{g/mL}$ cada); (C) Espectro UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 163$ tR 3,41 min, fragmento principal $m/z = 107$, (Extratos >LD).

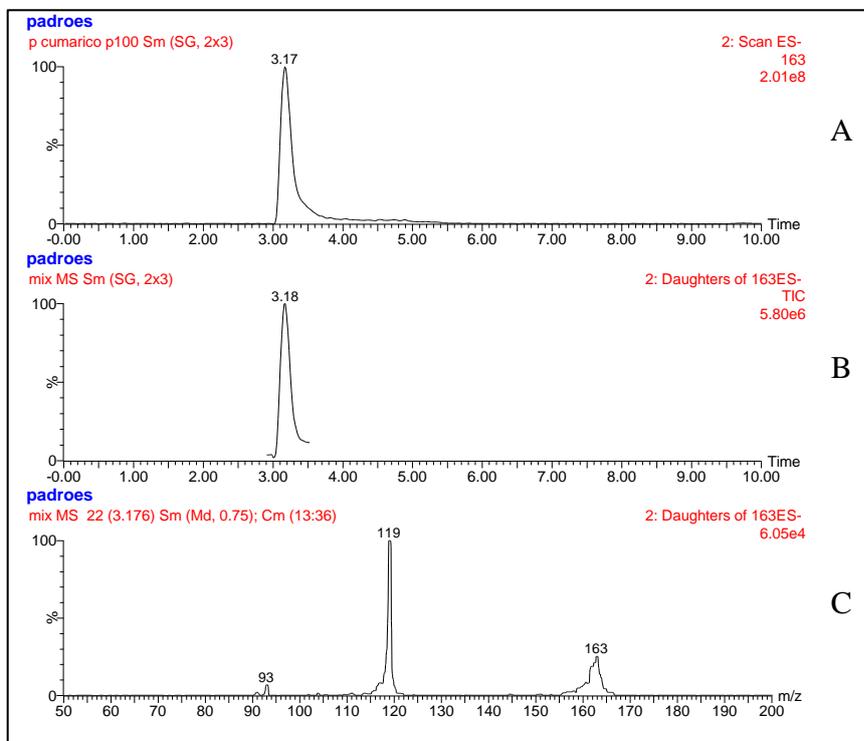


Figura 18 – Comparação do perfil dos cromatogramas obtidos para padrão de ácido p-cumárico ($C_{\text{Ác. p-cumárico}} = 100 \mu\text{g/mL}$) (A) Cromatogramas UHPLC – MS; (B) Cromatograma UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 163$, ES-, tR 2,9 – 3,5 min em mistura de padrões (cumarina, ácido o-cumárico, ácido p-cumárico, umbeliferona, ácido caurenóico e ácido clorogênico; Conc. 100 $\mu\text{g/mL}$ cada); (C) Espectro UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 163$ tR 3,18 min, fragmento principal $m/z = 119$, (Extratos >LD).

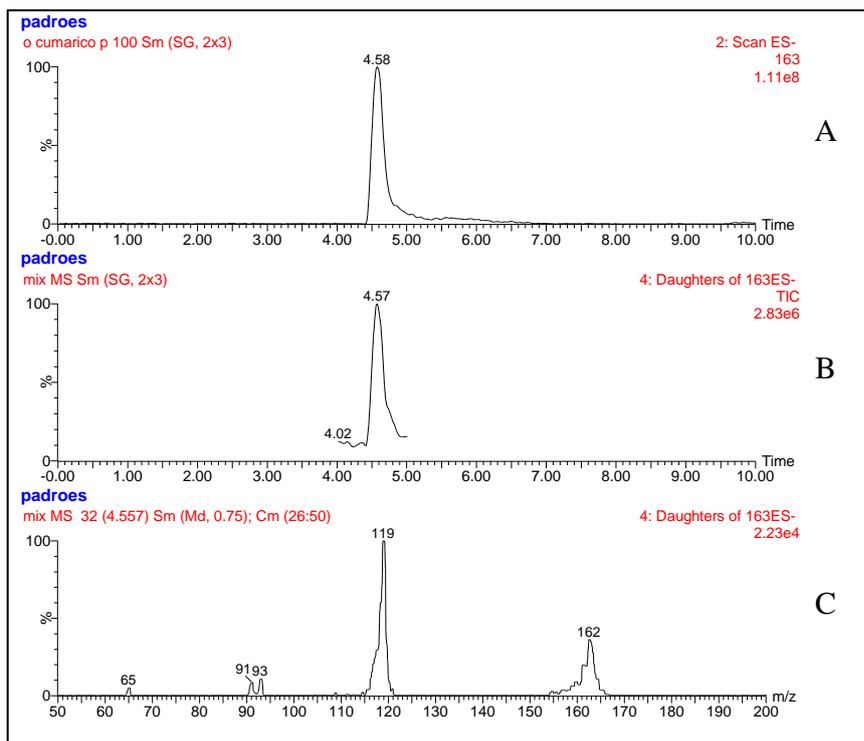


Figura 19 – Comparação do perfil dos cromatogramas obtidos para padrão de ácido o-cumárico ($C_{\text{Ác. o-cumárico}} = 100 \mu\text{g/mL}$) (A) Cromatogramas UHPLC – MS; (B) Cromatograma UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 163$, ES-, tR 4,0 – 5,0 min em mistura de padrões (cumarina, ácido o-cumárico, ácido p-cumárico, umbeliferona, ácido caurenóico e ácido clorogênico; Conc. 100 $\mu\text{g/mL}$ cada); (C) Espectro UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 163$ tR 4,56 min, fragmento principal $m/z = 119$.

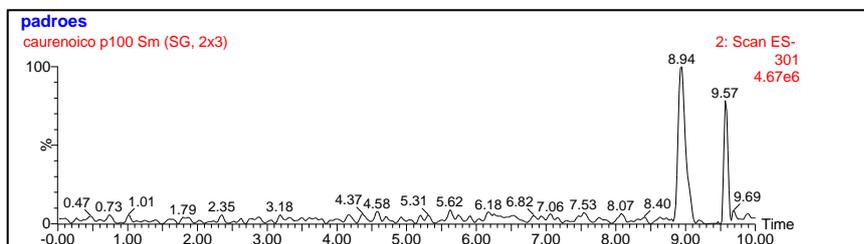


Figura 20 – Comparação do perfil dos cromatogramas obtidos para padrão de ácido caurenóico ($C_{\text{Ác. caurenóico}} = 100 \mu\text{g/mL}$) Cromatogramas UHPLC – MS; íon selecionado, $m/z = 301$, ES-, tR 8,0 – 9,5 min em mistura de padrões (cumarina, ácido o-cumárico, ácido p-cumárico, umbeliferona, ácido caurenóico e ácido clorogênico; Conc. 100 $\mu\text{g/mL}$ cada), não há fragmentação.

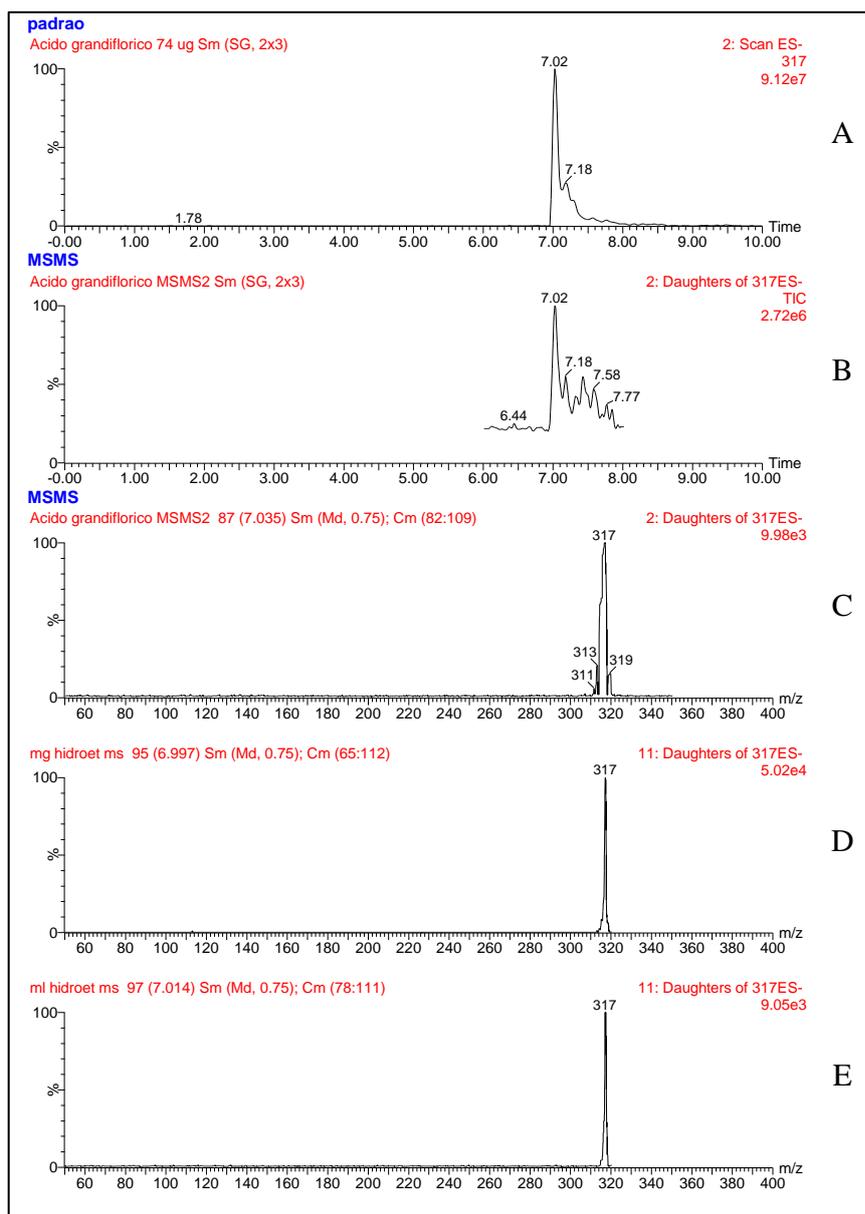


Figura 21 – Comparação do perfil dos cromatogramas obtidos para padrão de ácido grandiflórico ($C_{\text{Ac. grandiflorico}} = 74 \mu\text{g/mL}$) (A) Cromatogramas UHPLC – MS; (B) Cromatograma UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 301$, ES-, tR 6,0 – 8,0 min; (C) Espectro UHPLC – MS/MS íon selecionado, $m/z = 317$ tR 7,01 min, não há fragmentação; com os espectros UHPLC – MS/MS obtidos para o extrato hidroetanólico de amostras frescas de (D) *M. glomerata* e (E) *M. laevigata*.

As análises resultantes da fragmentação dos íons selecionados nas amostras são compatíveis com os obtidos para os fragmentos apresentados pelos padrões comerciais ou doados. Os ácidos caurenóico e grandiflórico, devido a sua estrutura terpênica rígida, não apresentaram fragmentação elucidativa, mas foram identificados com base no tempo de retenção e m/z do íon, possibilitando afirmar com mais precisão a identidade dos íons classificados e de posse das já citadas curvas de calibração. Estas informações estão resumidas na Tabela 4.

Tabela 4: Comparação da composição dos extratos obtidos para amostras de *M. laevigata*, *M. glomerata*.

Substâncias confirmadas	m/z Modo positivo	m/z Modo negativo	Tempo Retenção	MS/MS		Amostras encontradas (Sim/Não)										Identificado por padrão	Identificado por fragmentação		
				ESI+	ESI-	MG fresco		ML fresco		MG seco		ML seco							
				m/z	m/z	Hidroet	Aquoso	Hidroet	Aquoso	Hidroet	Aquoso	Hidroet	Aquoso	Hidroet	Aquoso				
Cumarina	147	-	4,88	91	103	-	-	-	-	N	N	S	S	N	S	S	S	S	
Ácido Clorogênico	163	353	1,83	163	-	179	191	212	212	S	S	N	N	S	S	S	N	S	S
Umbeiferona	163	161	3,42	77	107	-	-	-	-	N	N	N	N	N	S	S	S	S	S
o-cumárico	147	163	4,57	-	-	93	119	-	-	N	N	S	S	N	N	S	S	S	S
p-cumárico	147	163	3,18	-	-	93	119	-	-	N	N	S	S	N	N	S	S	S	S
Ácido Caurenóico	-	301	8,91	-	-	301	-	-	-	S	N	S	S	S	S	S	N	S	S
Ácido Grandiflorico	-	317	7,02	-	-	317	-	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
cis/trans metilósídeo	165	325	2,84	-	-	119	163	-	-	N	N	S	S	N	S	S	S	N	S
disacarídeo + cloro	-	377	0,68	-	-	179	341	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	N	S
disacarídeo + sódio	365	-	0,68	185	203	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	N	S
Ácido Dicafeoilquínico	499	515	4,16	163	-	179	191	353	353	S	N	N	N	S	S	S	N	N	S
Ácido Tricafeoilquínico	499	677	5,57	163	-	353	515	-	-	S	N	N	N	S	S	N	N	N	S

Fragmento mais intenso

5.3. Concentração dos compostos identificados em cada tipo de extrato

As concentrações dos componentes já identificados presentes nos extratos aquosos secos obtidos das amostras das espécies *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata*, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Composição dos extratos aquosos das duas espécies de *Mikania* (mg/g)

Composto (mg/g de extrato)	<i>Mikania laevigata</i>	<i>Mikania glomerata</i>
Cumarina (m/z 147)	13,46	0,023
Umbeliferona (m/z 163)	0,022	0,028
Ácido o-Cumárico (m/z 163)	2,55	Nd
Melilotosideo (m/z 325)	3,15	0,012
Ácido Caurenóico (m/z 301)	Nd	0,121
Ácido Grandiflórico (m/z 317)	0,673	0,146
Ácido Clorogênico (m/z 353)	Nd	2,56
Ácido Dicafeoilquínico (m/z 515)	Nd	1,49
Ácido Tricafeoilquínico (m/z 677)	Nd	0,303

*Nd = não detectado

As concentrações dos componentes já identificados presentes nos extratos hidroetanólicos secos obtidos das amostras das espécies de *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata*, estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Composição dos extratos hidroetanólicos das duas espécies de *Mikania* (mg/g)

Composto (mg/g de extrato)	<i>Mikania laevigata</i>	<i>Mikania glomerata</i>
Cumarina (m/z 147)	32,01	Nd
Umbeliferona (m/z 163)	0,117	0,114
Ácido o-Cumárico (m/z 163)	0,159	Nd
Melilotosideo (m/z 325)	7,59	0,017
Ácido Caurenóico (m/z 301)	0,597	2,87
Ácido Grandiflórico (m/z 317)	17,58	2,74
Ácido Clorogênico (m/z 353)	Nd	0,54
Ácido Dicafeoilquínico (m/z 515)	0,32	20,24
Ácido Tricafeoilquínico (m/z 677)	Nd	1,162

*Nd = não detectado

É notável a grande variabilidade na composição dos extratos obtidos, tanto em relação às espécies quando comparados os mesmos tipos de extração, quanto dentro de uma mesma espécie quando modificado o tipo de extração (aquoso ou hidroetanólico).

5.4. Avaliação da citotoxicidade e/ou processos regenerativos

Os extratos hidroetanólicos e aquosos foram avaliados por diferentes ensaios para se avaliar sua atividade terapêutica.

5.4.1. Citotoxicidade dos extratos de *M. laevigata* e *M. glomerata* sobre células musculares, endoteliais e epiteliais.

Foram avaliadas as interferências na viabilidade de células potencialmente existentes no local de aplicação e ação dos componentes dos extratos, possibilitando através deste teste avaliar a interação apenas dos extratos para uma futura fórmula farmacêutica. Os resultados de citotoxicidade estão apresentados na Figura 22.

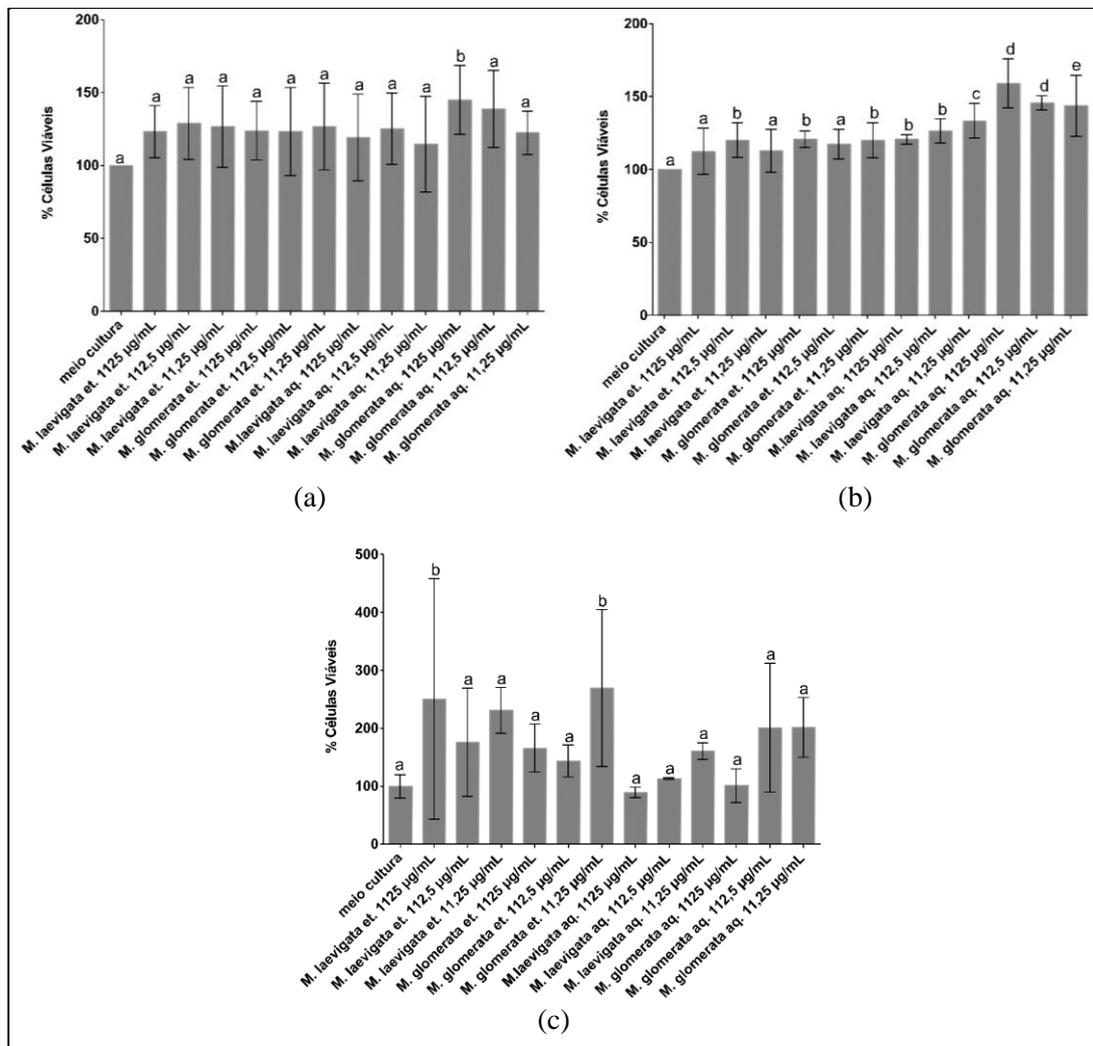


Figura 22 – Gráfico de relação concentração do extrato *versus* viabilidade celular, onde: (a) C2C12 - mioblasto muscular; (b) Tend – endotélio tímico; (c) BEAS - epitélio brônquico. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$.

As porcentagens de viabilidades celular variaram entre (101,1 a 269,5%), indicando estimulação a proliferação celular. O único extrato que demonstrou potencial classificado como levemente citotóxico (Iso, 1999) na concentração mais alta estudada (1125 µg/mL) foi o extrato aquoso de *M. laevigata* para a linhagem celular de epitélio bronquiolar (89% de viabilidade celular). O extrato aquoso de *M. glomerata* na concentração de 1125 µg/mL foi significativamente mais ativo para as células de mioblasto muscular e endotélio tímico. Todos os extratos promoveram a propagação das linhagens celulares estudadas, indicando que estes extratos podem estar relacionados a processos regenerativos de tecido lesado.

5.4.2. Citotoxicidade dos extratos de *M. laevigata* e *M. glomerata* em células tumorais

Foram realizados os testes em linhagens de células tumorais B15, RS4, NB4, CEM, K562, HL60, T-ALL, HEL, NALM6, JURKAT, REH e Ramos, avaliando-se o potencial citotóxico apresentado pelos extratos na concentração de 30 µg/mL em comparação a ação do controle positivo, vincristina. O resultado que justificaria uma ação antitumoral seria a partir de 50% de inibição no teste. Como pode ser observado através da Figura 23, nenhum dos extratos apresentou atividade na concentração empregada. Este resultado não foi surpreendente, devido aos resultados iniciais com células de linhagens não tumorais (musculares, endoteliais e epiteliais – 5.4.1.) confirmando a baixa toxicidade destes extratos.

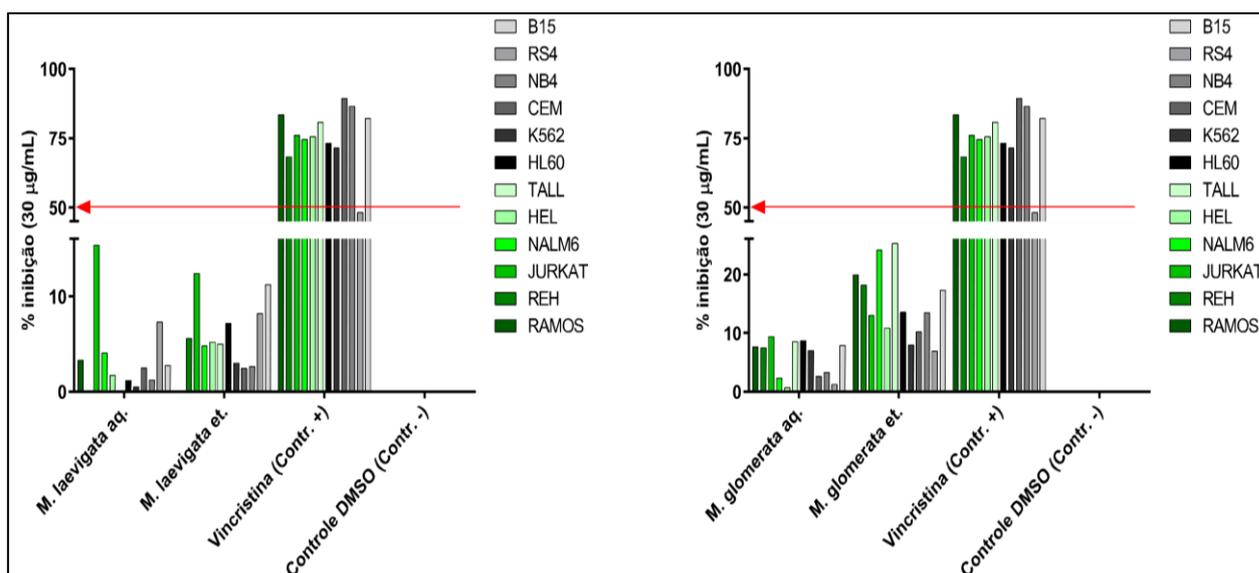


Figura 23 – Gráfico de atividade sobre células tumorais.

5.4.3. Citotoxicidade e transativação do gene repórter PPAR- γ .

Foi realizado um primeiro ensaio com apenas um poço de tratamento para cada um dos extratos em cada uma das concentrações. Este primeiro ensaio possui a finalidade de avaliar qual concentração promove maior ativação do PPAR- γ , portanto, com qual concentração deve ser realizado o ensaio em triplicata. Este ensaio também permitiu avaliar a citotoxicidade aparente dos extratos através da diminuição na transcrição da luciferase de Renilla (controle).

Os extratos testados inicialmente foram de 1000 - 250 $\mu\text{g/mL/poço}$. Os únicos que não apresentaram citotoxicidade foram os extratos hidroetanólicos de *M. laevigata* e *M. glomerata* referentes à concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, como demonstrado na Figura 24. Destes dois extratos, apenas o de *M. glomerata* promoveu uma ativação de 1,4X, sendo que a ativação basal do experimento é considerada 1X. O ligante comercial do PPAR- γ , Rosiglitazona, promoveu uma ativação de 3X.

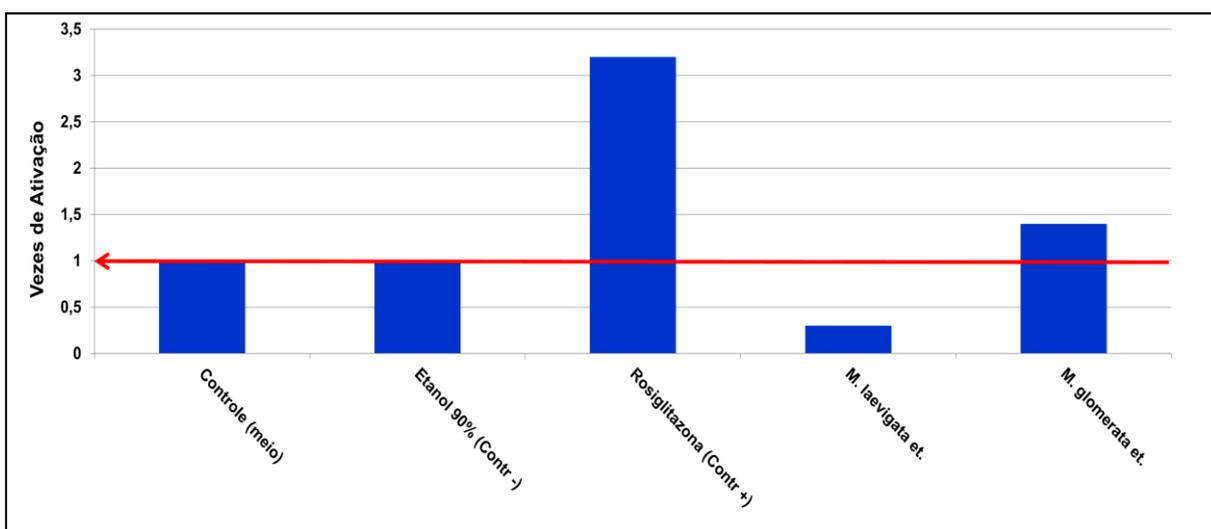


Figura 24 – Gráficos pré-teste para obtenção da concentração de ativação do PPAR- γ .

Como somente o extrato *M. glomerata* hidroetanólico promoveu ativação do PPAR- γ , o ensaio em triplicata foi realizado apenas com esse extrato e os controles, Figura 25. Aproveitou-se para testar a concentração mais diluída: 125 $\mu\text{g/mL/poço}$. Nesse segundo experimento, duas das replicatas desta concentração mais diluída resultaram em citotoxicidade aparente, e apenas o valor de uma replicata foi considerado.

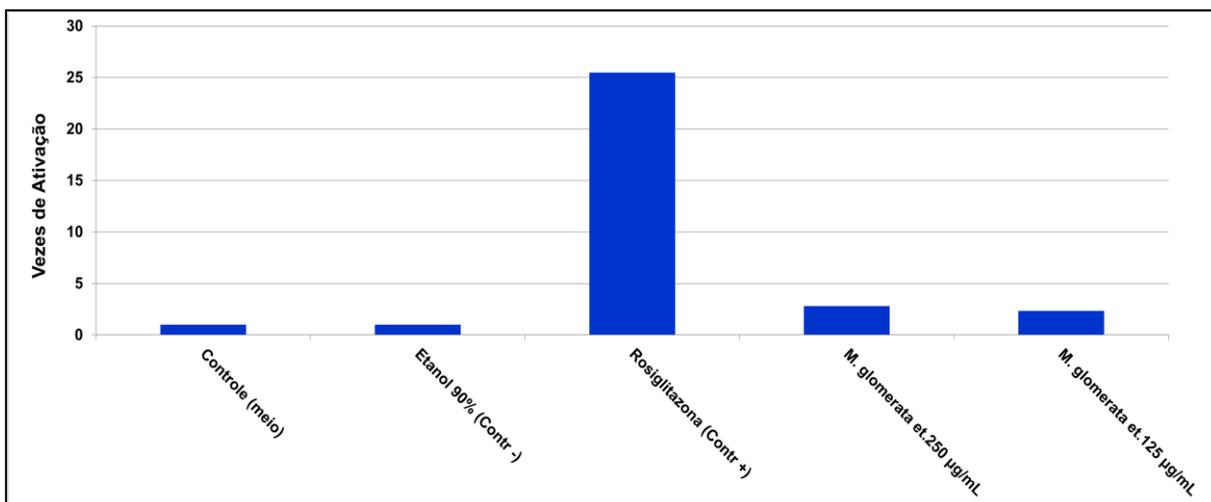


Figura 25 – Gráficos de ativação do PPAR- γ .

A solução estoque do extrato (100 mg/mL) apresentou-se como um líquido heterogêneo, não havendo a dissolução adequada do extrato em meio contendo somente etanol. Para este ensaio foi necessário o uso de uma solução inicial concentrada para que a concentração final por poço estivesse na mesma concentração do ensaio de citotoxicidade em células normais (5.4.1.), possibilitando a comparação dos ensaios. Porém os resultados indicaram citotoxicidade, diferente dos dois testes anteriores, o que não foi esperado. Esta citotoxicidade pode ser devida a uma sensibilidade maior destas células, 293-T (células embrionárias do rim), ou por causa do método usado para medir a citotoxicidade; a luminescência. Especula-se que qualquer formação de precipitado ou micelas no meio que possa reduzir a leitura da luminescência venha a ser atribuída como citotoxicidade (resultado falso). Silva (2015) avaliou a citotoxicidade de extrato seco de *M. glomerata* em concentrações de 7,8 – 500 $\mu\text{g/mL}$ sobre células Vero (fibroblastos de rim de macaco *Cercopithecus aethiops*), observando que a concentração máxima não tóxica para estas células é de 31,2 $\mu\text{g/mL}$. Havendo similaridade entre as células 293-T e a Vero, justificaria a citotoxicidade aparente neste ensaio.

5.4.4. Inibição da desnaturação em albumina sérica bovina (BSA).

O ensaio envolvendo a inibição da desnaturação de albumina está intimamente ligado com a propriedade que o extrato possui em proteger a proteína quando submetida a uma alta temperatura. Na Figura 26, estão expressos os percentuais de inibição para cada um dos extratos e para um padrão positivo, diclofenaco de sódio, nas mesmas concentrações, sendo considerado como inibidora as concentrações que demonstraram resultado igual ou superior a 50%.

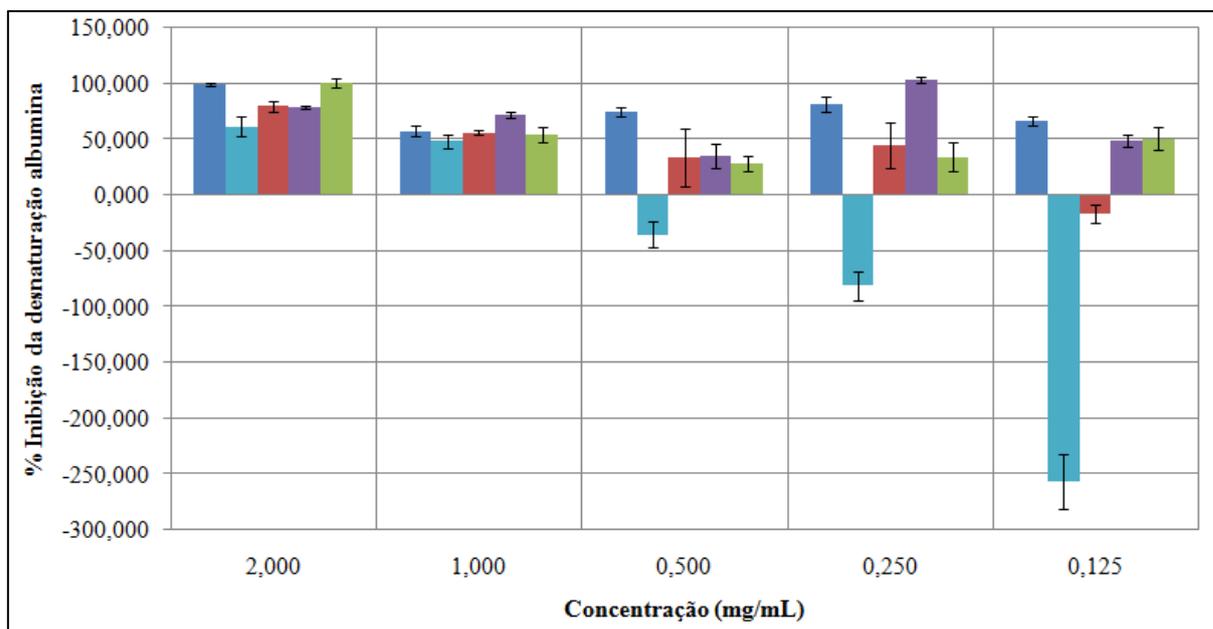


Figura 26 – Gráfico de inibição da desnaturação de albumina a 60 °C, onde: ■ Diclofenaco (padrão positivo); ■ *M. glomerata* et.; ■ *M. glomerata* aq.; ■ *M. laevigata* et.; ■ *M. laevigata* aq..

De acordo com os resultados obtidos, o extrato de *M. glomerata* aquoso possui eficiência na concentração de até 1,0 mg/mL, sendo que abaixo desta, inicia-se um processo de estimulação da desnaturação. O extrato hidroetanólico de *M. glomerata*, mostrou-se capaz de inibir a desnaturação proteica até a concentração de 0,250 mg/mL, abaixo disto estimulou a desnaturação assim como ocorreu no extrato aquoso. Ambos os extratos de *M. laevigata*, apresentaram eficiência de inibição da desnaturação em todas as concentrações testadas, não apresentando resultados que indiquem propriedades desnaturantes intrínsecas ao extrato. O controle positivo, diclofenaco de sódio, apresentou inibição superior a 50% mesmo em baixa concentração, 0,125 mg/mL. As concentrações testadas foram baseadas em estudos anteriores, os extratos de ambas as espécies apresentaram atividade neste ensaio, sendo mais acentuada na *M. laevigata*.

5.4.5. Comparação da atividade citotóxica

A toxicidade aparente sobre as células de epitélio bronquiolar do Mlaq em 1125 µg/mL pode estar relacionada à maior concentração de ácido o-cumárico neste extrato aquoso que apresenta concentração 16 vezes maior que no extrato hidroetanólico (2,55 mg/g *versus* 0,159 mg/g).

Não houve resultados positivos utilizando-se 30 µg/mL de cada um dos quatro tipos de extrato sobre a inibição da proliferação de nenhuma das células tumorais.

Apesar da ativação modesta do gene repórter PPAR- γ acima da ativação basal, não apresentando a toxicidade dos outros extratos, possivelmente pela concentração abaixo do limite de detecção para cumarina e ácido o-cumárico “ausente” apenas neste extrato, quando submetido mesmo em concentração menor, o extrato de Mget foi citotóxico para a célula 293-T (células embrionárias do rim).

A inibição da desnaturação em albumina possivelmente apresentou melhores resultados de inibição para ambos os extratos de MI devido à presença dos compostos fenólicos (cumarina, umbeliferona e ácido o-cumárico) em maior concentração nesta espécie. Apesar do resultado, este teste se mostrou pouco robusto, variando muito os resultados durante as diversas vezes que foi realizado, tornando-se apenas um teste exploratório de atividade.

5.5. Atividade antioxidante

5.5.1. Atividade antioxidante por DPPH

A Tabela 7 apresenta os resultados de concentração capaz de inibir 50% da oxidação do DPPH, em $\mu\text{g/mL}$. O tempo aproximado para estabilização de acordo com os resultados de IC_{50} foi de torno de 30 minutos.

Tabela 7: IC_{50} versus tempo de exposição ($\mu\text{g/mL}$).

	Tempo (min)					
	10	20	30	40	50	60
<i>M. laevigata aq.</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>M. laevigata et.</i>	91,71	74,87	67,02	61,98	58,72	55,66
<i>M. glomerata aq.</i>	14,19	7,52	4,64	2,78	1,44	0,30
<i>M. glomerata et.</i>	99,47	69,17	55,54	47,32	42,21	38,28
Quercetina	0,32	0,10	0,09	0,11	0,13	0,14

nd – não apresentou ação

Como pode ser observado através da Tabela 7, o extrato de *M. glomerata* aquoso foi o que apresentou melhores resultados quanto à inibição do processo oxidativo da molécula do DPPH, possivelmente devido a melhor concentração de ácidos cafeoilquínicos, como ácido clorogênico e dicafeoilquínico com grande potencial antioxidante (Yen *et al.*, 2005; Danino *et al.*, 2009) que no extrato hidroetanólico. Os extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata* hidroetanólicos apresentaram potencial semelhantes entre si. Já o extrato aquoso de *M. laevigata* não apresentou atividade antioxidante.

5.5.2. Atividade antioxidante por ORAC_{FL}

Quando submetido ao teste de ORAC, onde os resultados são expressos em função do Trolox, quanto maior o valor obtido, maior a capacidade antioxidante do extrato. A Tabela 8 apresenta os resultados em $\mu\text{mol Trolox eq./g}$ de extrato, capaz de inibir o processo oxidativo.

Tabela 8: Capacidade antioxidante dos extratos por ORAC ($\mu\text{mol Trolox eq./g}$).

Amostra	$\mu\text{mol Trolox eq./g}$	Cv (%)
<i>M. laevigata aq.</i>	931,5	15,46
<i>M. laevigata et.</i>	592,6	1,53
<i>M. glomerata aq.</i>	1995,3	37,79
<i>M. glomerata et.</i>	2591,2	14,81

Como pode ser observado através da Tabela 8, o extrato de *M. glomerata* primeiramente hidroetanólico e logo a seguir o aquoso foram os que apresentaram melhores resultados quanto à inibição do processo oxidativo, possivelmente devido à presença em grande quantidade de ácidos cafeoilquínicos, como ácido clorogênico e dicafeoilquínico, com grande potencial antioxidante (Yen *et al.*, 2005; Danino *et al.*, 2009). Quando comparados os extratos, o extrato aquoso de *M. laevigata* apresentou maior inibição do processo oxidativo que o hidroetanólico.

5.5.3. Comparação da atividade antioxidante

Os resultados apresentados anteriormente demonstram que a análise de atividade antioxidante, com diferentes mecanismos, podem apresentar resultados divergentes e até opostos. De acordo com os resultados apresentados no teste com DPPH, possivelmente o componente com melhor atividade por esta via é o ácido clorogênico, devido estar em maior concentração no extrato de Mgaq do que nos outros extratos. Possivelmente o ácido caurenóico (não detectado em Mlaq) pode estar relacionado a proteção intermediária de ambos os extratos hidroetanólicos em associação ao ácido clorogênico nestes.

Para o teste de ORAC_{FL}, a associação de ácido dicafeoilquínico, ácido tricafeoilquínico, ácido clorogênico e ácido caurenóico possivelmente está relacionada à atividade antioxidante seguindo esta via.

5.6. Avaliação da atividade antibacteriana em placa de ágar perfurado.

Quando submetido ao teste de difusão em ágar, empregando-se o método de poço em camada dupla, os extratos aquosos não apresentaram nenhuma atividade. Já os extratos hidroetanólicos que apresentaram indícios de ação antimicrobiana frente às bactérias empregadas, devido à formação de halo muito estreito. As concentrações que apresentaram halo estão apresentadas na Tabela 9. As cepas bacterianas utilizadas para este teste foram: *K. pneumoniae* (ATCC4352), *K. pneumoniae* (KP230), *S. aureus* (Rib 1), *S. aureus* (ATCC 25922), *S. aureus* (BEC 9393), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *P. aeruginosa* (31MN), *E.coli* (ATCC25923), *P. aeruginosa* (ATCC27853), *S. mutans* e *S. pyogenes*.

Tabela 9: Relação bactéria concentração de extratos hidroetanólicos que apresentaram atividade (halo).

Bactéria	Extrato	Concentração (mg/mL)
<i>S. aureus</i> (ATCC 25922)	<i>M. laevigata</i>	5,0
	<i>M. glomerata</i>	2,5
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	<i>M. laevigata</i>	5,0
	<i>M. glomerata</i>	5,0
<i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	<i>M. laevigata</i>	-
	<i>M. glomerata</i>	2,5
<i>S. pyogenes</i> (ATCC 19615)	<i>M. laevigata</i>	-
	<i>M. glomerata</i>	5,0
<i>E. coli</i> (ATCC25923)	<i>M. laevigata</i>	5,0
	<i>M. glomerata</i>	5,0

Possivelmente o efeito de baixa solubilidade dos componentes dos extratos hidroetanólicos em ágar, poderia estar ocorrendo, impedindo que o extrato desenvolva suas funções antibacterianas em plenitude. Os resultados indicam que a atividade antimicrobiana não é o principal motivo de seu uso, mas, mesmo nessas concentrações o uso de extratos aquosos e hidroetanólicos destas espécies podem ser auxiliares em tratamentos de afecções do trato respiratório, como gripes e resfriados.

6. CONCLUSÕES

Para os ensaios de citotoxicidade de células normais, todos os extratos obtidos não demonstraram potencial citotóxico para as linhagens estudadas em concentrações entre 11,25 e 112,5 µg/mL, possibilitando garantir segurança para aplicações de interação local contendo linhagens celulares equivalentes sem que ocorra degeneração provocada pelo princípio ativo da formulação. A estimulação do crescimento das células de epitélio bronquiolar, corroboram o uso popular destes extratos para afecções do trato respiratório.

De acordo com o ensaio de ativação de PPAR- γ , os extratos são citotóxicos em

concentrações similares ao utilizado para a aplicação em células normais, 1000 – 125 µg/mL e 1125,00 – 11,25 µg/mL, respectivamente. Este ensaio foi efetuado com concentrações similares ao de citotoxicidade em células normais. Os extratos não apresentaram ativação deste fator de transcrição. Este resultado pode ter sido causado por sensibilidade das células ou por turvação no meio levando a um falso-positivo de citotoxicidade.

Os testes empregando-se extratos aquosos e hidroetanólicos de ambas as espécies em meio contendo linhagens celulares tumorais, não indicaram citotoxicidade na concentração testada (30 µg/mL).

Os extratos de *M. glomerata* aquoso e hidroetanólico apresentaram característica inibitória da desnaturação de albumina em concentrações de 1,000 e 0,250 mg/mL, respectivamente. Já os extratos de *M. laevigata* (aquoso e hidroetanólico) apresentaram característica inibitória da desnaturação de albumina em concentrações menores; de 0,125 mg/mL.

O extrato que apresentou melhor potencial antioxidante por DPPH foi o extrato aquoso de *M. glomerata*, provavelmente devido à maior concentração de ácidos cafeoilquínicos presentes neste extrato. Já por ORAC_{Fl}, o melhor resultado foi do extrato hidroetanólico de *M. glomerata*, seguido do seu extrato aquoso. Possivelmente a atividade antioxidante dos extratos de *M. glomerata* auxilie na sua atividade terapêutica em processos inflamatórios.

Os extratos hidroetanólicos de ambas as espécies, apresentaram formação de halo para o teste de difusão em ágar, para a maioria das cepas utilizadas em concentrações de 5,0 mg/mL, mas necessita de estudos mais aprofundados empregando-se os testes de CIM.

CAPITULO 2: EFEITO DO PROCESSO DE SECAGEM

1. INTRODUÇÃO

1.1. Secagem e estabilização de matéria prima para fitoterápicos

Após a colheita das folhas de plantas aromáticas e medicinais, devido ao seu alto teor de água, inicia-se um processo de degradação enzimática provocada pelo excesso de umidade presente, possibilitando a perda dos princípios ativos, além de propiciar o desenvolvimento de fungos e bactérias (Melo *et al.*, 2004; Radünz, 2004; Costa *et al.*, 2005). A estabilidade da droga vegetal depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz, presença de oxigênio e de fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas das substâncias presentes (Silva, 2014).

O número de estudos de processo de secagem e armazenamento de insumos para a produção de fitoterápicos apresentados na literatura é muito escasso, sendo em sua maioria avaliados quando os compostos de interesse são voláteis, por exemplo, os óleos essenciais (Melo *et al.*, 2004). Os limites de temperatura de secagem são determinados em função da sensibilidade dos compostos químicos presentes nas plantas e de suas estruturas armazenadoras (Martinazzo *et al.*, 2013).

Na secagem, é também muito importante considerar a velocidade com que a água é retirada do produto, ou seja, a taxa de secagem, pois, um processo muito rápido pode degradar os princípios ativos. Em contrapartida, não deve ser muito lenta, pois, pode propiciar o aparecimento de micro-organismos indesejáveis. Além da temperatura do ar de secagem, que afeta a umidade relativa do mesmo, a taxa de secagem é influenciada pela velocidade do ar que passa através do produto (Melo *et al.*, 2004).

De acordo com Costa *et al.* (2005), temperaturas superiores a 45 °C danificam os órgãos vegetais e seu conteúdo, pois causam uma “cocção” das plantas e não uma secagem, proporcionando maiores condições de degradação dos compostos químicos. No entanto, como apresentado por Radünz (2004) estudos desenvolvidos com várias espécies, inclusive quando o foco é o estudo de compostos voláteis, em temperaturas acima de 45 °C apresentaram concentrações maiores de principio ativo que na planta fresca.

A seguir estão apresentados alguns trabalhos com resultados comparativos acerca da interferência do processo de secagem sobre as características e os componentes presentes nas amostras:

Brandão *et al.* (1998) estudaram os constituintes responsáveis pela atividade anti-inflamatória e espasmolítica da camomila comercializada em Juiz de Fora/MG, obtendo como

resultado uma alta variação dos resultados, os componentes anti-inflamatórios apresentaram variação de 55,5 – 42,8% e agentes espasmolíticos de 71,5 - 100% em suas concentrações nas amostras, sendo a ausência dessas substâncias, segundo os autores, proveniente de processos de produção e armazenamento inadequados.

Laughlin (2001) avaliou o efeito da secagem a sol pleno e a sombra em plantas da espécie *Artemisia annua* L. sobre os componentes químicos principais: artemisinina e ácido artemisínico. Segundo o autor, não houve efeito negativo sobre o conteúdo de artemisinina e ácido artemisínico quando o material foi seco a pleno sol, apresentando teores semelhantes aos das folhas secas em estufa a 30 °C. Já as plantas secas à sombra apresentaram aumento no teor de artemisinina.

Rehder *et al.* (1998 apud Melo *et al.*, 2004, p.309-310) verificaram uma variação no teor de cumarina durante a secagem de *M. laevigata* em relação às folhas frescas. Quando frescas, as folhas apresentaram teor 1,14% enquanto que os rendimentos de 0,19 e 0,69% foram observados para a relação temperatura/tempo de secagem de 30 °C/4 dias e de 45 °C/1 dia, respectivamente.

Radünz (2004) através do emprego de secador de bandeja na secagem de guaco (*M. glomerata*) e hortelã-comum (*Mentha x villosa* Huds), em temperaturas entre 40 e 80 °C, concluiu que a temperatura do ar de 50 °C é recomendável para a secagem de guaco e hortelã-comum, visando obter o maior teor de óleo essencial e a maior concentração de cumarina. Concluindo que a temperatura possivelmente interfira na permeabilidade ou resistência físico-mecânica dos tecidos vegetais, ajudando a reter os compostos voláteis nas estruturas originais.

Martinazzo *et al.* (2013) estudaram a interferência ocasionada pelo processo de secagem em diferentes temperaturas e comprimentos de corte das amostras de *Cymbopogon citratus* sobre o teor de óleo essencial. Os resultados obtidos indicam que amostras com tamanho de dois centímetros em temperaturas de 30 e 60 °C não apresentam diferenças significativas em relação à amostra fresca, mas em 40 °C, o teor de óleo essencial foi maior, justificando-se por ter sido o tempo de secagem menor em relação a 30 °C. Houve diminuição da atividade enzimática, apresentando baixa degradação dos compostos e a temperatura não foi capaz de provocar degradação em relação a 60 °C.

Silva (2014) avaliou a interferência do processo de secagem, sobre a concentração de cumarina, em estufa de ventilação forçada a 40 °C e em túnel de secagem, em folhas de *M. glomerata* inteiras ou cortadas, com ou sem adição de etanol como adjuvante do processo. De acordo com este trabalho, o tempo de secagem, utilizando-se etanol como adjuvante, foi

reduzido em 33% em relação aos processos de secagem tanto em estufa quanto em túnel. O material seco apresentou maiores concentração de cumarina quando em contato com etanol, provavelmente devido à diminuição do tempo de secagem.

De acordo com Melo e Sawaya (2015), comparando-se o processo de secagem em estufa com ventilação forçada 40 °C e liofilização do tecido vegetal de *M. glomerata* e *M. laevigata* houve diferenças significativas na concentração de cumarina e ácido clorogênico, sendo encontrado maior teor destes dois compostos nas amostras liofilizadas.

Deste modo, os estudos realizados até o momento não respondem de maneira satisfatória qual o método mais indicado para a secagem e estabilização destas plantas medicinais.

2. OBJETIVOS

Avaliar variação na composição de extratos hidroetanólicos devido ao tipo de secagem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comparação de Métodos de secagem e armazenamento de tecido vegetal

Os métodos de secagem e armazenagem das amostras podem influenciar no perfil de constituintes presentes nos extratos obtidos. Matrizes de plantas adultas de guaco, das espécies *M. glomerata* e *M. laevigata*, obtidas do CPQBA-UNICAMP, já estão adaptadas e crescendo no campo experimental do Instituto de Biologia, UNICAMP. As suas exsiccatas foram depositadas no herbário do IB, UNICAMP sob registro nº 102046 para a *M. laevigata* e nº 102047 para a *M. glomerata*. Os métodos de secagem e armazenamento avaliados e os respectivos tempos amostrais estão apresentados abaixo e o fluxograma do ensaio na Figura 27:

- Secagem em estufa de ventilação forçada a 40 °C por 48h, amostragem nos tempos de 0; 6; 12; 18; 24; 30; 36; 42; 48 horas.
- Secagem a sombra por 14 dias, as amostras ficaram dispostas sobre bancadas para que secassem naturalmente, amostragens nos tempos de 0; 48; 96; 144; 192; 240; 288; 336 horas.
- Maceração do material a fresco com auxílio de nitrogênio líquido, a amostra foliar é coletada em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido cessando todos os processos biológicos do tecido (controle).

- As amostras de tempo 0 (zero) foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido a fim de se obter resultados na condição inicial do momento da coleta.

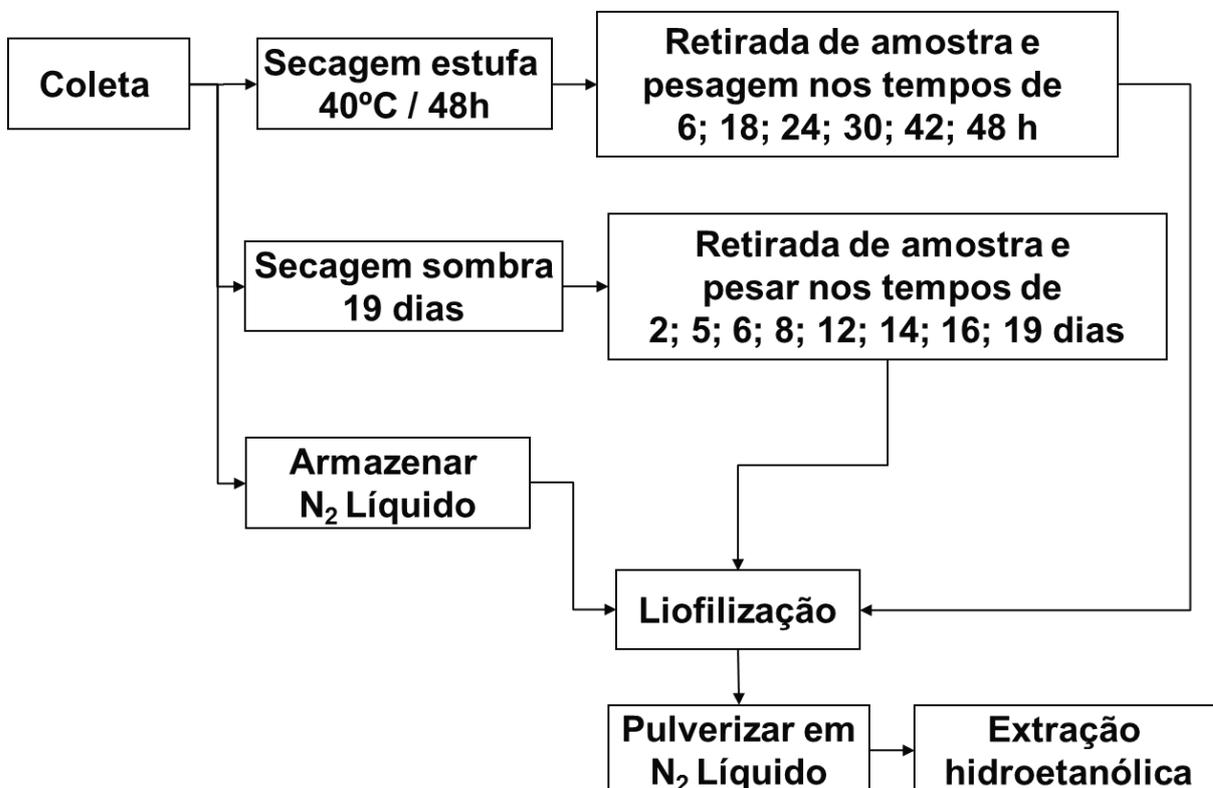


Figura 27 – Fluxograma experimental sobre a influência do processo de secagem sobre o extrato hidroetanólico de *M. laevigata* e *M. glomerata*.

Para correção da diferença de massas ocasionada pela presença de água e produtos voláteis no estado inicial, as amostras foram subdivididas após a coleta e agrupadas em porções individuais contendo folhas jovens e maduras sadias em iguais proporções para cada tempo e pesadas durante o tempo em que o ensaio é desenvolvido, possibilitando a confecção da curva de secagem em cada um dos ensaios. Todas as amostras foram submetidas à liofilização para a retirada da água residual sem alteração dos componentes da mesma. Todas as amostras foram extraídas e analisadas por UHPLC-MS.

3.2. Extração Hidroetanólica

Para o ensaio de secagem, o tecido vegetal liofilizado depois de separado caule e limbo, é macerado em nitrogênio líquido até completa homogeneidade. Sendo pesados 66,6 mg para 1 mL de solução hidroetanólica 70% sob agitação, em banho de ultrassom, por 30 minutos, centrifugado a 13.000 xg por 5 minutos, recolhendo-se o sobrenadante. Estes

extratos foram analisados por UHPLC-MS.

3.3. Análise Cromatográfica por UHPLC-MS

Seguiu-se o mesmo método descrito no Capítulo 1, item 2.4. Foram quantificados: cumarina, ácido *o*-cumárico, umbeliferona, ácido clorogênico e ácido caurenóico por comparação com padrões; ácido dicafeoilquínico e ácido tricafeoilquínico por comparação de padrão de ácido clorogênico; ácido cupressênico e ácido grandiflórico por comparação de compostos isolados gentilmente cedidos por Dra Vera Garcia – CPQBA.

4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados foram obtidos a partir dos cromatogramas da UHPLC-MS para cada amostra e foram submetidos à ANOVA, seguida do teste de Fisher LSD, utilizando o *software* Graphpad Prism, versão 6.01 (GraphPad Software, La Jolla California USA). Os dados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Interferência do processo de secagem na concentração de metabólitos secundários principais de *M. laevigata* e *M. glomerata*.

Foi avaliado o efeito do processo de secagem sobre o perfil químico de extratos hidroetanólicos de *M. laevigata* e *M. glomerata*. Foram quantificados os teores de 9 moléculas identificadas e descritas na literatura como constituintes destes extratos: cumarina, ácido *o*-cumárico, umbeliferona, ácido clorogênico, ácido dicafeoilquínico, ácido tricafeoilquínico, ácido caurenóico, ácido cupressênico e ácido grandiflórico. Verificou-se a flutuação na concentração para acompanhar o acréscimo ou decréscimo de cada constituinte no tempo amostral em comparação com a amostra de tempo 0 (zero). Esta amostra foi coletada e imediatamente congelada e liofilizada a -50°C , preservando suas características iniciais.

Como pode ser observado através da Figura 28, não houve diferença entre as duas espécies de *Mikania* quanto à resistência na diminuição da massa por perda de voláteis e umidade quando o material foi submetido ao processo de secagem em estufa.

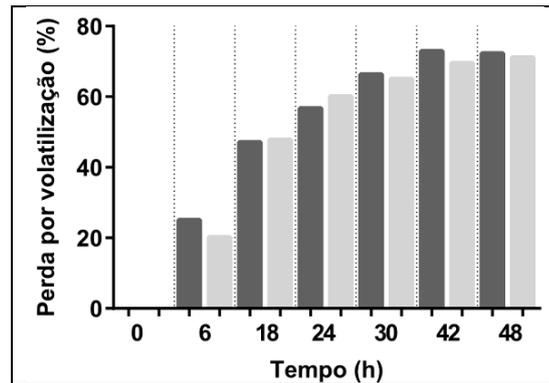


Figura 28 – Gráfico de perda por volatilização em secagem por ventilação forçada em estufa a 40 °C, comparativo de volatilização em cada tempo entre as espécies, ■ *M. laevigata* ■ *M. glomerata*.

Na Figura 29, nota-se através do gráfico que ocorre diferença significativa dentro de cada espécie até o tempo de 168 horas, quando a perda torna-se praticamente constante. A Figura 29 apresenta a comparação da perda entre as espécies em cada faixa de tempo, indicando maior resistência a perda de voláteis e umidade em *M. laevigata* em relação a *M. glomerata*, havendo uma diferença significativa no início do tratamento para as primeiras 192 horas, possivelmente devido à cutícula mais espessa, facilmente observada quando comparadas as duas espécies, que recobre a *M. laevigata*. Após este tempo o comportamento de ambas as espécies torna-se semelhante. Observamos que em estufa a perda de água/voláteis foi de 73,0% para *M. laevigata* e de 71,2% para *M. glomerata* e que o processo de secagem estabilizou após 42 horas. Já no processo de secagem à sombra a perda de água/voláteis foi de 76,6% para *M. laevigata* e de 80,7% para *M. glomerata* e o processo de secagem estabilizou após 168 horas. Nem a secagem na sombra nem em estufa conseguiu retirar a água/voláteis das folhas tanto quanto a liofilização, mostrando haver necessariamente uma umidade residual em drogas vegetais estabilizadas por estes métodos.

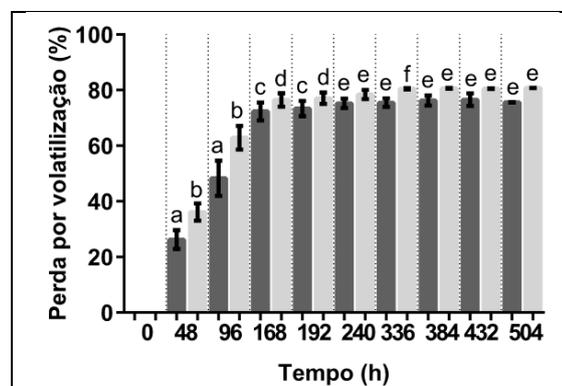


Figura 29 – Gráfico de perda por volatilização em secagem a sombra, comparativo de volatilização em cada tempo entre as espécies, ■ *M. laevigata*, ■ *M. glomerata*, Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey).

A Tabela 10 apresenta os resultados para cada composto e seu respectivo tempo de coleta. Os gráficos que apresentam o estudo comparativo da concentração de cada metabólito identificado são apresentados nas Figuras 30 – 38 e discutidos individualmente.

Tabela 10: Comparação da composição dos extratos obtidos para amostras de *M. laevigata*, *M. glomerata*, ensaio de secagem.

Espécie	Secagem	Período (h)	Parte	Cumarina (µg/ml)	Umbeliferona (µg/ml)	Ácido o-coumárico (µg/ml)	Ácido caurenóico (µg/ml)	Ácido cupressênico (µg/ml)	Ácido grandiflorico (µg/ml)	Ácido clogerênico (µg/ml)	Ácido dicafetóiquico (µg/ml)	Ácido triteafetóiquico (µg/ml)
<i>M. laevigata</i>		0	Folha	265,98	3,17	34,35	129,20	131,27	7,36	41,77	169,83	7,88
<i>M. laevigata</i>	Estufa	6	Folha	208,15	2,91	27,36	216,51	336,71	31,67	101,20	266,92	13,21
<i>M. laevigata</i>	Estufa	18	Folha	188,70	1,07	135,24	200,45	426,41	73,39	12,73	31,35	5,33
<i>M. laevigata</i>	Estufa	24	Folha	265,77	1,28	282,39	170,90	519,98	117,96	18,38	43,81	5,08
<i>M. laevigata</i>	Estufa	30	Folha	146,88	1,07	122,23	66,42	182,81	12,97	3,84	-0,45	9,59
<i>M. laevigata</i>	Estufa	42	Folha	154,31	1,07	62,09	43,62	263,87	13,01	3,81	-0,12	4,41
<i>M. laevigata</i>	Estufa	48	Folha	202,88	1,07	234,09	52,46	687,05	106,17	8,51	25,04	4,27
<i>M. laevigata</i>	Sombra	48	Folha	266,62	7,97	260,85	59,00	628,24	184,69	82,13	182,66	7,06
<i>M. laevigata</i>	Sombra	120	Folha	229,89	9,34	43,14	36,81	386,15	24,84	119,41	338,01	6,87
<i>M. laevigata</i>	Sombra	144	Folha	165,97	13,49	76,53	40,05	415,31	27,50	123,32	279,79	6,13
<i>M. laevigata</i>	Sombra	192	Folha	184,94	17,98	95,65	33,70	373,73	53,14	214,20	379,58	7,88
<i>M. laevigata</i>	Sombra	288	Folha	145,71	21,72	72,86	42,31	444,70	44,42	105,52	187,03	13,86
<i>M. laevigata</i>	Sombra	336	Folha	142,79	8,79	67,52	34,19	334,41	50,31	53,63	122,51	5,44
<i>M. laevigata</i>	Sombra	384	Folha	87,20	1,67	50,56	30,72	330,20	68,33	8,41	15,41	5,69
<i>M. laevigata</i>	Sombra	456	Folha	156,14	12,65	94,97	36,41	359,06	47,09	56,00	62,21	5,74
<i>M. glomerata</i>		0	Folha	7,25	1,07	-	52,05	337,80	155,33	116,66	1324,84	74,56
<i>M. glomerata</i>	Estufa	6	Folha	7,61	1,07	-	70,95	638,89	198,50	286,02	2171,67	122,72
<i>M. glomerata</i>	Estufa	18	Folha	3,30	1,07	-	56,84	397,55	180,81	79,21	611,16	56,87
<i>M. glomerata</i>	Estufa	24	Folha	2,85	1,07	-	58,02	619,82	210,14	27,53	214,80	18,94
<i>M. glomerata</i>	Estufa	30	Folha	2,62	1,07	-	59,94	438,90	200,45	30,33	219,43	16,47
<i>M. glomerata</i>	Estufa	42	Folha	5,64	1,07	-	50,33	556,07	198,52	40,01	397,85	34,97
<i>M. glomerata</i>	Estufa	48	Folha	6,88	1,07	-	56,30	626,73	270,08	43,99	545,05	42,04
<i>M. glomerata</i>	Sombra	48	Folha	4,12	1,07	-	51,60	484,23	231,52	308,75	1677,46	64,72
<i>M. glomerata</i>	Sombra	120	Folha	9,15	1,07	-	65,40	401,82	181,79	191,88	1943,73	131,32
<i>M. glomerata</i>	Sombra	144	Folha	7,03	1,07	-	59,11	367,95	162,44	238,89	1293,45	126,94
<i>M. glomerata</i>	Sombra	192	Folha	7,84	4,15	-	41,85	323,98	140,12	161,76	1753,46	192,14
<i>M. glomerata</i>	Sombra	288	Folha	6,05	3,67	-	45,54	367,90	141,70	154,18	1239,15	211,56
<i>M. glomerata</i>	Sombra	336	Folha	5,97	2,89	-	41,16	359,06	189,44	82,07	1275,75	246,58
<i>M. glomerata</i>	Sombra	384	Folha	3,90	2,07	-	37,59	453,88	168,22	86,33	1261,59	255,47
<i>M. glomerata</i>	Sombra	456	Folha	5,67	1,90	-	45,21	299,06	182,62	58,85	1483,14	185,32

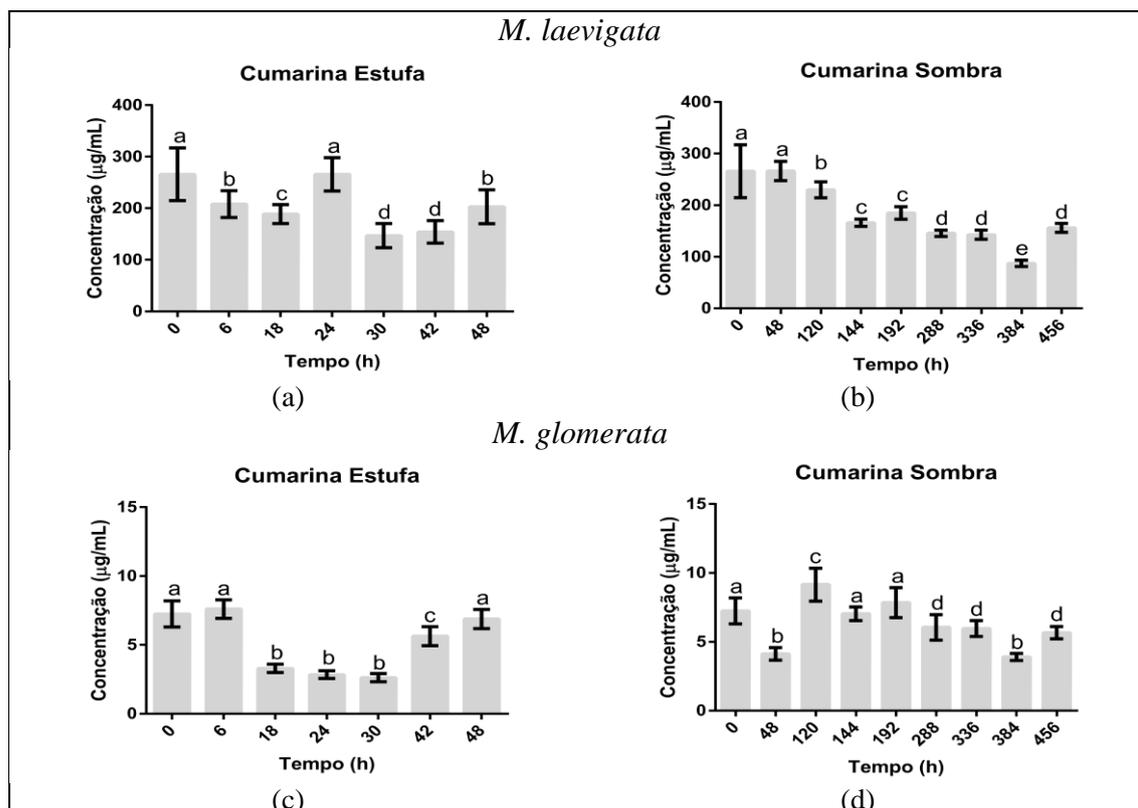


Figura 30 – Gráficos de variação de concentração de cumarina em µg/mL e o tempo de secagem em horas para: *M. laevigata* seca em (a) estufa ou (b) sombra, e *M. glomerata* seca em (c) estufa ou (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$.

Não houve diferença significativa na concentração de cumarina para a *M. glomerata* após 48 horas de secagem em estufa, mas para *M. laevigata* houve; diminuindo de 266,0 µg/mL para 202,9 µg/mL (Figura 30). Para o processo de secagem a sombra houve uma redução significativa da concentração de cumarina no fim do processo para ambas as espécies, passando de 266,0 µg/mL para 156,1 µg/mL e de 7,2 µg/mL para 5,7 µg/mL em extrato de *M. laevigata* e *M. glomerata*, respectivamente. Estes resultados foram similares aos descritos por Amaral *et al.* (2009), que observaram que a planta seca à temperatura ambiente apresentou teor de cumarina menor que aquela seca em estufa a 40 °C. A maior degradação da cumarina à sombra pode estar associada à ação de enzimas e micro-organismos sobre o tecido vegetal, sendo estes inibidos em temperaturas superiores a 40 °C como descrito por Radünz (2004). O teor de cumarina apresentou variações ao longo dos processos de secagem. Apesar dos extratos das folhas de *M. laevigata* apresentarem teor inicial muito maior que *M. glomerata*, em ambos os casos houve uma diminuição da concentração durante a secagem em estufa seguida de aumento. Uma variação similar foi observada por Amaral *et al.* (2009), onde houve um aumento do teor de cumarina em xarope de guaco armazenado a 45 °C,

atribuída por eles à ciclização espontânea do ácido *o*-cumárico com formação de cumarina.

O teor de ácido *o*-cumárico (Figura 31) foi observado apenas nas folhas de *M. laevigata*, o que corrobora sua participação na biossíntese de cumarina por esta espécie. Tanto na estufa como na sombra, houve variação de sua concentração ao longo do estudo, sendo que as concentrações finais foram significativamente mais altas que as iniciais. Não foi possível, porém, correlacionar diretamente as perdas de cumarina com o aumento de ácido *o*-cumárico em todos os tempos, sugerindo haver outros compostos que participam da mesma via que não foram avaliados. Deste modo o ácido *o*-cumárico pode ser tanto precursor como produto de degradação da cumarina em *M. laevigata*.

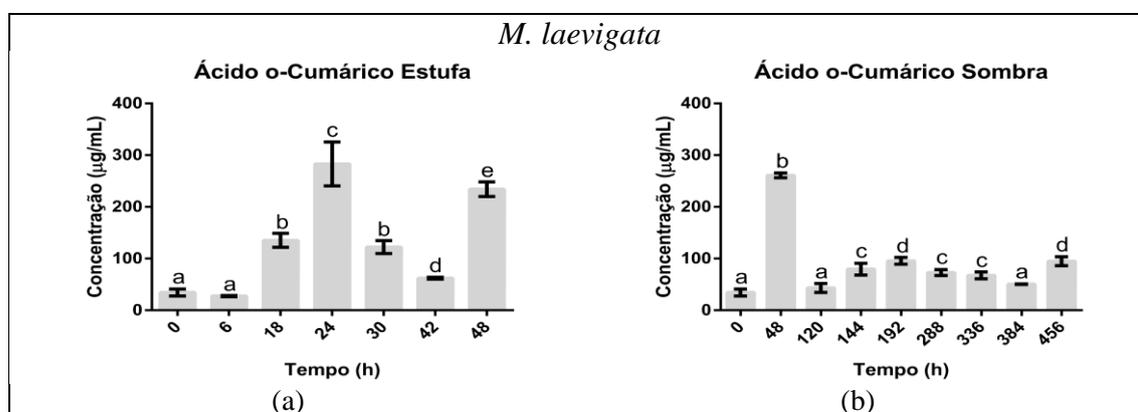


Figura 31 – Gráficos de variação de concentração de ácido *o*-cumárico em µg/mL e o tempo de secagem em horas para: *M. laevigata* seca em (a) estufa ou (b) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,05$, tukey) $n=3$.

A umbeliferona (Figura 32) é produzida através de uma rota biosintética similar ao da cumarina, porém a partir da formação do ácido *p*-cumárico pela hidroxilação do ácido cinâmico (Vieira, 2010). Inicialmente ela só detectada em maior concentração em *M. laevigata*, sendo que sua concentração diminuiu significativamente na secagem em estufa. Ao contrário, no ensaio de secagem a sombra a sua concentração aumentou em ambas as espécies, possivelmente por uma oxidação microbiana, proporcionada por uma isoforma do citocromo P450. De acordo com Souza (2005), a molécula de cumarina é metabolizada em umbeliferona (7-hidroxycumarina) hepaticamente no organismo humano através da isoforma CYP2A6 que representa 1% do citocromo P450. Os ensaios em estufa demonstram que a inativação das enzimas (das próprias plantas ou dos micro-organismos presentes) pela temperatura foi capaz de diminuir a formação da umbeliferona em ambas as espécies.

Aparentemente para a *M. laevigata*, a via principal do metabolismo secundário dos compostos fenólicos é direcionada para a formação da cumarina, enquanto que para a *M. glomerata* a via preferencial é para ácido clorogênico e outros ácidos cafeoilquínicos (di- e

tricafeoilquínico).

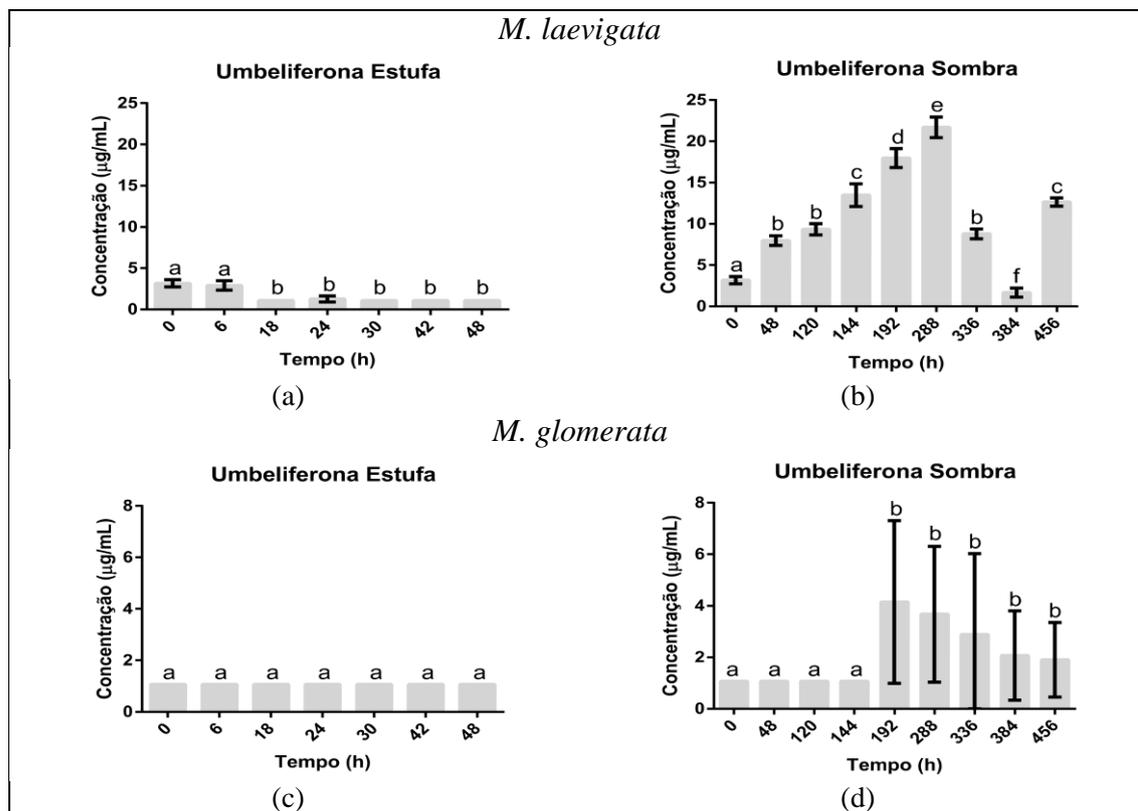


Figura 32 – Gráficos de variação de concentração de umbeliferona em µg/mL e o tempo de secagem em horas para: *M. laevigata* seca em (a) estufa ou (b) sombra, e *M. glomerata* seca em (c) estufa ou (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$.

Todos os ácidos cafeoilquínicos apresentam concentração inicial maior em *M. glomerata*. Porém, conforme o tecido vegetal começa a sofrer estresse, há um incremento na formação de ácidos cafeoilquínicos em ambas as espécies. Este efeito é aparente na secagem à sombra para ambas as espécies, sendo mais evidente para *M. laevigata* (Figuras 33 – 34).

O aumento significativo destes ácidos cafeoilquínicos após 6 horas em estufa mostra que o metabolismo celular ainda estava ativo neste prazo. Os resultados a partir de 18 horas demonstram que a inativação das enzimas pela temperatura foi capaz de diminuir a formação dos ácidos clorogênico e dicafeoilquínico em ambas as espécies.

O ácido tricafeoilquínico foi encontrado em baixas concentrações em *M. laevigata*, não apresentando diferença significativa ao fim da secagem em estufa ou sombra, Figura 35. Já para *M. glomerata*, a secagem em estufa reduziu significativamente seu teor, mas a secagem à sombra o aumentou. Este comportamento pode estar relacionado ao que é sugerido no trabalho de Dixon e Paiva (1995), onde as plantas produzem compostos fenólicos como ácido clorogênico e outros ácidos fenólicos em resposta a ferimentos e herbívoros.

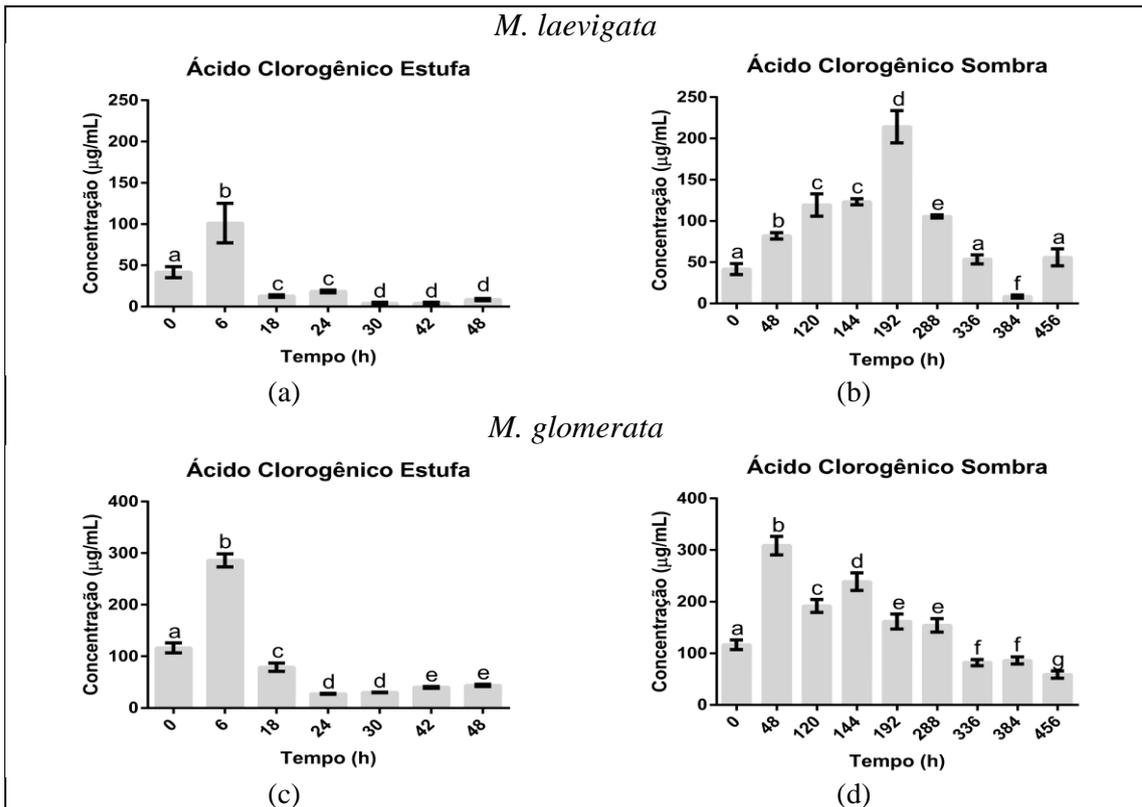


Figura 33 – Gráficos de variação de concentração de ácido clorogênico em µg/mL e o tempo de secagem em horas para: *M. laevigata* seca em (a) estufa ou (b) sombra, e *M. glomerata* seca em (c) estufa ou (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$.

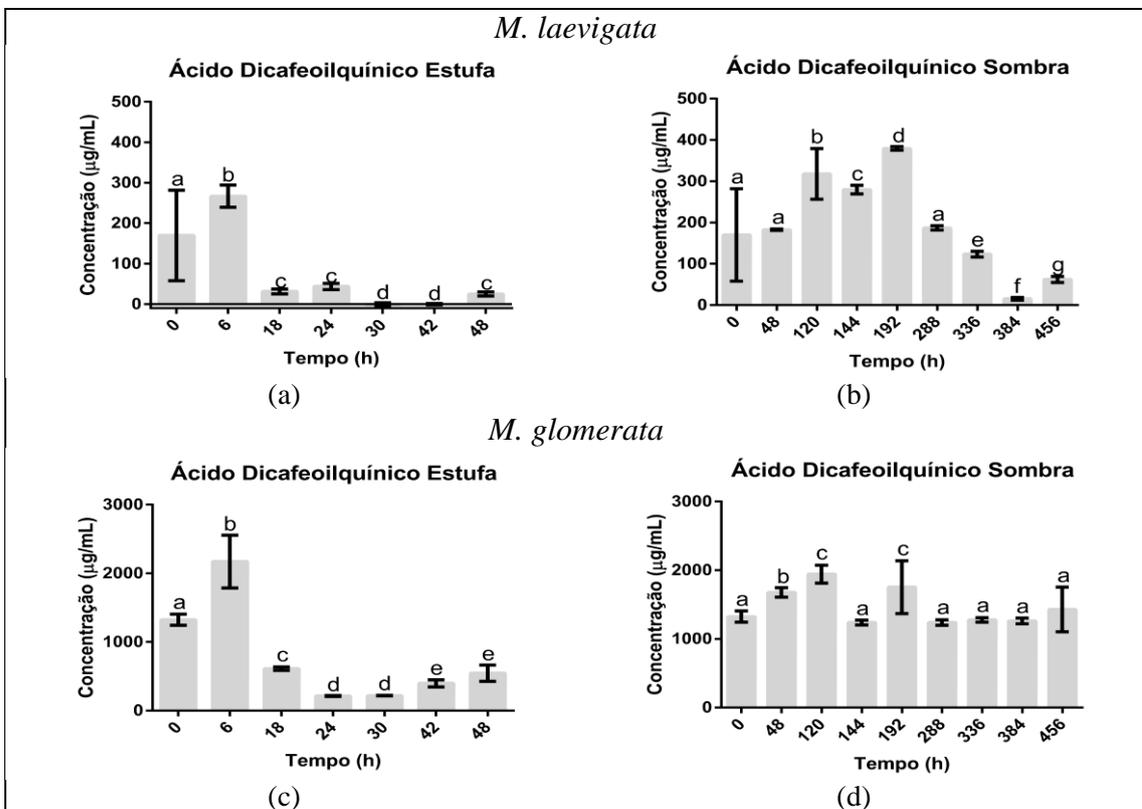


Figura 34 – Gráficos de variação de concentração de ácido dicafeoilquinico em µg/mL e o tempo de secagem em horas para: *M. laevigata* seca em (a) estufa ou (b) sombra, e *M. glomerata* seca em (c) estufa ou (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$.

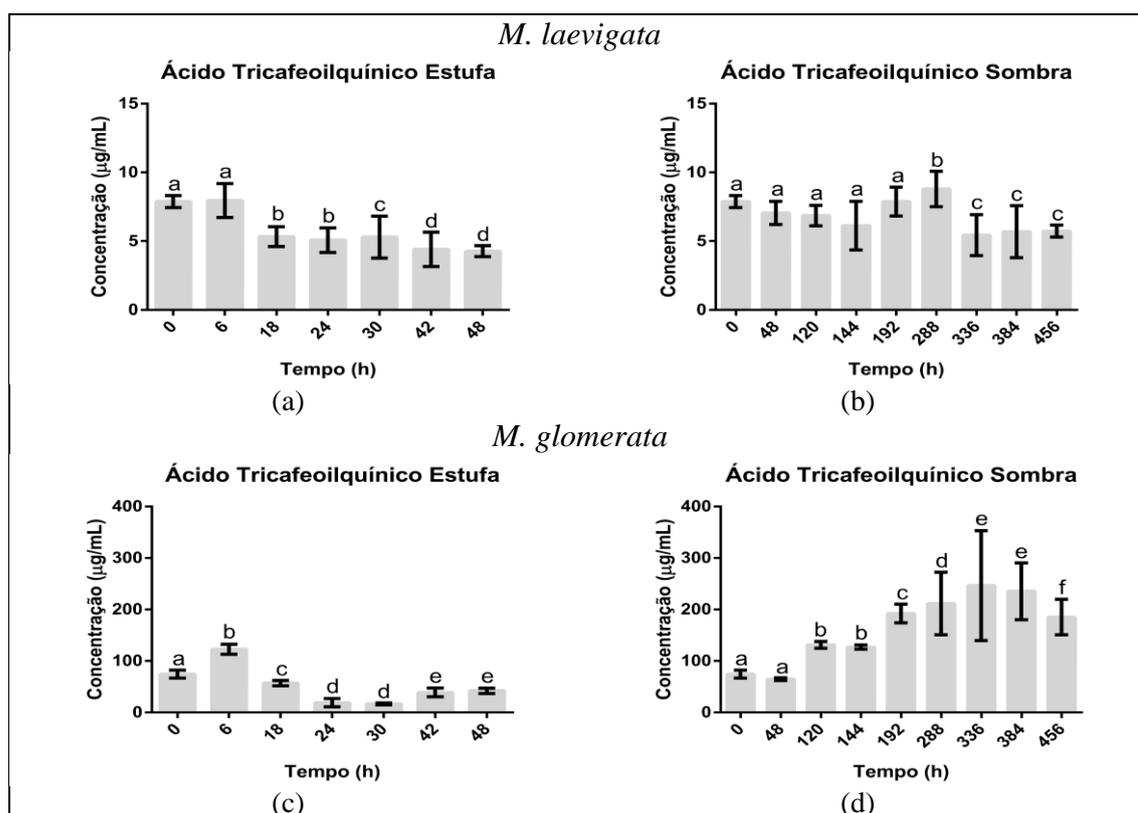


Figura 35 – Gráficos de variação de concentração de ácido tricafeoilquinico em µg/mL e o tempo de secagem em horas para: *M. laevigata* seca em (a) estufa ou (b) sombra, e *M. glomerata* seca em (c) estufa ou (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$.

Os diterpenos (ácidos caurenóico, grandiflórico e cupressênico) são provenientes de uma via metabólica diferente, são formados à partir do ciclo de Krebs, via mevalonato. De acordo com Ogasawara (2015), que estudou o estresse hídrico sobre *Coffea arabica* utilizando como marcador os diterpenos caveol e cafestol, observou que diterpenos como o ácido caurenóico, grandiflórico e cupressênico, por serem moléculas que atuam inibindo o efeito da radiação solar e como antioxidantes, diminuiriam o estresse oxidativo, bloqueando também as espécies reativas de oxigênio, contribuindo assim, para a redução do estresse hídrico.

O ácido caurenóico foi detectado inicialmente em ambas as espécies, embora com maior concentração em *M. glomerata* como apresentado na Figura 36. Como seu ponto de fusão é de 180 °C, não se espera que volatilize na estufa. Embora pudesse sofrer outros tipos de degradação enzimática ou microbiana, sua concentração se manteve praticamente estável durante o processo de secagem em estufa ou em sombra. Esta molécula está intimamente relacionada na biossíntese de giberelina, fitohormônio estimulante da divisão e alongação celular e inibição de gemas e raízes adventícias (Trindade, 2012). Quando submetida ao estresse de desidratação total proporcionada neste ensaio, o tecido vegetal aumenta a

produção deste hormônio na tentativa de economizar energia e retardar a senescência. Efeito semelhante foi observado por Skutnik *et al.* (2001) em experimento de aplicação de ácido giberélico em folhas cortadas de *Zantedeschia aethiopica*, estendendo consideravelmente a vida útil pós-colheita, retardando a senescência, evitando a queda do nível de clorofila nesta folhagem.

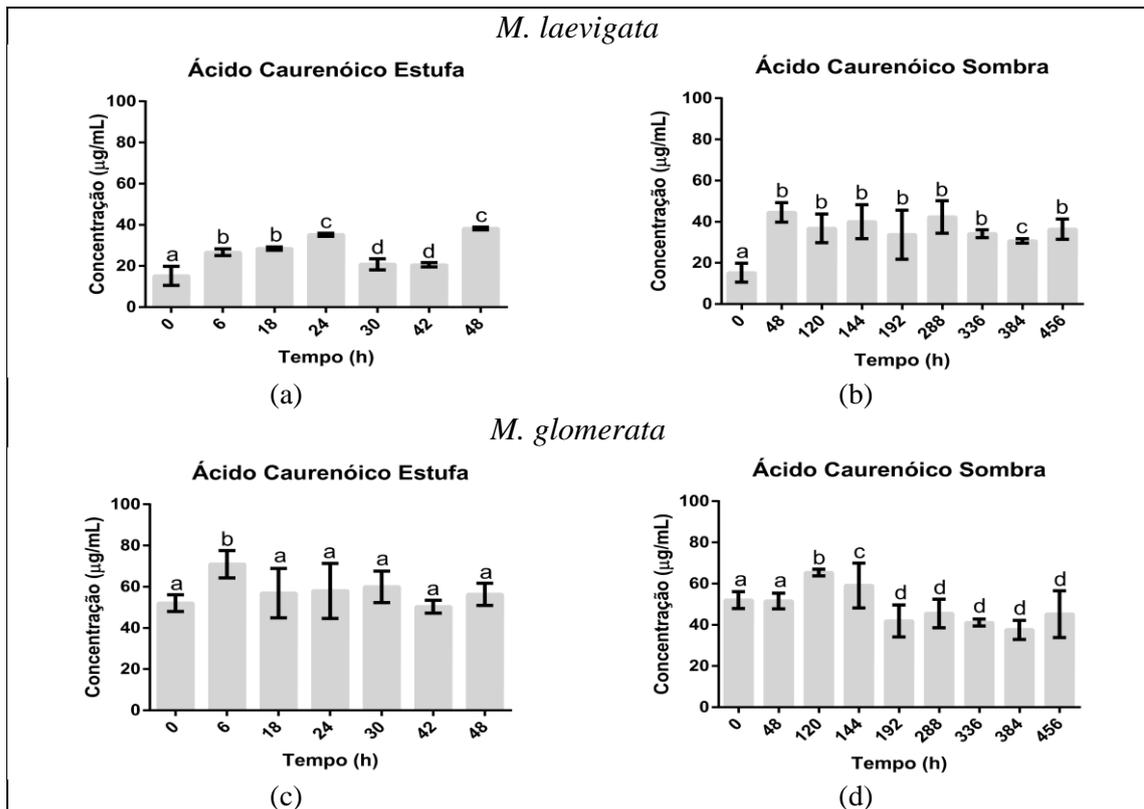


Figura 36 – Gráficos de variação de concentração de ácido caurenóico em µg/mL e o tempo de secagem em horas para: *M. laevigata* seca em (a) estufa ou (b) sombra, e *M. glomerata* seca em (c) estufa (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n = 3$.

O ácido grandiflórico apresenta estrutura similar ao ácido caurenóico, com uma hidroxila na posição 15 e alto ponto de fusão. Apresentou aumento de concentração na secagem em estufa e sombra para ambas as espécies, Figura 37, possivelmente por oxidação do ácido caurenóico. O ácido cupressênico apresentou aumento significativo apenas para *M. laevigata*, como apresentado na Figura 38.

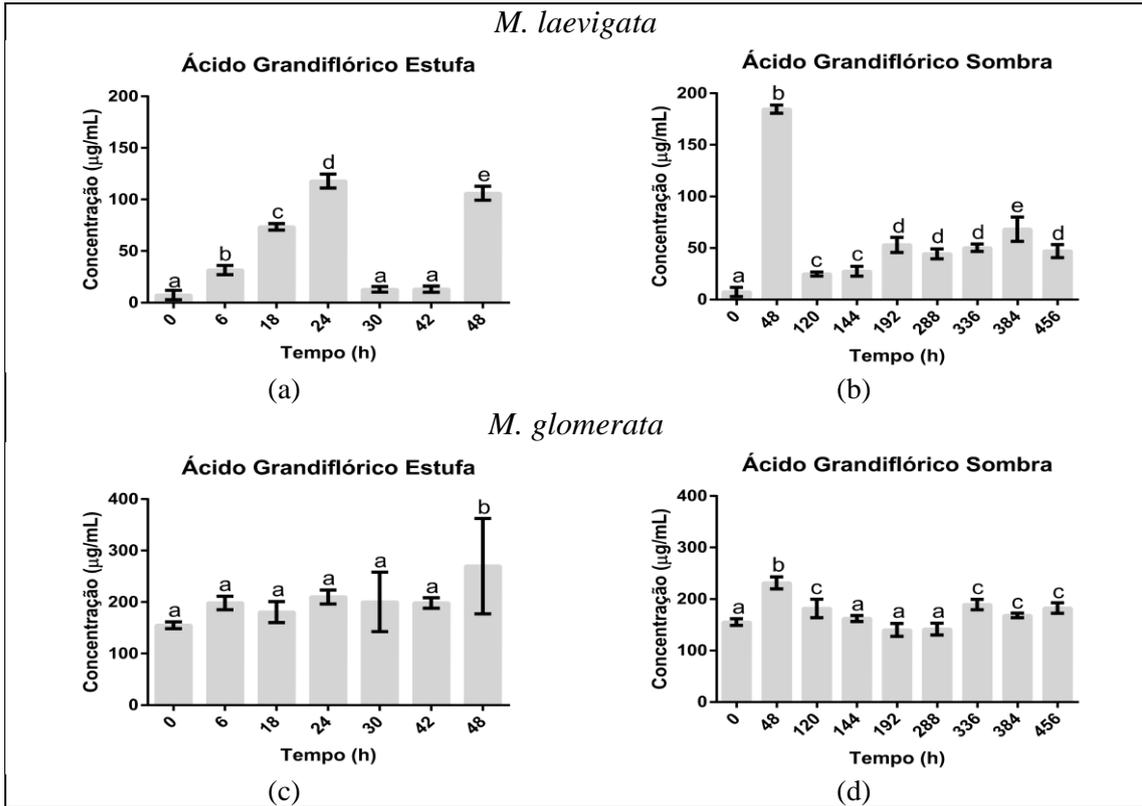


Figura 37 – Gráficos de variação de concentração de ácido grandiflorico em µg/mL e o tempo de secagem em horas para: *M. laevigata* seca em (a) estufa (b) sombra, e *M. glomerata* seca em (c) estufa (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$.

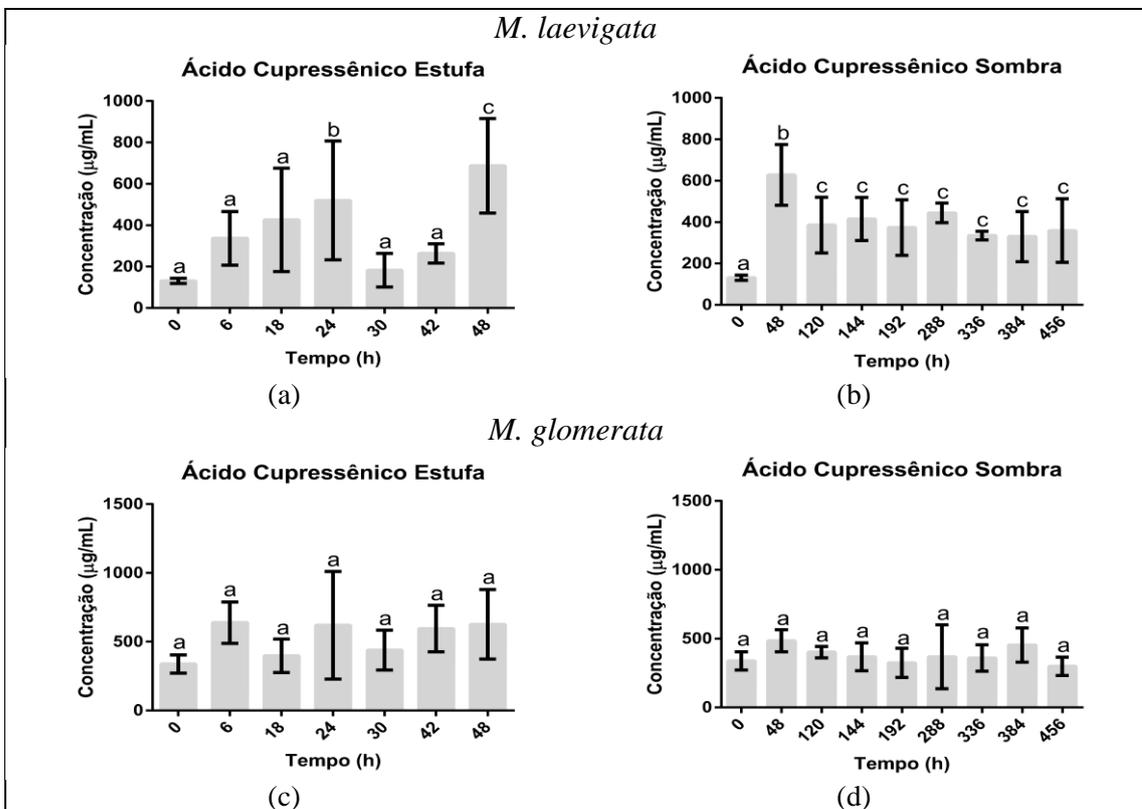


Figura 38 – Gráficos de variação de concentração de ácido cupressênico em µg/mL e o tempo de secagem em horas para: *M. laevigata* seca em (a) estufa ou (b) sombra, e *M. glomerata* seca em (c) estufa ou (d) sombra. Letras diferentes no mesmo gráfico significam diferença significativa ($p < 0,5$, tukey) $n=3$.

6. CONCLUSÕES

O método de secagem afetou diretamente a composição das amostras. A cumarina, marcador das espécies, diminuiu mais na secagem à sombra que na estufa para *M. laevigata* e somente na sombra para *M. glomerata*. O ácido o-cumárico foi encontrado somente em *M. laevigata*, mas sua concentração aumentou nos dois tratamentos de secagem, podendo ser produto da degradação da cumarina. A umbeliferona, outro composto fenólico estruturalmente relacionado à cumarina, aumentou na secagem à sombra das duas espécies, também possivelmente por oxidação da cumarina ou degradação de outros fenólicos.

Os ácidos cafeoilquínicos são resultantes de *stress* nas plantas e aumentaram por até 6 h na estufa, e durante todo o processo de secagem na sombra. Estes resultados mostram que na estufa há uma inativação enzimática após este período, o que não ocorre na secagem à sombra.

Embora o ácido caurenóico não apresentasse diferenças significativas em nenhum método de secagem os outros terpenos variaram. A concentração do ácido grandiflórico aumentou nas duas espécies e tipos de secagem, mas o ácido cupressênico teve sua concentração aumentada somente na *M. laevigata*.

Em resumo, a secagem em estufa mostrou que os extratos com composição foram mais similares ao da folha liofilizada. Houve mais degradação (possivelmente enzimática e microbiana) na secagem à sombra apesar da temperatura menor.

Este capítulo já foi submetido em forma de artigo à Revista Brasileira de Farmacognosia.

CAPITULO 3: OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ENRIQUECIDAS VIA CCC.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cromatografia de contra corrente (CCC)

A cromatografia de contra corrente (CCC) é um método baseado na separação líquido-líquido sem necessidade de suporte sólido, proporcionada pela diferença de polaridade entre as fases e dos componentes das amostras (Kostanian *et al.*, 2004).

É crescente a utilização da técnica de CCC em vários campos, especialmente no isolamento de compostos de produtos naturais, devido a menor quantidade de solventes envolvida e os custos de eliminação de solventes residuais, obtendo-se maior pureza e recuperação de alvos específicos envolvidos a um menor custo quando comparado as técnicas de separação utilizadas atualmente (Zhang *et al.*, 2012).

Na CCC o sistema de solventes consiste na imiscibilidade de pelo menos dois solventes. Desta forma, um deles irá agir como fase estacionária (FE) e o outro como fase móvel (FM) (Huang *et al.*, 2016).

A coluna de separação é suportada em uma bobina, onde através da força centrífuga aplicada pelo movimento de rotação e translação, como apresentado na Figura 39, o solvente (FE) é condicionado a permanecer no interior da coluna, enquanto o outro (FM) é bombeado constantemente, percorrendo a coluna (Zhang *et al.*, 2012).

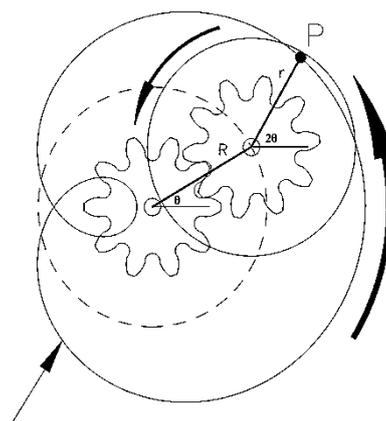


Figura 39 – Representação gráfica do movimento de rotação e translação da coluna de separação CCC (Key e Wood, 2008).

O sistema de solvente deve ser escolhido de acordo com as características de polaridade do material que irá ser usado. O sistema de solventes mais conhecido é o chamado “HEMWat” composto por heptano: acetato de etila: metanol: água, onde o acetato de etila e o

metanol agem como modificadores da polaridade do solvente orgânico mais apolar (heptano) e da água respectivamente (Friesen e Pauli, 2007). A Tabela 11 apresenta as diferentes combinações de solventes do sistema HEMWat.

Tabela 11: Sistemas solventes HEMWat. (Adaptado:Garrard (2005))

Polar ↓ Apolar	Nº	Heptano	Acetato de etila	Metanol	Butanol	Água
	1	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00
2	0,00	0,00	0,40	0,00	1,60	2,00
3	0,00	0,00	0,80	0,00	1,20	2,00
4	0,00	0,00	1,20	0,00	0,80	2,00
5	0,00	0,00	1,60	0,00	0,40	2,00
6	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	2,00
7	0,10	0,10	1,90	0,10	0,00	1,90
8	0,20	0,20	1,80	0,20	0,00	1,80
9	0,29	0,29	1,71	0,29	0,00	1,71
10	0,33	0,33	1,67	0,33	0,00	1,67
11	0,40	0,40	1,60	0,40	0,00	1,60
12	0,50	0,50	1,50	0,50	0,00	1,50
13	0,57	0,57	1,43	0,57	0,00	1,43
14	0,67	0,67	1,33	0,67	0,00	1,33
15	0,80	0,80	1,20	0,80	0,00	1,20
16	0,91	0,91	1,09	0,91	0,00	1,09
17	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00
18	1,09	1,09	0,91	1,09	0,00	0,91
19	1,20	1,20	0,80	1,20	0,00	0,80
20	1,33	1,33	0,67	1,33	0,00	0,67
21	1,43	1,43	0,57	1,43	0,00	0,57
22	1,50	1,50	0,50	1,50	0,00	0,50
23	1,60	1,60	0,40	1,60	0,00	0,40
24	1,67	1,67	0,33	1,67	0,00	0,33
25	1,71	1,71	0,29	1,71	0,00	0,29
26	1,80	1,80	0,20	1,80	0,00	0,20
27	1,90	1,90	0,10	1,90	0,00	0,10
28	2,00	2,00	0,00	2,00	0,00	0,00

A separação das substâncias de interesse é baseada na afinidade destas pelo sistema de solventes escolhido, denominada por coeficiente de distribuição (K_D) (Friesen e Pauli, 2007).

O coeficiente de distribuição (K_D) é a relação entre a concentração do soluto entre duas fases de solvente imiscíveis e equilibradas a uma dada temperatura (normalmente a cerca de 20 °C). A Equação 6 representa o cálculo de K_D . Como é possível usar a fase superior ou inferior como fase estacionária na CCC, é conveniente expressar a relação como concentração de soluto na fase superior dividida pela da fase inferior (Ito, 2005).

$$K_D = \frac{\text{fase superior}}{\text{fase inferior}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Um sistema solvente ideal para a separação de um composto em particular é aquele em que o valor de K_D do composto está na faixa entre 0,5 – 2,0, sendo geralmente considerado como o sistema ideal para separar esse composto com uma resolução óptima quanto mais próximo de 1 (Marston e Hostettmann, 2006; Friesen e Pauli, 2007).

Dependendo da FE o sistema pode operar tanto em Fase Normal (NP) quanto em Fase Reversa (RP). Assim, se K_D for 2, deve-se usar a fase inferior como fase estacionária, operando em NP. Se $K_D = 1$, qualquer fase pode ser a fase estacionária. De acordo com as características do sistema, é preferível, se houver uma escolha, operar em RP, utilizando a fase superior como fase estacionária e, portanto, recomenda-se conduzir o sistemas entre $0,5 \leq K_D \leq 1$ (Ito, 2005).

O processo de separação CCC apresenta várias vantagens em comparação com cromatografia líquida de coluna clássica (LC), tais como ausência de matriz sólida para a fase estacionária, maior capacidade de carga, maior gama de escolha de solventes de separação e facilidade de aumento de escala para a escala piloto (kg). Outra vantagem associada a CCC é a recuperação de toda a amostra injetada e contaminação cruzada quase nula, devido a troca de todo o sistema de solventes a cada corrida cromatográfica (Zhang *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2016).

2. OBJETIVOS

- A. Obtenção por Cromatografia de Contra Corrente (CCC) de frações enriquecidas dos quatro tipos de extratos.
- B. Avaliar por UHPLC-MS a composição das frações enriquecidas obtidas por CCC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O processo de preparação dos extratos tanto aquosos quanto hidroetanólicos de ambas as espécies seguiu o protocolo descrito no Capítulo 1, item 2.1. à 2.4. desta tese.

3.1. Seleção sistema de solventes

Para a seleção do melhor sistema de separação a estratégia foi procurar e separar os compostos em grupos e avaliar nos diversos sistemas testados. O sistema de partida usual é o HEMWat 17, devido sua polaridade intermediária. A quantidade de 10 mg de extrato bruto foi colocada em cada tubo de ensaio contendo 4 mL de um dos sistemas solventes

apresentados na Tabela 12. Em seguida, o tubo foi agitado exaustivamente, deixado em repouso até total separação das fases e coletado um volume de 500 μL de cada uma das fases (superior e inferior) para vials de HPLC separados. Os solventes foram evaporados até à secura sob vácuo a 35 °C e, em seguida, o material redissolvido em 1 mL de metanol.

Tabela 12: Sistemas solventes utilizados para avaliação da separação em cada fase.

Sistema	Hexano	Acetato de etila	Metanol	Água	Água (2% ác acético)	Butanol	Propanol
HEMWat 14	1	2	1	2	----	----	----
HEMWat 17	1	1	1	1	----	----	----
HEMWat 17-A	1	1	1	----	1	----	----
HEMWat 23-A	4	1	4	----	1	----	----
HEMWat 26	9	1	9	1	----	----	----
HEMWat 26-A	9	1	9	----	1	----	----
HEMWat 27	19	1	19	1	----	----	----
HEMWat 27-A	19	1	19	----	1	----	----
SSA	----	3,5	1,5	----	4,5	1,5	----
SSA 1	----	4,5	1,5	----	4,5	1,5	----
SSA 2	0,5	3,5	1,5	----	4,5	1,5	----
SSA 3	0,5	2,3	1	----	3	0,5	----
SSA 4	0,5	2	1	----	2	0,5	----
SSB 1	1	2	1	----	2	----	0,5

3.2. Análise cromatográfica por HPLC-DAD

A composição de cada uma das fases foi determinada por análise em HPLC (Alliance Waters 2695, Waters, Manchester, England). A eluição feita por gradiente com fluxo de 1 mL/min, utilizando como fase móvel A água purificada (Milli-Q) com 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA) e como fase móvel B acetonitrila (grau cromatográfico), de acordo com o sistema de gradiente mostrado na Tabela 13. Sendo injetado 10 μL de cada amostra armazenada no auto injetor do equipamento. O detector de arranjo de diodos (DAD) (210–800 nm) acoplado foi um Waters 2996 e utilizada uma coluna Sunfire C18 (150 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μm) (Waters, Milford, MA, USA).

Tabela 13: Gradiente para avaliação cromatográfica.

Tempo (min)	% eluente A (água purificada com 0,05 % de TFA)	% eluente B (acetoneitrila)
Início	90	10
60	0	100
90	0	100
90,5	90	10
100	90	10
130	90	10

3.3. Procedimento de separação cromatografia de contra corrente de alta eficiência (CCC)

3.3.1.SPECTRUM:

A obtenção de frações semi purificadas foram realizadas por CCC em um sistema DE-SPECTRUM (Dynamic Extractions - Tredegar, UK), acoplado à duas bombas Agilent HP1200 (Santa Clara, California, USA), detector DAD Agilent HP1200 (Santa Clara, California, USA) e coletor de frações automático Foxy 96 Jr, Teledyne Isco (Lincoln, Nebraska, U.S.A.).

Em cada separação, a bobina de volume total de 73 mL foi cheia com a fase estacionária, e em seguida inicia-se o processo de centrifugação com uma velocidade de rotação de 1600 rpm a 30 °C. A fase móvel foi então bombeada para a coluna com fluxo de 2 mL/min. Após equilíbrio hidrodinâmico estável, 178 a 356 mg de amostra solubilizada em volume proporcional de fase de inferior do sistema de solvente selecionado (LP) para concentração final entre 50 – 100 mg/mL acondicionada em *loop* de 3,56 mL foi injetada na bobina. As frações separadas foram recolhidas a cada 2 min, com base no traço de UV determinado para cada composto. O tempo total de corrida foi estabelecido para 180 minutos após início da injeção da amostra na bobina.

3.3.2.MIDI:

A obtenção de frações semi purificadas foram realizadas por CCC em um sistema DE-Midi (Dynamic Extractions - Slough, UK), acoplado à duas bombas Knauer K-1800 (Berlin, Germany), detector DAD Agilent HP1200 (Santa Clara, California, USA) com célula preparativa e coletor de frações automático Gilson FC202 (Villiers-le-Bel, France).

Em cada separação preparativa a bobina, de volume total de 453 mL para uma coluna e de 912,5 mL para duas colunas, foi cheia com a fase estacionária e, em seguida, iniciou-se o processo de centrifugação com uma velocidade de rotação de 1250 rpm a 30 °C.

A fase móvel foi então bombeada para a coluna com fluxo de 12 ou 24 mL/min, respectivamente para uma ou duas colunas. Após equilíbrio hidrodinâmico estável, a massa de amostra solubilizada em proporção de 80% de fase inferior para 20% de fase superior do sistema de solvente selecionado (4:1, LP:UP) com *loop* de 100 mL aquecido a 40 °C foi injetada na bobina. As frações separadas foram recolhidas a cada 2 min, com base no traço de UV determinado para cada composto. O tempo total de corrida foi estabelecido para 180 minutos após início da injeção da amostra na bobina.

3.3.2.1.Otimização do tamanho da amostra MIDI

Foi investigada a inserção de diferentes quantidades por corrida (2,5 – 8,0 g) mantendo-se a concentração final da amostra de 100 mg/mL introduzida no CCC.

3.4. Cromatografia em camada delgada

As análises das frações iniciais foram realizadas por cromatografia em camada delgada (TLC) em placas de sílica gel de fase normal 60 GF₂₅₄ (Merck Art. 05554, Darmstadt, Germany). O desenvolvimento das placas foi realizado com hexano : acetona 4:1 (v/v). Após desenvolvimento e secagem dos solventes, as placas foram nebulizadas com H₂SO₄ (1%, v/v) e vanilina (6% m/v), ambos em etanol, e aquecidas em estufa a 105 °C. Essas placas de TLC foram usadas durante o desenvolvimento inicial do método no equipamento analítico (Spectrum) e no aumento de escala até o equipamento preparativo (MIDI). As frações com composições semelhantes foram reunidas.

3.5. Análise por UHPLC-MS das frações

Inicialmente as frações, tanto aquosas quanto hidroetanólicas, foram agrupadas de acordo com suas características e analisadas em cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas Acquity UPLC-TQD (Waters, Manchester, England), utilizando uma coluna C18 BEH Acquity Waters (1,7 mm × 2,1 mm × 50 mm). A eluição foi realizada com fluxo de 200 µL/min e temperatura do forno de 30 °C. Solvente A água purificada Milli-Q com 0,1% ácido fórmico e Solvente B acetonitrila grau HPLC (JT Baker, PA, USA). O gradiente inicia com 10% B, aumentando para 25% B em 4 min, até 100% B quando em 10 min, mantendo-se em 100% B até 12,5 min retornando a condição inicial e estabilizando em 15 min. Detector com fonte de ionização por eletrospray (ESI), realizando varredura em modo positivo e negativo, selecionando *m/z* na faixa entre 100-1000, nas

seguintes condições: capilar de ± 3000 V, cone de ± 35 V, extrator de 1,0 V, temperatura da fonte de 150 °C e temperatura de dessolvatação de 300 °C.

4. RESULTADOS

4.1. Quantidade e Composição dos extratos secos

Na Tabela 14, estão apresentados o total de extratos secos usados para fracionamento por CCC. A Figura 40 apresenta os cromatogramas UHPLC-MS dos extratos secos. Os principais picos obtidos nos modos positivo e negativo foram numerados e identificados por comparação com padrões comerciais ou doados, sendo os tempos de retenção e a razão massa carga apresentados na Tabela 15.

Tabela 14: Massa total de extratos secos

Extrato	Massa (g)
<i>Mikania glomerata</i> hidroetanólicos (Mget)	62,3
<i>Mikania laevigata</i> hidroetanólicos (Mlet)	40,0
<i>Mikania glomerata</i> aquosos (Mgaq)	29,2
<i>Mikania laevigata</i> aquosos (Mlaq)	24,5

Tabela 15: Padrões comerciais, razão massa/carga (m/z), modo de ionização (MS) e faixa de tempo de retenção (tR)

Composto	m/z	MS	tR (min)
Cumarina	147	+	4,85 – 5,05
Umbeliferona	163	+	3,46 – 3,66
Ácido p-cumárico	163	-	3,23 – 3,43
Ácido o-cumárico	163	-	4,59 – 4,79
Ácido Cafeico	179	-	2,36 – 2,56
Ácido Caurenóico	301	-	10,37 – 10,57
Ácido Cupressênico	301	-	10,48 – 10,68
Ácido Grandiflórico	317	-	7,61 – 7,81
Ácido Clorogênico	353	-	1,84 – 2,04

Na Figura 41 apresentamos as placas cromatográficas dos mesmos extratos observados com luz visível e UV 254, e revelados com vanilina sulfúrica. Este método cromatográfico e de revelação foi usado durante todo o desenvolvimento do método por CCC no SPECTRUM e aumento de escala no MIDI.

Comparando-se os dois conjuntos de cromatogramas, é claro que os extratos hidroetanólicos apresentam uma composição mais complexa, com compostos polares e relativamente não polares. A maioria dos compostos pode ser observada em cromatogramas

UHPLC-MS de modo iônico positivo e negativo, exceto para cumarina (somente no modo íon positivo).

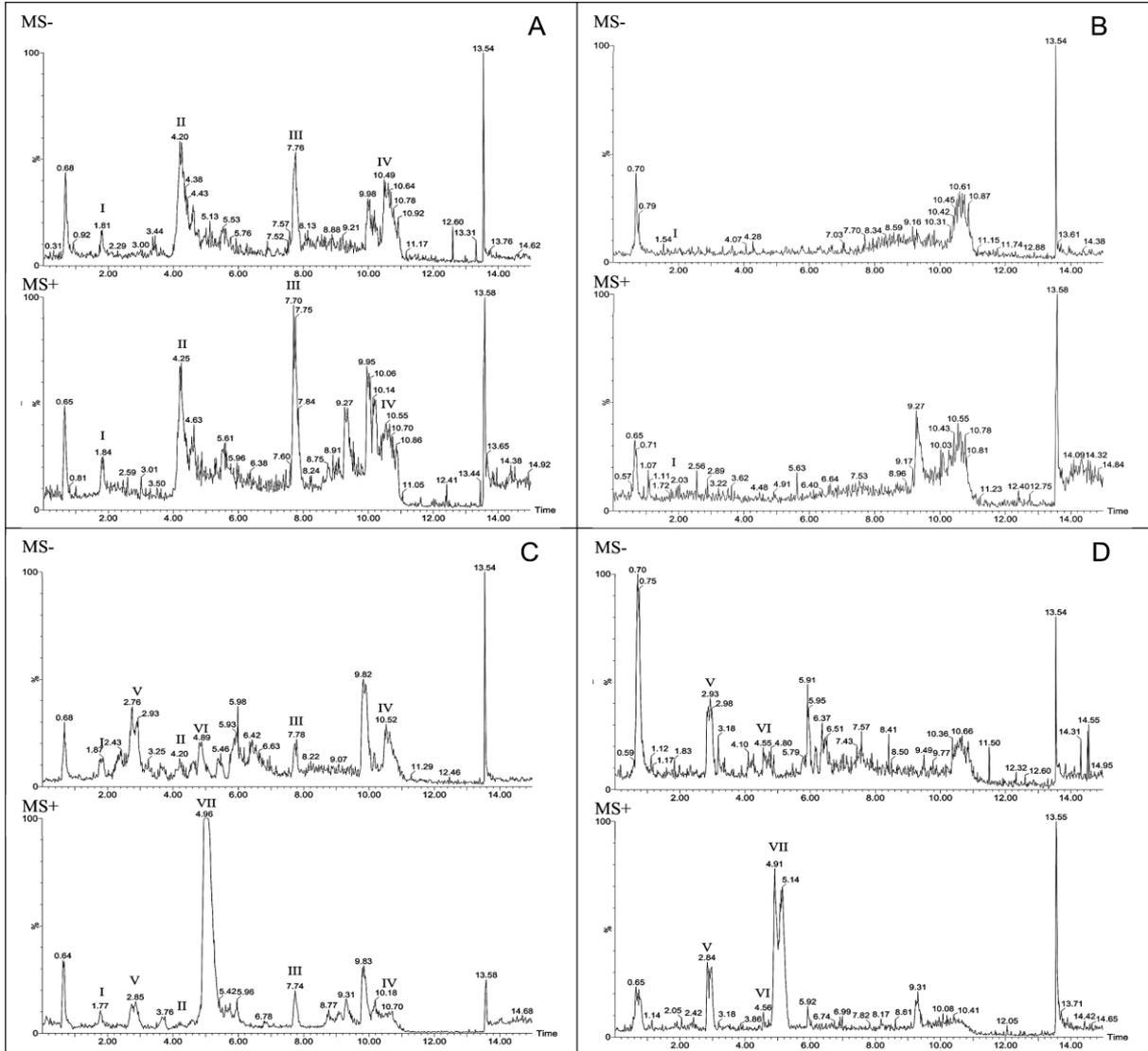


Figura 40 – Cromatograma UHPLC-MS em modo íons positivos e negativos dos extratos secos de: (A) Mget, (B) Mgaq, (C) Mlet e (D) Mlaq. Onde: (I) ácido clorogênico, (II) ácido dicafeoilquinico, (III) ácido grandiflórico, (IV) ácidos caurenóico e cupressênico, (V) cis-trans melilotosídeo e ácido cafeico, (VI) ácido o-cumárico, (VII) cumarina.

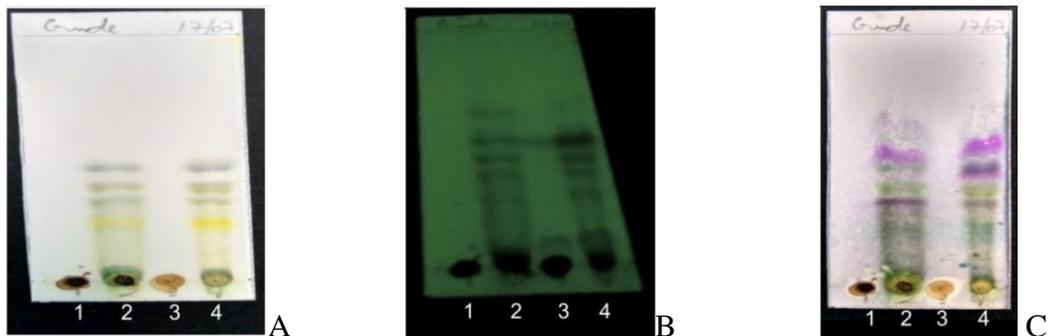


Figura 41 – Análise de TLC dos extratos brutos: (A) desenvolvimento em hexano: acetona (4:1), (B) 254 nm e (C) Vanilina-ácido sulfúrico 1 %. Onde (1) Mgaq, (2) Mget, (3) Mlaq e (4) Mlet.

4.2. Seleção sistema de solventes

Os extratos de ambas as espécies são muito complexos, possibilitando a divisão do cromatograma obtido pela análise de HPLC em 5 blocos distintos. Como pode ser verificado na Figura 42. O extrato modelo para a seleção do sistema foi o Mget, devido a maior quantidade deste.

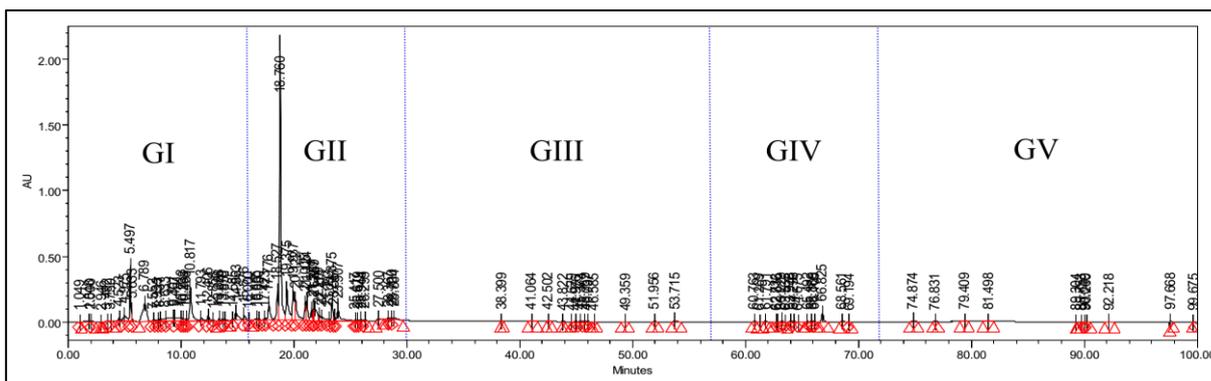


Figura 42 – Divisão do cromatograma do extrato de *Mikania glomerata* hidroetanólico em blocos de acordo com o tempo de eluição: (GI) 0-16min; (GII) 16,1-30min; (GIII) 30,1-57min; (GIV) 57,1-72min e (GV) 72,1-100min.

Devido a complexidade presente, foi improvável que pudéssemos separar compostos individuais com apenas um sistema solvente, sendo indicado desde o início a necessidade de uso de gradiente.

Os sistemas testados e os resultados observados estão apresentados na Tabela 16, cujos cromatogramas que contribuíram para estas informações, obtidos através da análise por HPLC nas condições descritas em 2.2. (Análise cromatográfica por HPLC-DAD), estão apresentados nas Figuras 43 e 44.

Tabela 16: Teste sistema solvente (10 mg Mget em 4 mL SS) analisados em HPLC

Sistema Solvente (SS)	UP	LP
HEMWat 14	GIV	GI-III
HEMWat 14-A	GIV e ~10% GII	GI e GIII; ~90% GII
HEMWat 17	GIV	Alguns picos GII
HEMWat 17-A	~80% GIV	GI-III e ~20% GIV
SSA	GIV, GIII, ~70% GII, ~50% GI	~30% GII, ~50% GI
SSA 1	GIV, GIII, ~70% GII, ~50% GI	~30% GII, ~50% GI
SSA 2	GIV, GIII, ~70% GII, ~50% GI	~30% GII, ~50% GI
SSA 3	GIV, GIII, ~70% GII, ~50% GI	~30% GII, ~50% GI
SSA 4	GIV, GIII, ~70% GII, ~50% GI	~30% GII, ~50% GI
SSB 1	Poucos GI	GI, GII

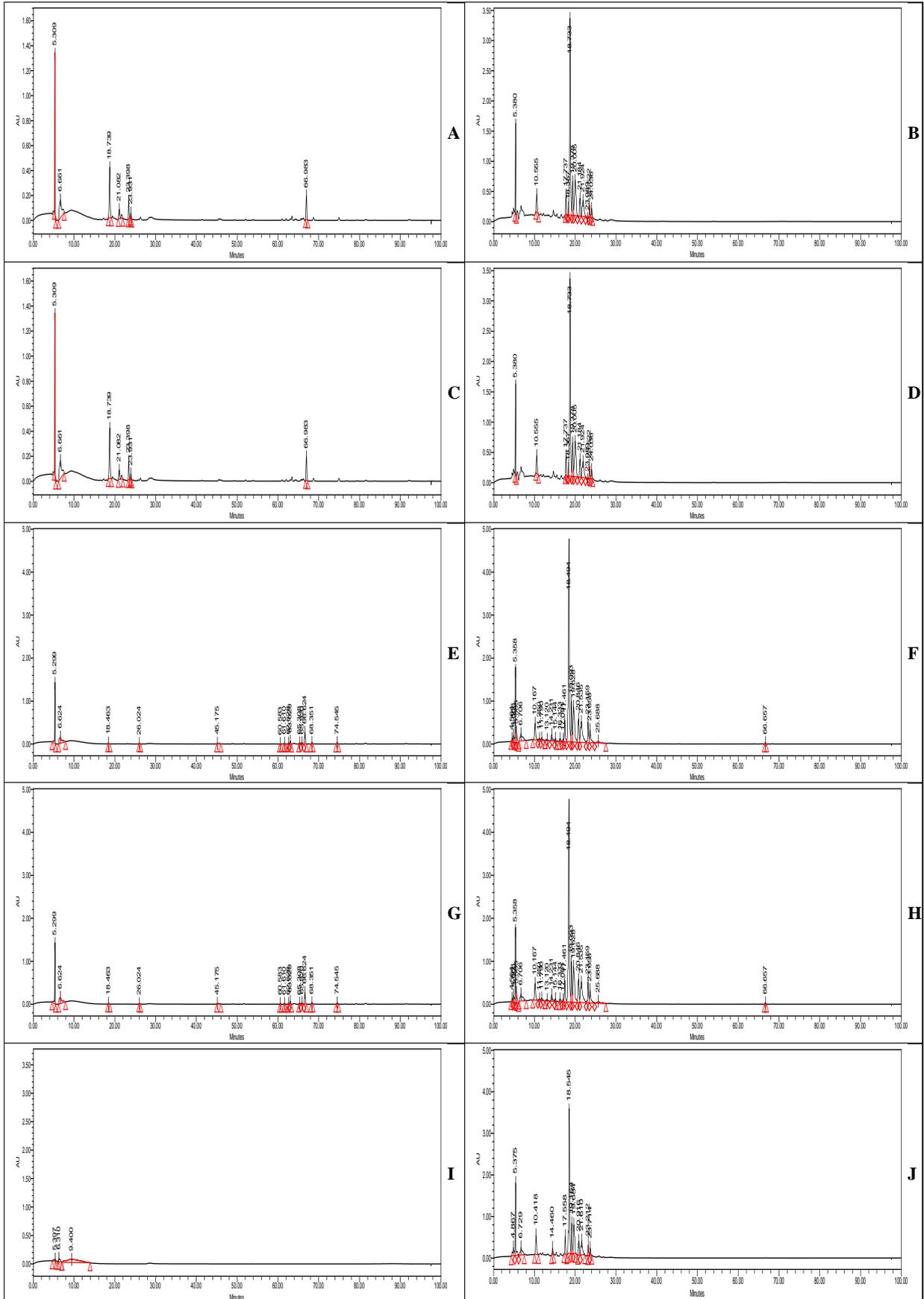


Figura 43 – Teste sistema solvente (10 mg Mget em 4 mL SS) analisados em HPLC. (A) HEMWat 14 – UP; (B) HEMWat 14 – LP; (C) HEMWat 14-A – UP; (D) HEMWat 14-A – LP; (E) HEMWat 17 – UP; (F) HEMWat 17 – LP; (G) HEMWat 17-A – UP; (H) HEMWat 17-A – LP; (I) SSB 1 – UP; (J) SSB 1 – LP.

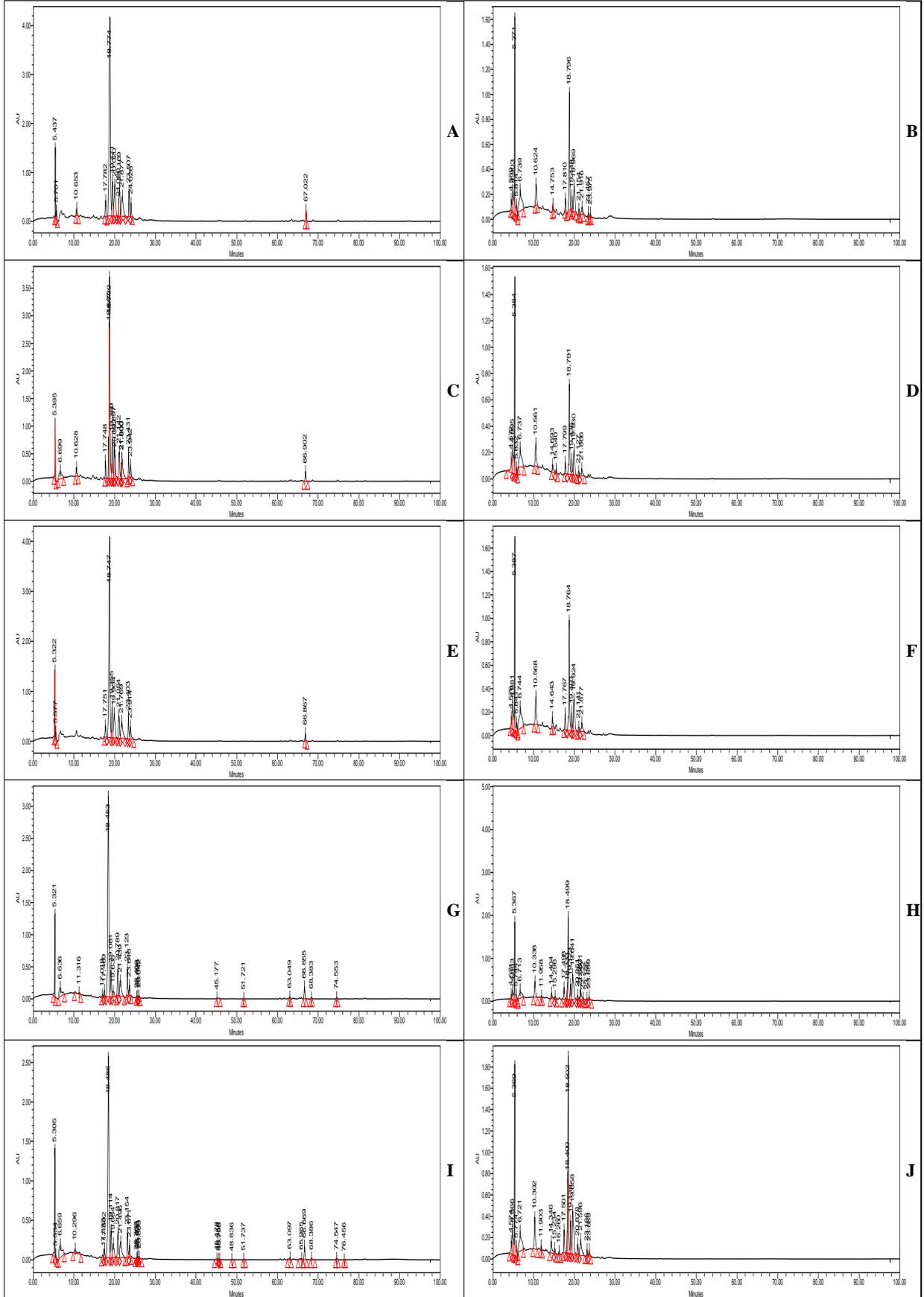


Figura 44 – Teste sistema solvente (10 mg Mget em 4 mL SS) analisados em HPLC. (A) SSA – UP; (B) SSA – LP; (C) SSA 1 – UP; (D) SSA 1 – LP; (E) SSA 2 – UP; (F) SSA 2 – LP; (G) SSA 3 – UP; (H) SSA 3 – LP; (I) SSA 4 – UP; (J) SSA 4 – LP.

A análise dos resultados obtidos através da observação da distribuição dos componentes do extrato apresentados nos cromatogramas dos diversos sistemas solventes (SS) foi possível afirmar que, comparado o sistema HEMWat 17 com o HEMWat 17-A, o UP é muito similar, já em LP os picos em GI e GII com o acréscimo de 2% de ácido acético na água foram melhor resolvidos e que os picos no GIV foram separados em ambas as fases com uma relação de aproximadamente 4:1(UP:LP). Quando introduzido o ácido acético em LP em HEMWat 14 não houve qualquer diferença na distribuição GIII. No entanto, ao desenvolver o SSA alterando o HEMWat 14-A, deslocando o equilíbrio dentro do sistema do acetato de etila e metanol para a UP, o GIII mudou de LP para UP completamente. Demonstrando que o GIII contém compostos neutros que são mais polares do que o GIV, mas não são polares o suficiente para preferir permanecer na fase aquosa.

Os SSA e SSA1 UP contêm picos adicionais dentro da faixa de 74-84 min, bem separados, que não estavam presentes no extrato original. Ao comparar todos os cromatogramas obtidos para o Sistema A (SSA-SSA4) não houveram distribuições diferentes entre as duas fases dos compostos detectáveis presentes no extrato.

Assim como o Sistema A, o SSB 1 foi originado a partir do sistema HEMWat 14-A, com a adição de propanol ao invés de butanol, resultando que todos os compostos dos grupos GI e GII que estavam no UP em SSA fossem comutados para LP em SSB1 e a supressão dos grupos GIII e GIV em ambas as fases.

Devido ao processo muito extenso para a análise por HPLC-DAD das frações, 130 minutos por análise, buscou-se uma técnica mais rápida que pudesse ser aplicada e que todos os compostos majoritários fossem verificados. A cromatografia de camada delgada, referenciada em 2.4 demonstrou ser uma técnica passível de utilização para a comparação dos diversos sistemas testados, como apresentado nas Figuras 45 e 46.

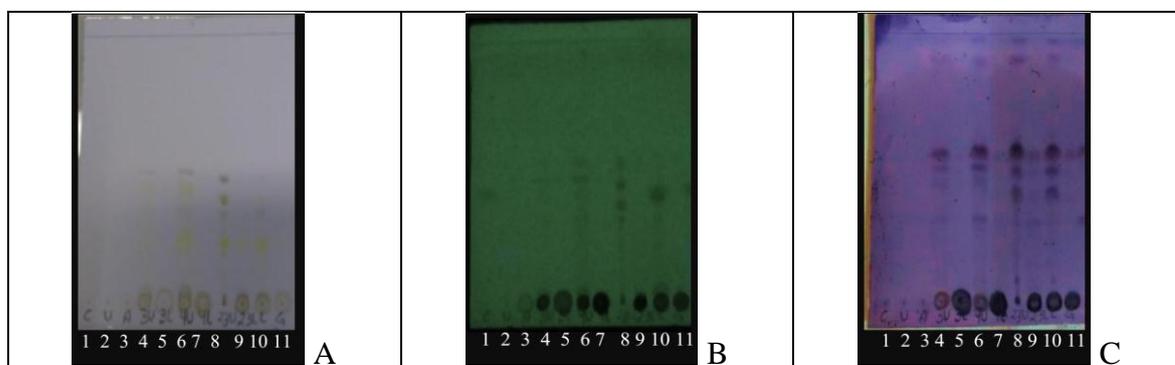


Figura 45 – Análise de TLC dos extratos brutos e sistemas solventes: (A) desenvolvimento em hexano: acetona (4:1), (B) 254 nm e (C) Vanilina-ácido sulfúrico 1 %. Onde (1) Cumarina, (2) Umbeliferona, (3) ácido clorogênico, (4) SSA 3 –UP, (5) SSA 3 –LP, (6) SSA 4 –UP, (7) SSA 4 –LP, (8) SSA 23 –UP, (9) SSA 23 –LP, (10) Mlet e (11) MGet.

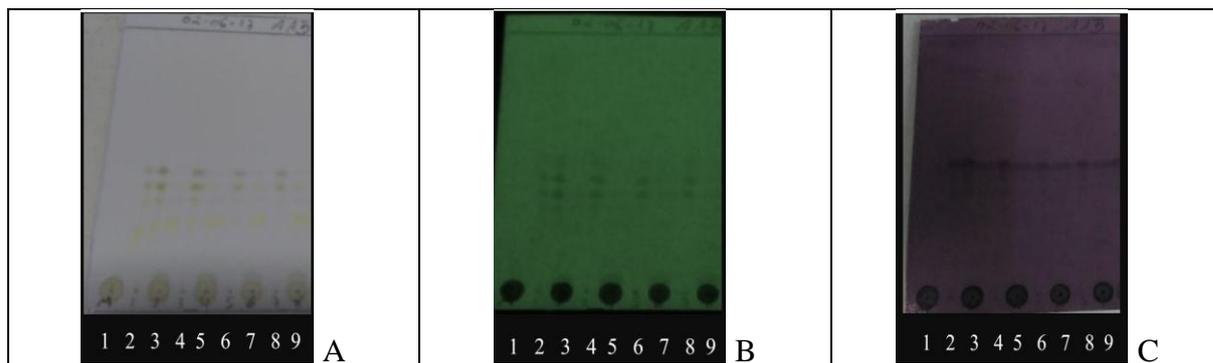


Figura 46 – Análise de TLC dos extratos brutos e sistemas solventes: (A) desenvolvimento em hexano: acetona (4:1), (B) 254 nm e (C) Vanilina-ácido sulfúrico 1 %. Onde (1) MGet, (2) HEMWat 26-A –UP, (3) HEMWat 26-A –LP, (4) HEMWat 26–UP, (5) HEMWat 26–LP, (6) HEMWat 27-A–UP, (7) HEMWat 27-A–LP, (8) HEMWat 27–UP e (9) HEMWat 27–LP.

De acordo com os resultados apresentados ao analisar as Figuras 45 e 46, os sistemas propostos que apresentaram melhor separação dos componentes do extrato submetido e que foram empregados como fases na análise de CCC foram: SSA3, SSA4, HEMWat 17, HEMWat 27, HEMWat 17A e HEMWat 27A.

4.3. Desenvolvimento do método por CCC

Com base nos sistemas testados na seleção de solventes, inicialmente, usando o equipamento Spectrum, foram testados na forma de gradiente os sistemas SSA3 – SSA4, HEMWat 17-27 e HEMWat 17A-27A.

O sistema SS não apresentou nenhuma separação quando submetido ao CCC, por isso foi descartado o uso. Já a substituição da água por solução aquosa de ácido acético 2% demonstrou melhor resolução/separação que os sistemas solventes originais. Inicialmente os extratos estavam sendo submetidos ao CCC como fase reversa (RP), mas quando iniciados os testes com os extratos aquosos, verificou-se que o melhor modo seria em fase normal (NP) devido ao aumento do tempo que o extrato ficaria retido na coluna cromatográfica do CCC, possibilitando assim melhor separação dos componentes presentes neste extrato. Assim sendo, os sistemas solventes que desenvolveram melhores condições de separação por gradiente foram, para os extratos hidroetanólicos uma fase reversa (RP): HEMWat 17A(1/1/1) – 27A (19/1/19) e para os aquosos uma fase normal (NP): 11A (1/4/1/4) – 7A (1/19/1/19).

Durante o aumento de escala para o método preparativo, primeiro foi feita uma avaliação da quantidade de amostra que poderia ser inserido no sistema MIDI. A Figura 47 compara os gráficos obtidos durante as corridas de CCC com dois comprimentos de onda diferentes (360 e 246nm). As três condições de massa/ tamanho de coluna usadas foram: 2,5

g/1 coluna; 4,0 g/ 2 colunas; 8,0 g / 2 colunas. A melhor condição foi definida como sendo o maior numero de frações em um escala de tempo menor com maior pureza para um mesmo tipo de extrato. A condição de 8,0 g / 2 colunas foi a escolhida devido à maior quantidade de extrato inserido e obtenção das frações com composição muito semelhante ao das condições com menor quantidade de amostra.

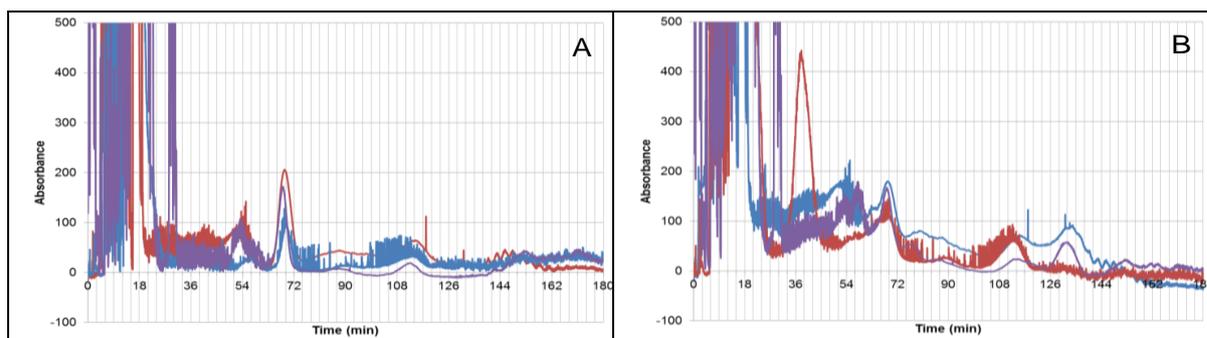


Figura 47 – MIDI, 456 mL (cada coluna), 4,0 mm diâmetro interno da coluna, 1250 rpm, 30 °C, Gradiente RP HEMWat 17A-27A em 120min após passagem do solvente, Mget em 40 mL LP-17A e 10 mL UP-17A, loop de 50 mL aquecido à 40°C, massa de amostra e numero de colunas: — 2,5 g, 1 coluna; — 4,0 g, 1 coluna; — 8,0 g, 2 colunas, comprimento de onda utilizado: (A) 360 nm e (B) 246 nm.

A Figura 48 ilustra bem que, apesar do aumento de escala ao transferir as condições de separação do equipamento SPECTRUM para o MIDI, o perfil se mantém comparando-se as quantidades em massa obtidas proporcional a 1mg de extrato bruto em cada equipamento. Especialmente no caso dos extratos aquosos (Figura 48 B) a quantidade de frações enriquecidas melhora com o aumento de escala.

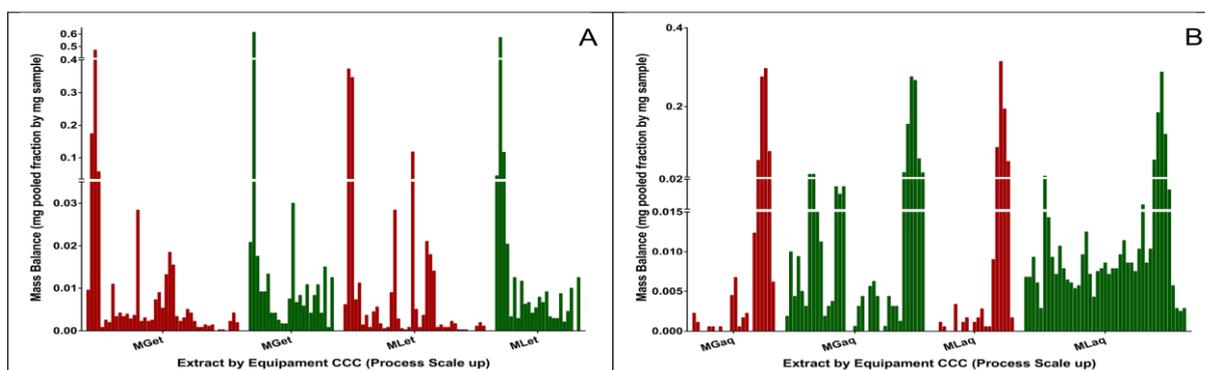


Figura 48 – Balanço de massas, em mg de agrupamento de frações obtidas por mg de amostra, em 120 min após passagem do solvente. Equipamento: ■ Spectrum, ■ MIDI. Extrato: (A) Hidroetanólico (Gradiente RP HEMWat 17A-27A) e (B) Aquoso (Gradiente NP HEMWat 11A-7A).

Foi verificada a reprodutibilidade de obtenção das frações dos dois métodos escolhidos: RP para os extratos hidroetanólicos (Figura 49) e NP para os extratos aquosos (Figura 50). Pequena variação entre corridas pode ser notada, principalmente nos extratos

hidroetanólicos, mas estas são causadas pela heterogeneidade dos próprios extratos, ocasionada pelo processo de secagem do solvente em concentrador a vácuo.

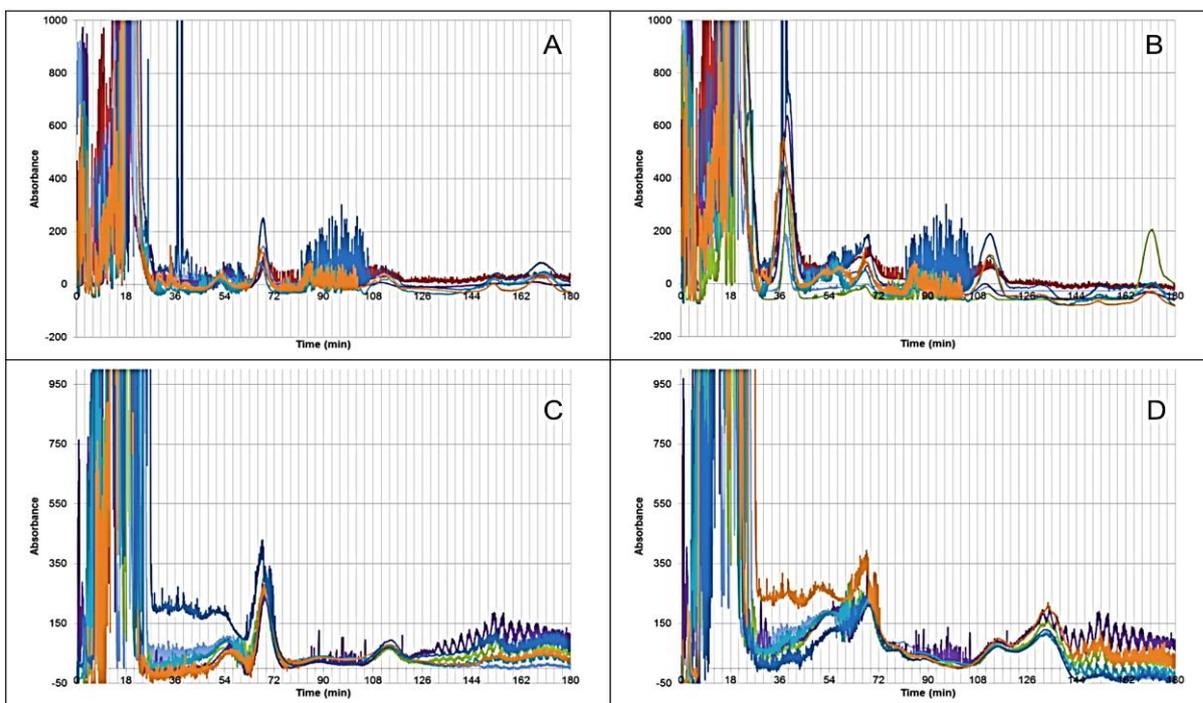


Figura 49 – MIDI, 912 mL, 4,0 mm diâmetro interno da coluna, 1250 rpm, 30 °C, Gradiente RP HEMWat 17A-27A em 120 min após passagem do solvente, 8,0 g amostra em 40 mL LP-17A e 10 mL UP-17A, loop de 50 mL aquecido à 40°C. Extrato: (A e B) *Mikania laevigata* hidroetanólico (C e D) *Mikania glomerata* hidroetanólico. Comprimento de onda utilizado: (A e C) 360nm, (B e D) 246nm.

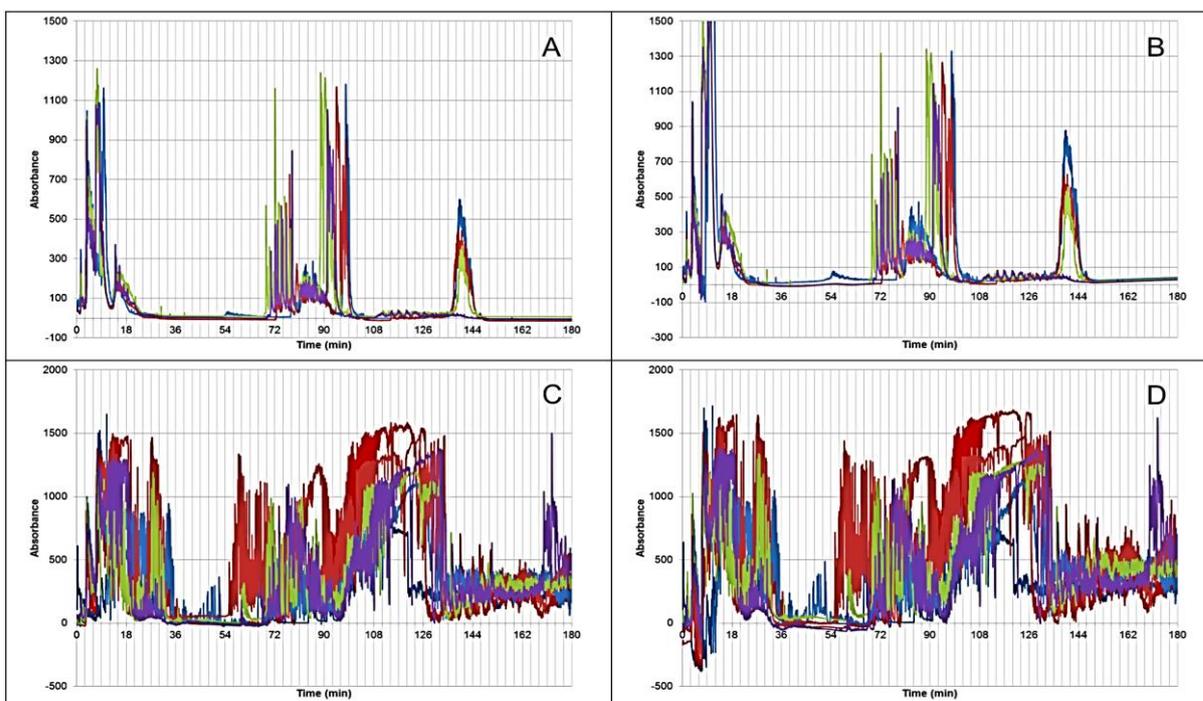


Figura 50 – MIDI, 912 mL, 4,0 mm diâmetro interno da coluna, 1250 rpm, 30 °C, Gradiente NP HEMWat 11A-7A em 120 min após passagem do solvente, 4,0 g amostra em 80 mL LP-11A, loop de 100 mL aquecido à 40°C. Extrato: (A e B) *Mikania laevigata* aquoso (C e D) *Mikania glomerata* aquoso. Comprimento de onda utilizado: (A e C) 360nm, (B e D) 246nm.

Foram coletadas frações (FR) a cada 2 minutos durante o gradiente no CCC e também durante a retirada da fase estacionária do sistema (SP). Todas estas frações foram avaliadas inicialmente pelo cromatograma observado no detector do MIDI (Figuras 49 e 50) e agrupadas de acordo com os picos encontrados. O solvente das frações agrupadas (P) foi evaporado e foram pesadas para o cálculo de balanço de massa.

4.4. Balanço de Massa

Um dos principais motivos para o uso de CCC no fracionamento de extratos naturais complexos é a possibilidade de recuperar quase todo o extrato inserido no sistema. Sistemas de cromatografia preparativa com uma fase sólida, frequentemente retêm parte da amostra. Deste modo obtêm-se frações e compostos com maior pureza e recuperação de alvos específicos envolvidos a um menor custo quando comparado as técnicas de separação utilizadas atualmente (Zhang *et al.*, 2012).

O balanço de massa (massa inserida no sistema e recuperada) para os extratos hidroetanólicos (Mget e Mlet) é apresentada na Tabela 17. A recuperação de frações enriquecidas através do processo variou entre 83,93 – 91,09% do extrato inserido no equipamento MIDI. As perdas durante o processo foram causadas pela precipitação da amostra no *loop* de injeção devido a problemas de solubilidade na fase móvel. Este problema foi resolvido dissolvendo-se a amostra em uma mistura de solventes contendo 20% de fase estacionária e 80% fase móvel e aquecendo o *loop* através de banho de aquecimento com temperatura regulada para 40 °C. Esta perda não havia ocorrido no sistema SPECTRUM, que teve recuperação total (Tabela 18).

Praticamente não houve perda com os extratos aquosos no sistema MIDI, possivelmente devido à maior interação deste com a fase móvel (MP) e a menor quantidade de extrato submetido por injeção, obtendo-se uma recuperação de 99,36 e 103,94% como demonstrado na Tabela 19.

Tabela 17: Massa recuperada por conjunto de frações submetidas ao equipamento MIDI de acordo com a massa de extrato hidroetanólico utilizada inicialmente e tamanho da coluna de separação.

Grupo	MIDI - Uma Coluna			MIDI - Duas Colunas				
	Frações	Mget 2,5g	Mget 4,0g	Frações	Mget 4,0g	Frações	Mlet 4,0g	Mlet 8,0g
		Massa Frações (g)	Massa Frações (g)		Massa Frações (g)		Massa Frações (g)	Massa Frações (g)
P1	1-7	0,91	2,08	1-7	0,25	1-7	1,07	0,33
P2	8-10	9,59	21,93	8-10	7,37	8-11	13,74	4,23
P3	11	0,44	1,01	11	0,21	12-15	2,80	0,85
P4	12-14	0,64	1,47	12-15	0,11	16-21	0,49	1,61
P5	15-18	0,23	0,56	16-20	0,11	22-25	0,08	2,54
P6	19-21	0,11	0,35	21-27	0,16	26-29	0,30	0,34
P7	22	0,11	0,13	28-32	0,05	30-32	0,07	1,26
P8	23	0,08	0,10	33-34	0,05	33-37	0,28	0,40
P9	24-25	0,05	0,21	35	0,03	38-41	0,15	0,71
P10	26-27	0,19	0,14	36-38	0,02	42-47	0,16	1,06
P11	28-31	0,16	0,35	39-41	0,02	48-50	0,10	1,08
P12	32-33	0,03	0,13	42-47	0,09	51-54	0,13	1,21
P13	34-35	0,05	0,15	48-50	0,36	55-60	0,19	2,43
P14	36-39	0,19	0,48	51-53	0,08	61-63	0,16	1,42
P15	40-41	0,14	0,35	54-59	0,10	64-69	0,22	4,10
P16	42-45	0,65	1,74	60-62	0,07	70-72	0,08	1,21
P17	46-48	0,21	0,59	63-68	0,13	73-76	0,07	1,14
P18	49-53	0,47	0,58	69-73	0,05	77-79	0,07	1,47
P19	54-SP1	0,38	0,79	74-80	0,10	80-82	0,21	0,66
P20	SP2-SP5	0,18	0,37	81-90	0,13	83-89	0,05	3,36
P21	SP6-SP9	0,56	1,01	SP1-SP6	0,05	90-SP6	0,11	2,12
P22	SP10-SP11	0,57	0,56	SP7-SP11	0,18	SP7-SP12	0,24	2,15
P23	-----	-----	-----	SP12-SP17	0,01	SP13-SP17	0,00	1,54
P24	-----	-----	-----	SP18-SP22	0,15	SP18-SP22	0,30	3,07
	Massa Total das Frações (g)	15,94	35,08	Massa Total das Frações (g)	9,88	Massa Total das Frações (g)	21,07	40,29
	Extrato Bruto Total (g)	17,50	40,00	Extrato Bruto Total (g)	12,00	Extrato Bruto Total (g)	24,00	48,00
	% recuperação	91,09	87,70	% recuperação	82,33	% recuperação	87,79	83,93

Tabela 18: Massa recuperada por conjunto de frações submetidas ao equipamento SPECTRUM de acordo com a massa de extrato hidroetanólico utilizada inicialmente e tamanho da coluna de separação.

SPECTRUM – Mget						SPECTRUM – Mlet					
Grupo	Frações	Massa Frações (mg)	Grupo	Frações	Massa Frações (mg)	Grupo	Frações	Massa Frações (mg)	Grupo	Frações	Massa Frações (mg)
P1	1-5	2,2	P23	61-62	1,3	P1	1-5	3,4	P23	61-64	4,7
P2	6*	132,6	P24	63-65	7,5	P2	6-7	61,7	P24	65*-66	6,6
P3	7	123,2	P25	66*-67	6,4	P3	8*	167,8	P25	67-72	5,5
P4	8*	2,6	P26	68-70	5	P4	9-12	20,4	P26	73-75	1,2
P5	9-10	4	P27	71-75	0,3	P5	13	0,3	P27	76*-77	0,8
P6	11-16	0,5	P28	76*	0,5	P6	14-15	0,9	P28	78-79	1,1
P7	17-18*	1,3	P29	77-78	0,3	P7	16	0,7	P29	80-84	1,8
P8	19-20	0,3	P30	79-84	0,3	P8	17-19*	3,9	P30	85-87*	1,5
P9	21-24	1,6	P31	85*-86	0,8	P9	20*	1,2	P31	88-90	0,8
P10	25-26*	2	P32	87-90	0,6	P10	21-22	1,5	P32	SP4	0,3
P11	27*	0,6	P33	SP8	0,1	P11	23-24	1,2	P33	SP5	0,3
P12	28-29	0,2	P34	SP9	0,1	P12	25*-26	1,4	P34	SP6	0,5
P13	30-32	0,3	P35	SP10	0,1	P13	27-29	1,0	P35	SP7	0,4
P14	33-34*	3,2	P36	SP11	0	P14	30-32	1,3	P36	SP8	0,5
P15	35-36	10,1	P37	SP12	0	P15	33*-34*	10,1	P37	SP9	0,0
P16	37-43	1	P38	SP13	0,4	P16	35-36	0,8	P38	SP10	0,1
P17	44*	0,2	P39	SP14	0,7	P17	37-42	1,1	P39	SP11	0,1
P18	45	0,1	P40	SP15	0,4	P18	43*	0,8	P40	SP12	0,0
P19	46-55	0,3	-----	-----	-----	P19	44-46	0,9	P41	SP13	0,8
P20	56*-57	41,9	-----	-----	-----	P20	47-55	2,6	P42	SP14	1,5
P21	58-59	1,8	-----	-----	-----	P21	56*-57*	3,2	P43	SP15	0,7
P22	60*	0,3	-----	-----	-----	P22	58-60	1,9	-----	-----	-----
Massa Total das Frações (mg)					355,1	Massa Total das Frações (mg)					317,3
Extrato Bruto Total (mg)					356,0	Extrato Bruto Total (mg)					356,0
% recuperação					99,74	% recuperação					89,13

Tabela 19: Massa recuperada por conjunto de frações submetidas ao equipamento MIDI de acordo com a massa de extrato aquoso inicial.

MIDI – Duas Colunas				
Grupo	Frações	Mgaq 4,0g	Frações	Mlaq 4,0g
		Massa Frações (g)		Massa Frações (g)
P1	1-5	0,19	1-4	0,03
P2	6-7	0,19	5	0,16
P3	8-10	0,26	6	0,07
P4	11	0,17	7-8	0,15
P5	12	0,08	9-10	0,08
P6	13-18	0,62	11-12	0,05
P7	19-25	0,40	13-20	0,43
P8	26-32	0,26	21-31	0,43
P9	33-36	0,20	32-40	0,24
P10	37-38	0,30	41-43	0,18
P11	39-42	0,22	44-45	0,03
P12	43-47	0,18	46-49	0,05
P13	48-51	0,17	50-53	0,06
P14	52-55	0,15	54-64	0,30
P15	56-60	0,16	65-75	0,28
P16	61-68	0,27	76-90	0,30
P17	69-79	0,35	SP1-SP3	0,01
P18	80-85	0,20	SP4	0,05
P19	86-90	0,12	SP5-SP9	0,33
P20	SP1-SP2	0,43	SP10-SP13	0,13
P21	SP3-SP5	0,66	SP14	0,05
P22	SP6-SP8	0,81	SP15-SP21	13,22
P23	SP9-SP11	0,69	-----	-----
P24	SP12-SP16	3,03	-----	-----
P25	SP17-SP20	17,32	-----	-----
P26	SP21-SP24	0,39	-----	-----
	Massa Total das Frações (g)	27,82	Massa Total das Frações (g)	16,63
	Extrato Bruto Total (g)	28,00	Extrato Bruto Total (g)	16,00
	% recuperação	99,36	% recuperação	103,94

4.5. Composição das Frações

Na Figura 51, observamos um exemplo de frações selecionadas obtidas do extrato de Mlet por TLC. M é o extrato de Mlet original e todos os outros são frações coletadas. Está claro como a composição muda ao longo do processo de fracionamento, embora nenhum composto isolado pode ser coletado devido à complexidade dos extratos.

Os cromatogramas obtidos através de UHPLC-MS de todas as frações agrupadas estão apresentados no Apêndice 1 para extratos hidroetanólicos e Apêndice 2 para extratos aquosos.

A análise UHPLC-MS dessas frações nos permitiu escolher frações específicas, com diferentes composições, para posterior análise da bioatividade. Estas frações selecionadas são mostradas na Figura 52 e os principais componentes identificados destas frações são: ácido clorogênico, cis-trans melilotosideo, ácido cafeico, ácido dicafeoilquínico, ácido o-cumárico, cumarina, ácido grandiflórico, ácido caurenóico e ácido cupressênico. É claro que muitos compostos não identificados estão presentes nas frações e serão objeto de estudos futuros.

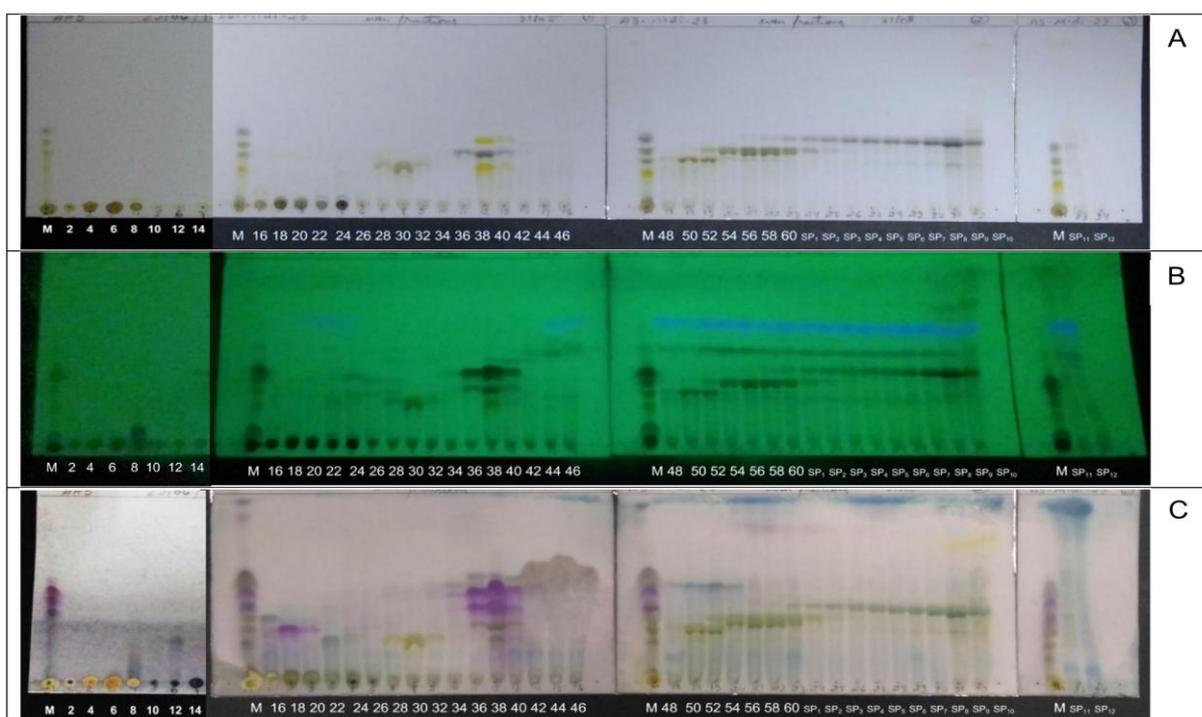


Figura 51 – Análise de TLC das frações selecionadas de Mlet, (A) desenvolvimento em hexano: acetona (4:1), (B) 254 nm e (C) Vanilina-ácido sulfúrico 1 %. (MIDI, 912 mL, 4,0 mm diâmetro interno da coluna, 1250 rpm, 30 °C, Gradiente RP HEMWat 17A-27A em 120 min após passagem do solvente, fluxo 24mL/min, 8,0 g amostra em 40 mL LP-17A e 10 mL UP-17A, *loop* de 50 mL aquecido à 40°C).

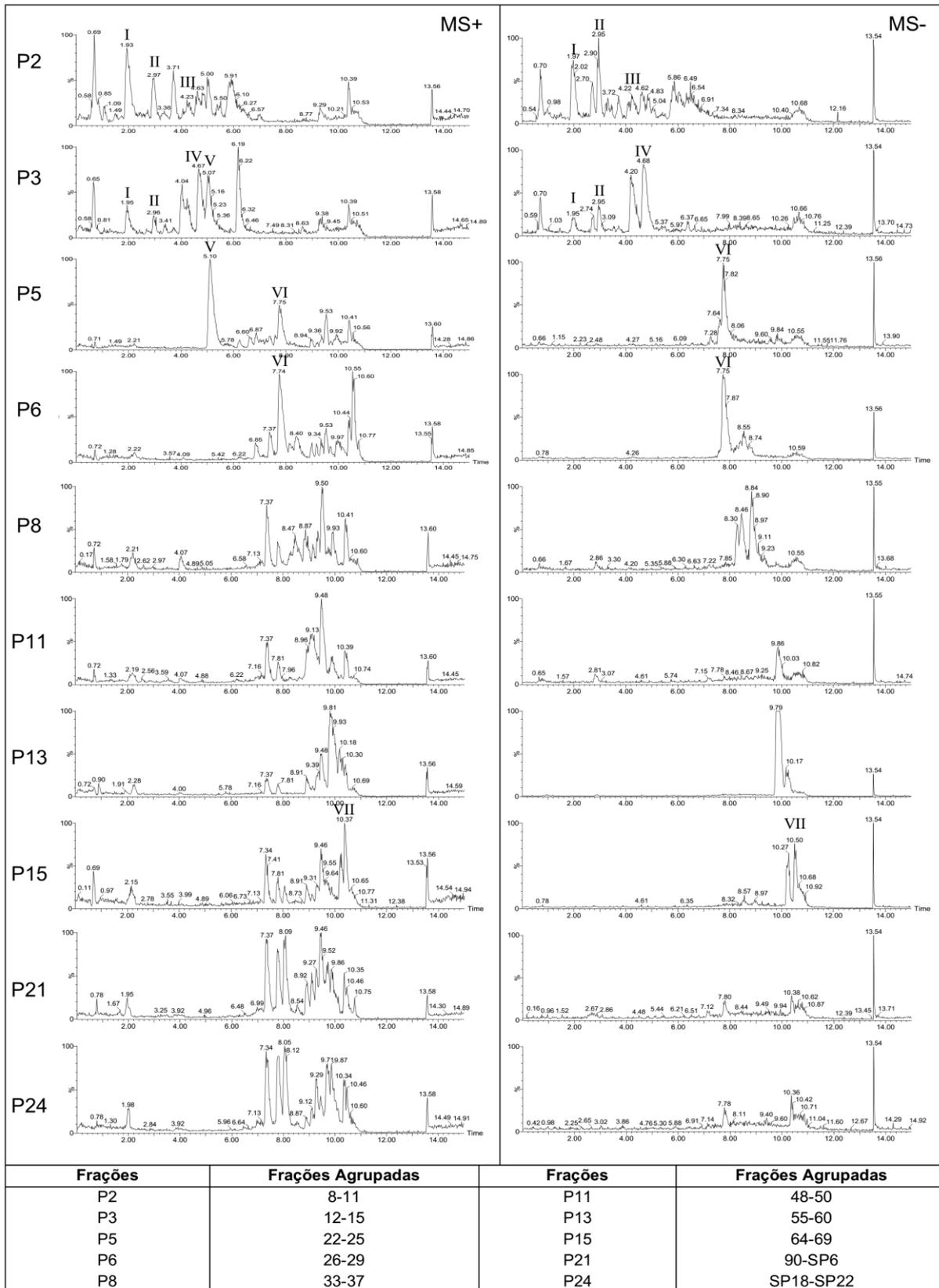


Figura 52 – UHPLC-MS das frações enriquecidas de Mlet, enriquecida em componente específico. (MIDI, 912 mL, 4,0 mm diâmetro interno da coluna, 1250 rpm, 30 °C, Gradiente RP HEMWat 17A-27A em 120 min após passagem do solvente, fluxo 24mL/min, 8,0 g amostra em 40 mL LP-17A e 10 mL UP-17A, loop de 50 mL aquecido à 40°C). (I) ácido clorogênico, (II) cis-trans melilotosídeo e ácido cafeico, (III) ácido dicafeoilquinico, (IV) ácido o-cumárico, (V) cumarina, (VI) ácido grandiflorico, (VII) ácidos caurenico e cupressênico.

5. CONCLUSÕES

Considerando a matriz complexa presente nos quatro tipos de extratos submetidos à CCC, o método demonstrou excelente robustez e possibilidade de escalonamento para obtenção de frações enriquecidas. O método CCC desenvolvido e otimizado foi ampliado para aumentar a produtividade 22 vezes, mantendo o tempo de execução original e, em alguns casos, até melhorando a eficiência da separação. A porcentagem de recuperação das frações submetidas à CCC foi superior aos métodos tradicionais, como a cromatografia preparativa. Apesar das perdas no *loop* de injeção, a recuperação foi de 83 a 103%. Além disso, a CCC apresentou uma capacidade de carga superior, reduzindo o tempo e os custos.

Muitas frações foram obtidas, enriquecidas em compostos que estavam em baixas concentrações no extrato original, permitindo seu futuro isolamento e identificação. Estas frações serão utilizadas em ensaios da atividade biológica futuramente. O CCC foi capaz de fracionar ambos os extratos hidrossolúveis e hidroetanólicos de matrizes vegetais complexas, produzindo frações enriquecidas.

CONCLUSÕES FINAIS:

A composição e concentração das substâncias em cada uma das espécies são diferentes, impossibilitando que estas sejam intercambiáveis para a produção de fármacos como é usualmente discutido. De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, as vias de ação em que cada espécie atua, está diretamente associada a sua composição. Todos os extratos apresentaram baixa citotoxicidade, 112,5 µg/mL, não apresentando prejuízos as linhagens celulares empregadas e promovendo até mesmo a proliferação destas células, indicando propriedades estimulantes de cicatrização. Não houve atividade antineoplásica para as linhagens empregadas. A atividade antioxidante está relacionada à concentração principalmente de ácidos cafeoilquínicos e compostos fenólicos presentes, com vias de proteção dependentes do tipo de extrato. Quando aplicado para atividade antimicrobiana, estes apresentaram capacidade de inibição em concentração de 5,0 mg/mL para a maioria das bactérias Gram positivas e Gram negativas.

O método de secagem em estufa apresentou extratos com composição mais próxima ao da folha fresca, possivelmente devido à inativação das enzimas e microorganismos responsáveis pela degradação, o que não ocorre quando submetido a secagem a sombra, possibilitando a degradação e mudança das vias metabólicas no tecido vegetal “ainda vivo”.

Apesar da matriz complexa presente nos quatro tipos de extratos submetidos à CCC, o método demonstrou excelente robustez e possibilidade de escalonamento para obtenção de frações enriquecidas, apresentando recuperação mínima de 83% do material empregado com frações altamente enriquecidas, mesmo para compostos em baixa concentração no extrato original, em um curto espaço de tempo quando comparado às técnicas tradicionalmente empregadas para este fim.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001/09/01 2001. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/jf001494m> >.

ALVES, C. F. et al. Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 8, p. 1097-1104, 2009. ISSN 2042-7158.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010001000033&nrm=iso >.

AMARAL, M. D. P. H. D. et al. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 607-611, 2009.

ANANDARAJAGOPAL, K. et al. In-vitro anti-inflammatory evaluation of crude Bombax ceiba extracts. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 1, p. 99, 2013. ISSN 2231-0894.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; DE OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2006. ISBN 8575413864.

ARES, G.; BARREIRO, C.; GÁMBARO, A. Evaluation of antioxidant extracts from Uruguayan native plants: importance of sensory characteristics Evaluación de extractos antioxidantes de plantas nativas uruguayas: importancia de las características sensoriales. **CyTA - Journal of Food**, v. 8, n. 3, p. 201-207, 2010/11/01 2010. ISSN 1947-6337. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/19476330903353536> >.

BHASKAR, V.; MOHITE, P. Design, synthesis, characterization and biological evaluation of some novel 1, 5 disubstituted tetrazole as potential anti-inflammatory agents. **J Opt Adv M**, v. 2, p. 231-237, 2010.

BRANDÃO, M. G. L.; FREIRE, N.; VIANNA-SOARES, C. D. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais. Verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila Surveillance of phytotherapeutic drugs in the State of Minas Gerais. Quality assessment of commercial. **Cad. Saúde Pública**, v. 14, n. 3, p. 613-616, 1998.

BRASIL. **Resolução, RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. ANVISA. Brasília – DF: Diário Oficial da União, 2003.

BRASIL, M. D. S. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. SAÚDE, M. D. Brasília, DF: MS: 156 p. 2012.

BRASIL., M. D. S. **Instrução Normativa Nº 5, de 11 de dezembro de 2008. Determina Determina a publicação da "Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado"**. SAÚDE, M. D. Brasília, DF: MS: Diário Oficial da União 2008.

CABRAL, I. S. R. et al. Phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of Brazilian red propolis. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009. ISSN 0100-4042.

CHOPADE, A. R.; SOMADE, P. M.; SAYYAD, F. J. Membrane stabilizing activity & protein denaturation a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Phyllanthus amarus*. **JKIMSU**, v. 1, p. 67-72, 2012.

COLLAÇO, R. D. C. O. et al. Protection by *Mikania laevigata* (guaco) extract against the toxicity of *Philodryas olfersii* snake venom. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 614-622, 2012. ISSN 0041-0101.

COMINO, C. et al. The isolation and mapping of a novel hydroxycinnamoyltransferase in the globe artichoke chlorogenic acid pathway. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 30, March 18 2009. ISSN 1471-2229. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-30> >.

COSTA, L. D. B. et al. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 04, p. 956-959, 2005.

COUTINHO, M. A.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009. ISSN 1984-6835.

CZELUSNIAK, K. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

CZELUSNIAK, K. E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 400-409, 2012. ISSN 1516-0572. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000200022&nrm=iso >.

DANINO, O. et al. Antioxidant activity of 1, 3-dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1273-1280, 2009. ISSN 0963-9969.

DEVASAGAYAM, T. P. A. et al. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. **Journal of Association of Physicians of India**, v. 52, n. OCT, p. 794-804, 2004. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-19444387198&partnerID=40&md5=84956fee9ebc50365c4bf42f7fbf739a> >.

DIAS DA SILVA, R. Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil. **Editoria Nacional. Sao Paulo, Brasil**, 1926.

DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H.; VOLLMAR, A. M. The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts? **Planta medica**, v. 64, n. 5, p. 423-426, 1998. ISSN 0032-0943.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The plant cell**, v. 7, n. 7, p. 1085, 1995.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

FERRARI, F. C. **Estudo fitoquímico da fração acetato de etila, avaliação da atividade antiinflamatória in vitro e in vivo da toxicidade em camundongos de *Lychnophora trichocarpa spreng***. 2008. 140f. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG.

FERREIRA, F. P. **Análises químicas qualitativas e quantitativas de duas espécies de *Mikania: Mikania glomerata Sprengel* e *Mikania laevigata Schultz Bip***. 2008. 192f. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP.

FOLEY, G. E. et al. Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. **Cancer**, v. 18, n. 4, p. 522-529, 1965. ISSN 1097-0142.

FRIESEN, J. B.; PAULI, G. F. Rational development of solvent system families in counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1151, n. 1, p. 51-59, 2007/06/01/ 2007. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967307001586> >.

GALLAGHER, R. et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 54, n. 3, p. 713-733, 1979. ISSN 0006-4971.

GARRARD, I. J. Simple Approach to the Development of a CCC Solvent Selection Protocol Suitable for Automation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 12-13, p. 1923-1935, 2005/07/01 2005. ISSN 1082-6076. Disponível em: < <https://doi.org/10.1081/JLC-200063571> >.

GASPARETTO, J. C. et al. Development and validation of two methods based on high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining 1, 2-benzopyrone, dihydrocoumarin, o-coumaric acid, syringaldehyde and kaurenoic acid in guaco extracts and pharmaceutical preparations. **Journal of separation science**, v. 34, n. 7, p. 740-748, 2011. ISSN 1615-9314.

GENOV, I. R.; SOLÉ, D. Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e asma: metanálise é a saída? **Rev. bras. alergologia imunopatol**, v. 30, n. 1, p. 2-8, 2007. ISSN 0103-2259.

GROVE, D.; RANDALL, W. Assay methods antibiotic activity: a laboratory manual. **New York, Medical Encyclopedia**, 1955.

HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free radical research**, v. 25, n. 1, p. 57-74, 1996. ISSN 1071-5762.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008/08/01/ 2008. ISSN 0944-7113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711308001104> >.

HSU, C.-L. et al. Inhibitory effects of new varieties of bitter melon on lipopolysaccharide-stimulated inflammatory response in RAW 264.7 cells. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1829-1837, 2013. ISSN 1756-4646.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005. ISSN 0021-8561.

HUANG, X.-Y. et al. An overview of recent progress in elution mode of counter current chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 214-225, 2016/03/01/2016. ISSN 0165-9936. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993615002654>>.

HURWITZ, R. et al. Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. **International Journal of Cancer**, v. 23, n. 2, p. 174-180, 1979. ISSN 1097-0215.

ISO. **10993-5: Biological evaluation of medical devices. Tests for in vitro cytotoxicity.** INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. Geneve 1999.

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, n. 2, p. 145-168, 2005/02/18/ 2005. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967304023374>>.

KEAY, D.; WOOD, P. Reintroducing countercurrent chromatography to the chemist. **American Laboratory**, v. 40, n. 19, p. 15-19, 2008. Disponível em: <
<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-63849319175&partnerID=40&md5=7a3ab97bb00aacc919511c8c0773fcc0>>.

KLEIN, G. et al. An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. **Intervirology**, v. 5, n. 6, p. 319-334, 1975. ISSN 1423-0100.

KOSTANIAN, A. E. et al. Countercurrent chromatographic separation: a hydrodynamic approach developed for extraction columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, n. 1, p. 63-72, 2004. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967304005254>>.

KUMAR, D. et al. Investigation of chemical composition and in vitro anti-inflammatory activity of *Stachys tibetica* oil by GC-MS and HRBC membrane stabilization. **Chemistry of Natural Compounds**, p. 1-3, 2012. ISSN 0009-3130.

KUMAR, M. et al. Antioxidant flavonoid glycosides from *Evolvulus alsinoides*. **Fitoterapia**, v. 81, n. 4, p. 234-242, 2010/06/01/ 2010. ISSN 0367-326X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X09002172> >.

LANOTTE, M. et al. NB4, a maturation inducible cell line with t (15; 17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). **Blood**, v. 77, n. 5, p. 1080-1086, 1991. ISSN 0006-4971.

LAUGHLIN, J. Post-harvest Drying Treatment Effects on Antimalarial Constituents of *Artemisia annua* L. International Conference on Medicinal and Aromatic Plants. Possibilities and Limitations of Medicinal and Aromatic Plant 576, 2001. p.315-320.

LIMA, N. P. et al. Produção de mudas por estaquia de duas espécies de guaco. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 106-109, 2003.

LOZZIO, C. B.; LOZZIO, B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. **Blood**, v. 45, n. 3, p. 321-334, 1975. ISSN 0006-4971.

MAHESH, R. et al. In Vitro Antioxidant Capacity and Neuronal Cell Toxicity of Roots of *Ostericum koreanum* Maximowicz. **E-Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2011/183172> >.

MAIORANO, V. A. et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 364-370, 2005. ISSN 0378-8741.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1, p. 181-194, 2006/04/21/ 2006. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967305019370> >.

MARTIN, P.; PAPAYANNOPOULOU, T. HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. **Science**, v. 216, n. 4551, p. 1233-1235, 1982. ISSN 0036-8075.

MARTINAZZO, A. P. et al. Avaliação do óleo essencial folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf após o processo de secagem. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, n. 5, 2013. ISSN 0717-7917.

MATSUO, Y.; DREXLER, H. G. Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines. **Leukemia research**, v. 22, n. 7, p. 567-579, 1998. ISSN 0145-2126.

MELO, E. D. C.; RADÜNZ, L.; MELO, R. D. A. Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais—Revisão. **Engenharia na Agricultura**, v. 12, n. 4, p. 307-315, 2004.

MELO, L. V. **Avaliação da estabilidade de extratos hidroalcoólicos de *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata* por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas**. 2013. 90f. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

MELO, L. V. D.; SAWAYA, A. C. UHPLC–MS quantification of coumarin and chlorogenic acid in extracts of the medicinal plants known as guaco (*Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 105-110, 2015. ISSN 0102-695X.

MIZUSHIMA, Y.; KOBAYASHI, M. Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 169-173, 1968. ISSN 2042-7158.

MORS, W. B. et al. Plant natural products active against snake bite—the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627-642, 2000. ISSN 0031-9422.

NAUMOVSKI, L. et al. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cell lines without classical breakpoint cluster region rearrangement. **Cancer research**, v. 48, n. 10, p. 2876-2879, 1988. ISSN 0008-5472.

OGASAWARA, G. A. **Variabilidade de diterpenos e estresse hídrico em *Coffea* spp.** 2015. 62f. Dissertação de Mestrado Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas-SP.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent

probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001. ISSN 0021-8561.

PAL, D. **Comparative Analysis of in vitro Antioxidant Activity of Two Selected Plants With a Reference to Antidiabetic Profile**. 2013. 2165-2169.

PINHO, G. P. et al. Matrix effect in pesticide quantification by gas chromatography. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009. ISSN 0100-4042.

PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003. ISSN 0021-8561.

PUGLIA, C. et al. Protective effect of Mediterranean fish oil extracts on heat-induced denaturation of albumin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 10, p. 1411-1413, 2006. ISSN 2042-7158.

RADÜNZ, L. L. **Secagem de alecrim pimenta, guaco e hortelã comum sobre diferentes temperaturas e sua influência na quantidade e qualidade dos princípios ativos**. 2004. 100f. Tese de Doutorado Programa de PósGraduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

REHDER, V. et al. Teor de cumarina em *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker em função do cultivo, colheita e secagem. **Anais do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, p. 107, 1998.

SAKAT, S.; JUVEKAR, A. R.; GAMBHIRE, M. N. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 2, n. 1, p. 146-155, 2010.

SANTOLI, D.; ROVERA, G.; CESANO, A. **Cytotoxic T-ALL cell lines and uses therefor**: Google Patents 1993.

SANTOS, S. C. D. et al. LC characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. **Planta medica**, v. 72, n. 8, p. 679-684, 2006. ISSN 0032-0943.

SILVA, A. M. D. O. **Efeito dos compostos fenólicos do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L) na inflamação aguda e sobre os marcadores de estresse oxidativo de ratos diabéticos.** 2012. 151f. Tese de Doutorado Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

SILVA, M. E. D. **Avaliação da atividade antiviral do extrato de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco).** 2015. 69f. Dissertação de Mestrado Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora-MG.

SILVA, M. G. D. **Secagem de folhas de guaco (*Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker) com adição de etanol: efeito sobre o teor de cumarina.** 2014. 105f. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

SKUTNIK, E. et al. Effect of growth regulators on postharvest characteristics of *Zantedeschia aethiopica*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 21, n. 2, p. 241-246, 2001. ISSN 0925-5214.

SOUZA, S. M. D. **Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados.** 2005. 94f. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.

STONG, R. C. et al. Human acute leukemia cell line with the t (4; 11) chromosomal rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics. **Blood**, v. 65, n. 1, p. 21-31, 1985. ISSN 0006-4971.

STUANI FLORIANO, R. et al. Effect of *Mikania glomerata* (Asteraceae) leaf extract combined with anti-venom serum on experimental *Crotalus durissus* (Squamata: Viperidae) envenomation in rats. **Revista de biología tropical**, v. 57, n. 4, p. 929-937, 2009. ISSN 0034-7744.

SUYENAGA, E. et al. Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 6, p. 519-523, 2002. ISSN 1099-1573.

TRINDADE, J. L. F. D. **Obtenção de giberelinas pela fermentação do esteviosídeo e do 7B-Hidroxiesteviol por Biotransformação.** 2012. 82f. Tese de Doutorado Programa de Pós Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

VIEIRA, L. C. C. **Síntese de uma coleção de cumarinas, possíveis inibidores da enzima acetilcolinesterase**. 2010. 161f. Dissertação de Mestrado Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

WEISS, A.; STOBO, J. Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line. **The Journal of experimental medicine**, v. 160, n. 5, p. 1284-1299, 1984. ISSN 0022-1007.

WILLIAMS, L. et al. The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. **West Indian Medical Journal**, v. 57, n. 4, p. 327-331, 2008. ISSN 0043-3144.

YEN, W.-J. et al. Antioxidant properties of roasted coffee residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2658-2663, 2005. ISSN 0021-8561.

ZHANG, M. et al. Development of a strategy and process parameters for a green process in counter-current chromatography: Purification of tanshinone IIA and cryptotanshinone from *Salvia miltiorrhiza* Bunge as a case study. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 36, p. 6031-6037, 2011. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967311000252> >.

ZHANG, M. et al. Cost-efficient and process-efficient separation of geniposide from *Gardenia jasminoides* Ellis by high-performance counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 89, p. 193-198, 2012. ISSN 1383-5866. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612000536> >.

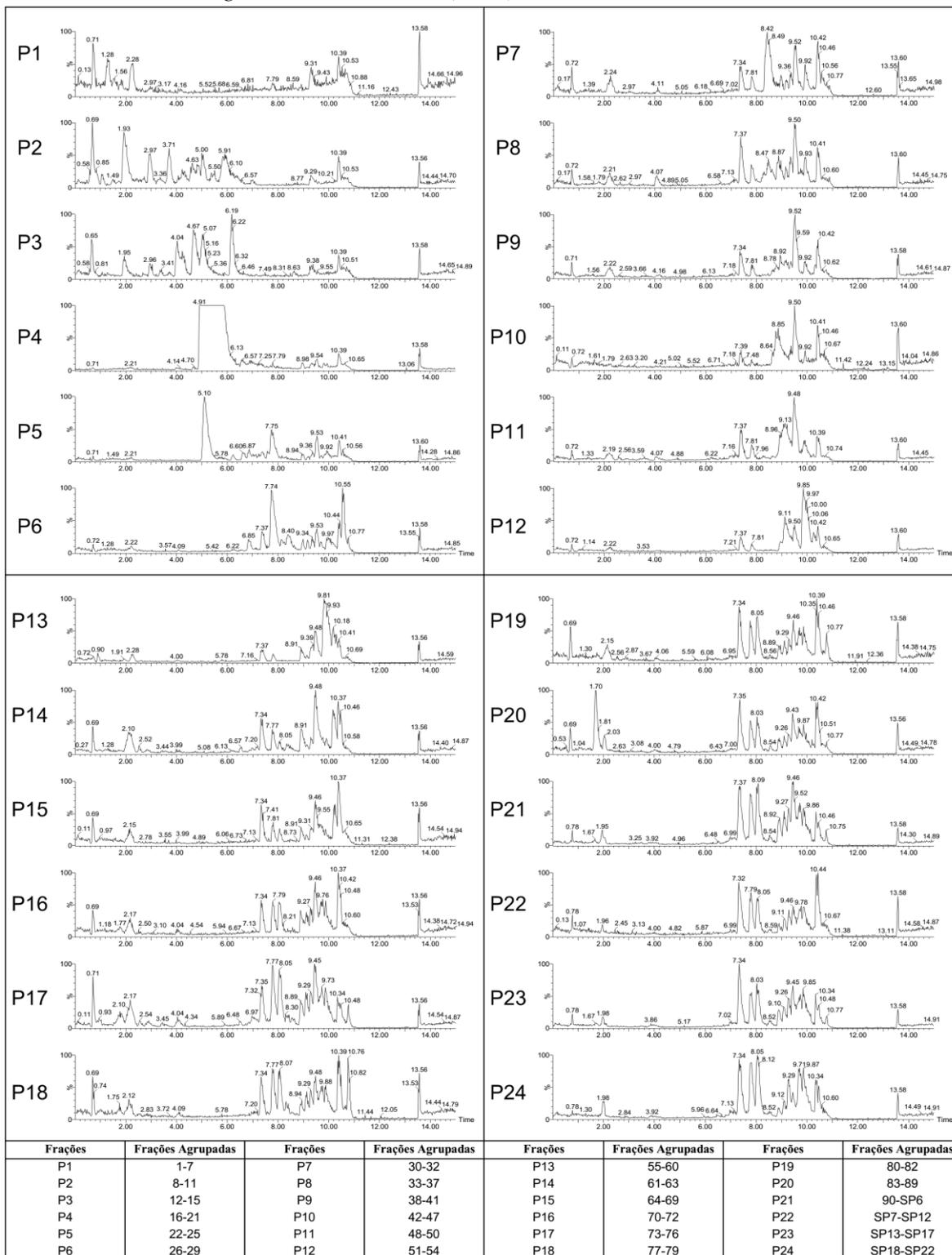
ZHOU, H. Y. et al. Anti-inflammatory activity of 21 (α , β)-methylmelianodiols, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **European journal of pharmacology**, v. 572, n. 2, p. 239-248, 2007. ISSN 0014-2999.

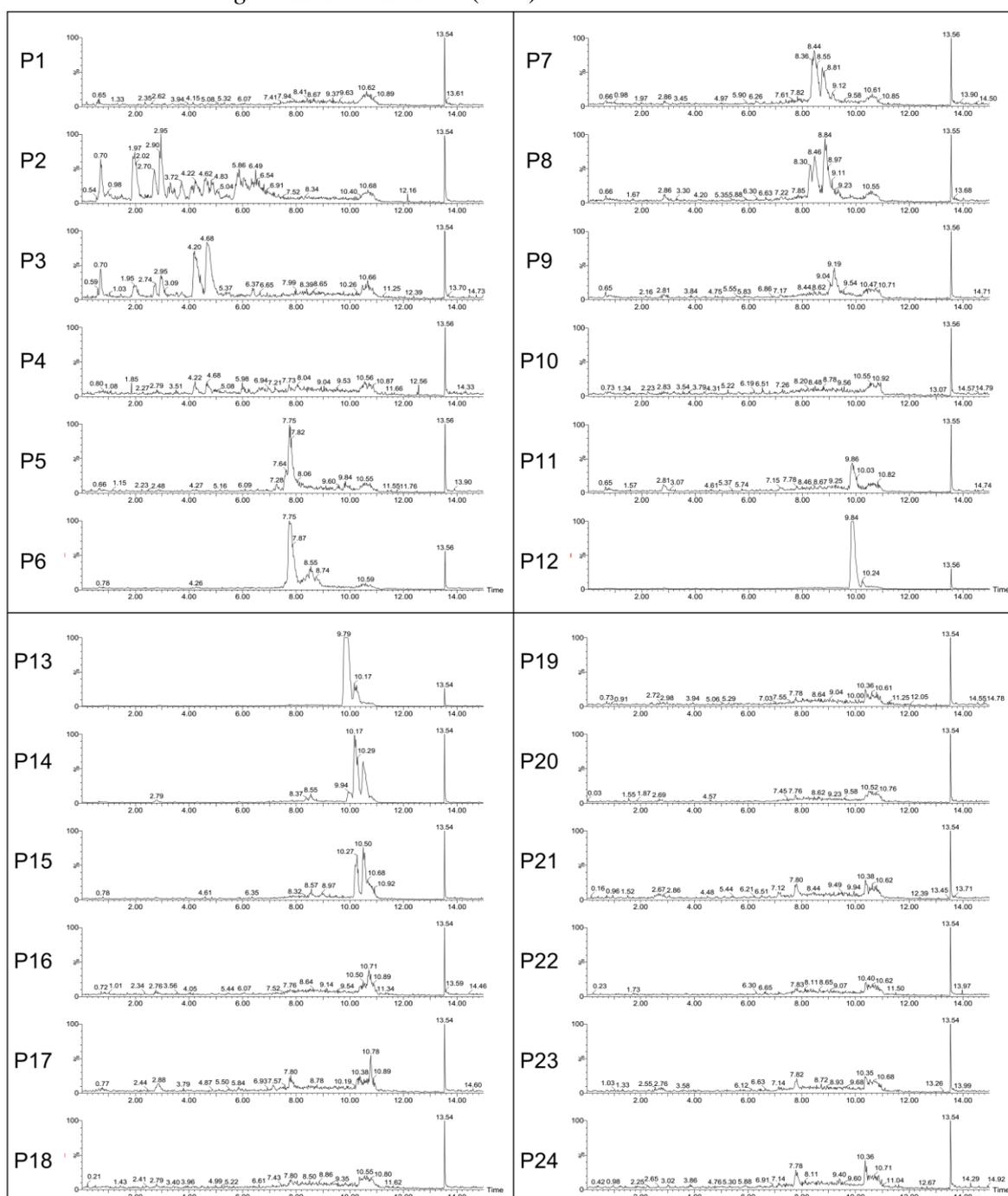
APÊNDICE:

Apêndice 1: UHPLC-MS frações agrupadas de extratos hidroetanólicos.

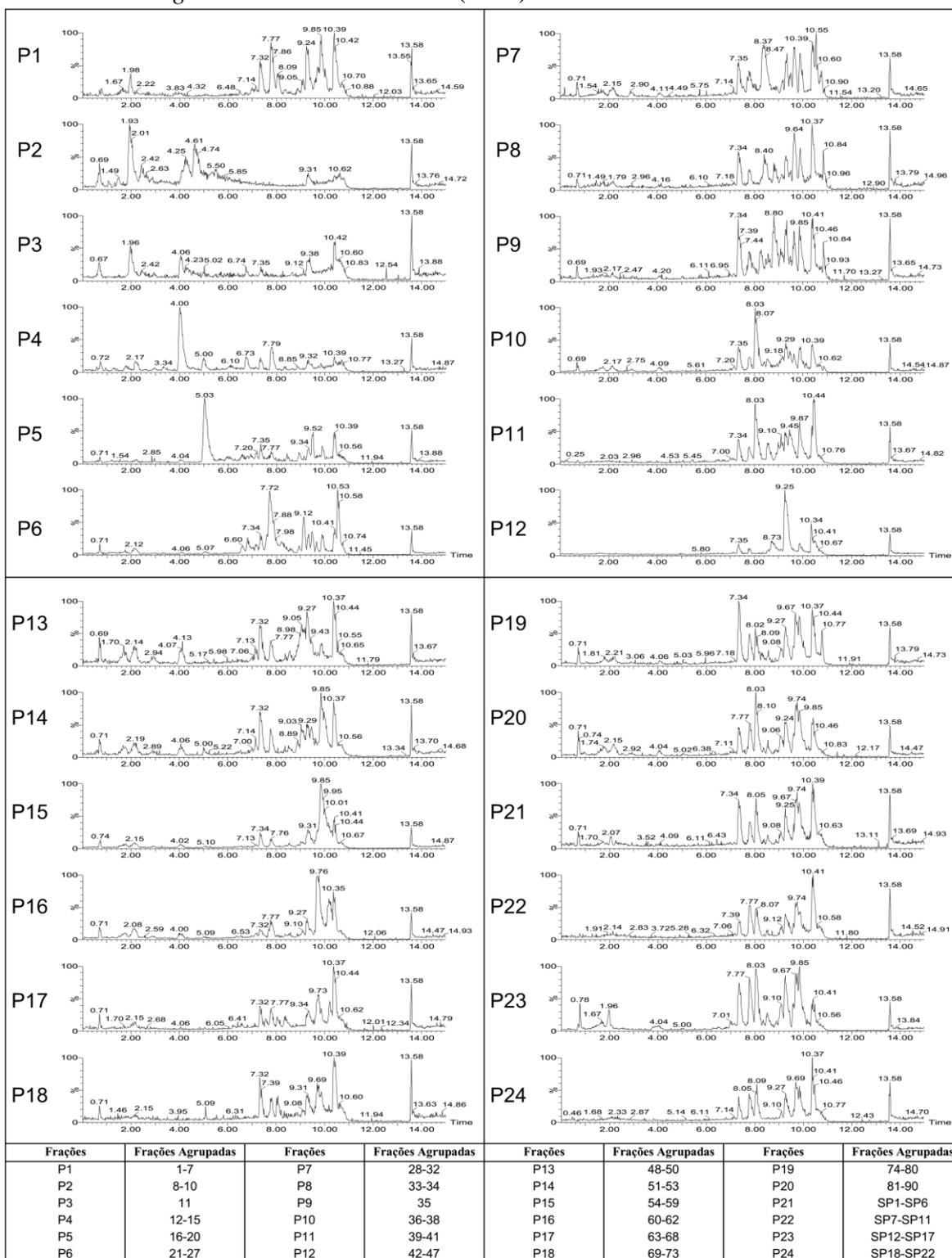
(MIDI, 912 mL, 4,0 mm diâmetro interno da coluna, 1250 rpm, 30 °C, Gradiente RP HEMWat 17A-27A em 120 min após passagem do solvente, fluxo 24mL/min, 8,0 g amostra em 40 mL LP-17A e 10 mL UP-17A, loop de 50 mL aquecido à 40°C).

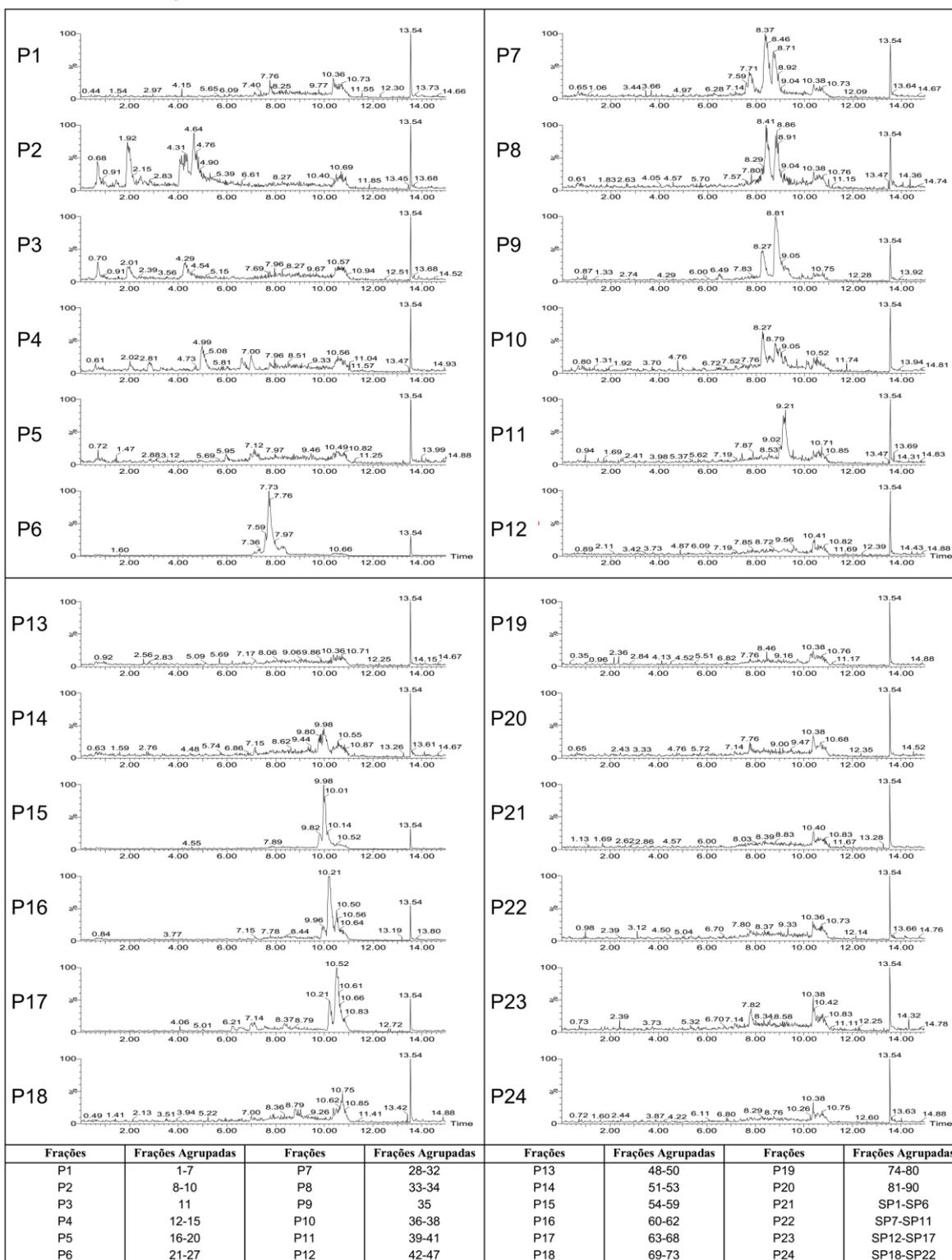
- *Mikania laevigata* hidroetanólicos (MS+)



- *Mikania laevigata* hidroetanólicos (MS-)

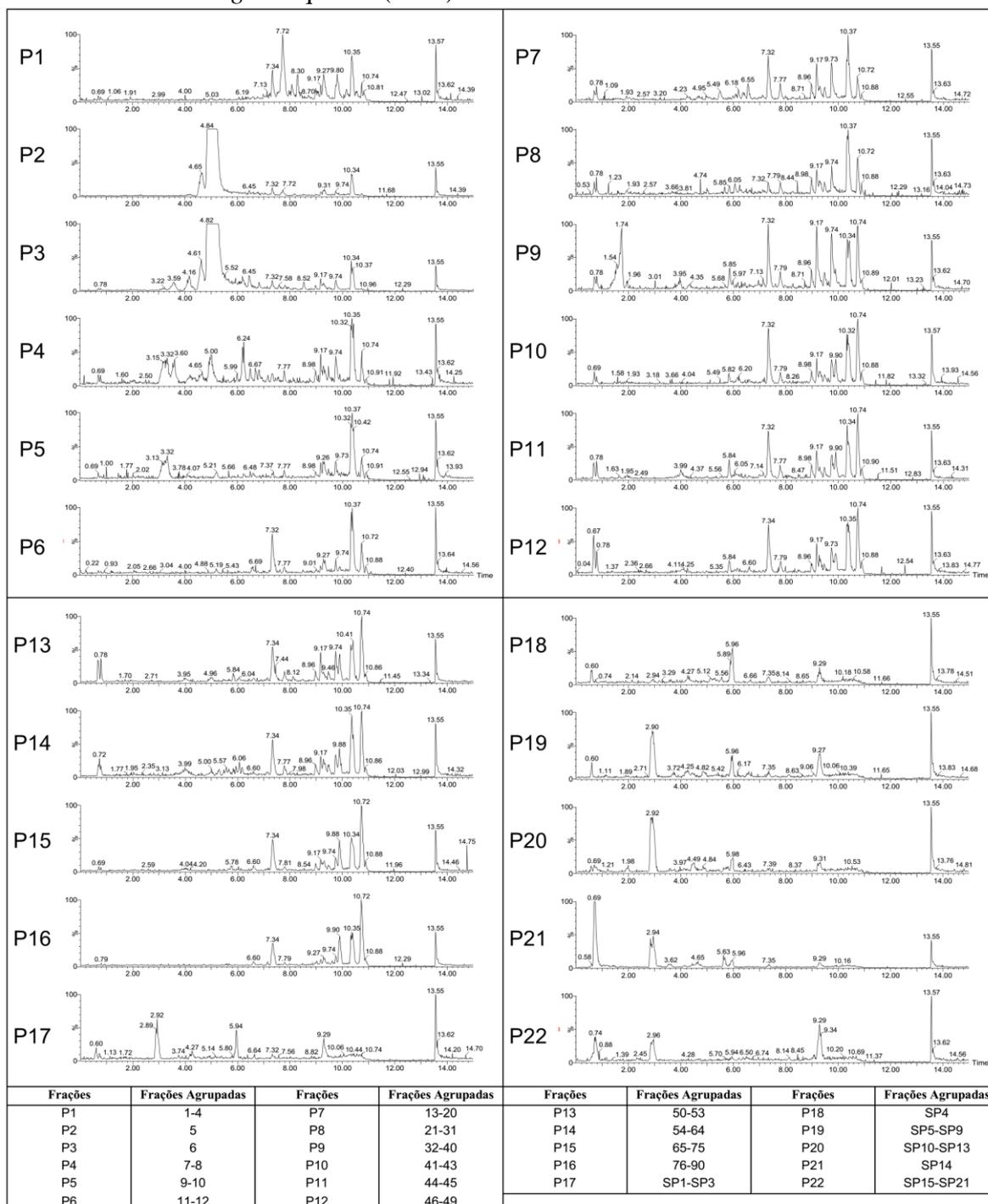
Frações	Frações Agrupadas						
P1	1-7	P7	30-32	P13	55-60	P19	80-82
P2	8-11	P8	33-37	P14	61-63	P20	83-89
P3	12-15	P9	38-41	P15	64-69	P21	90-SP6
P4	16-21	P10	42-47	P16	70-72	P22	SP7-SP12
P5	22-25	P11	48-50	P17	73-76	P23	SP13-SP17
P6	26-29	P12	51-54	P18	77-79	P24	SP18-SP22

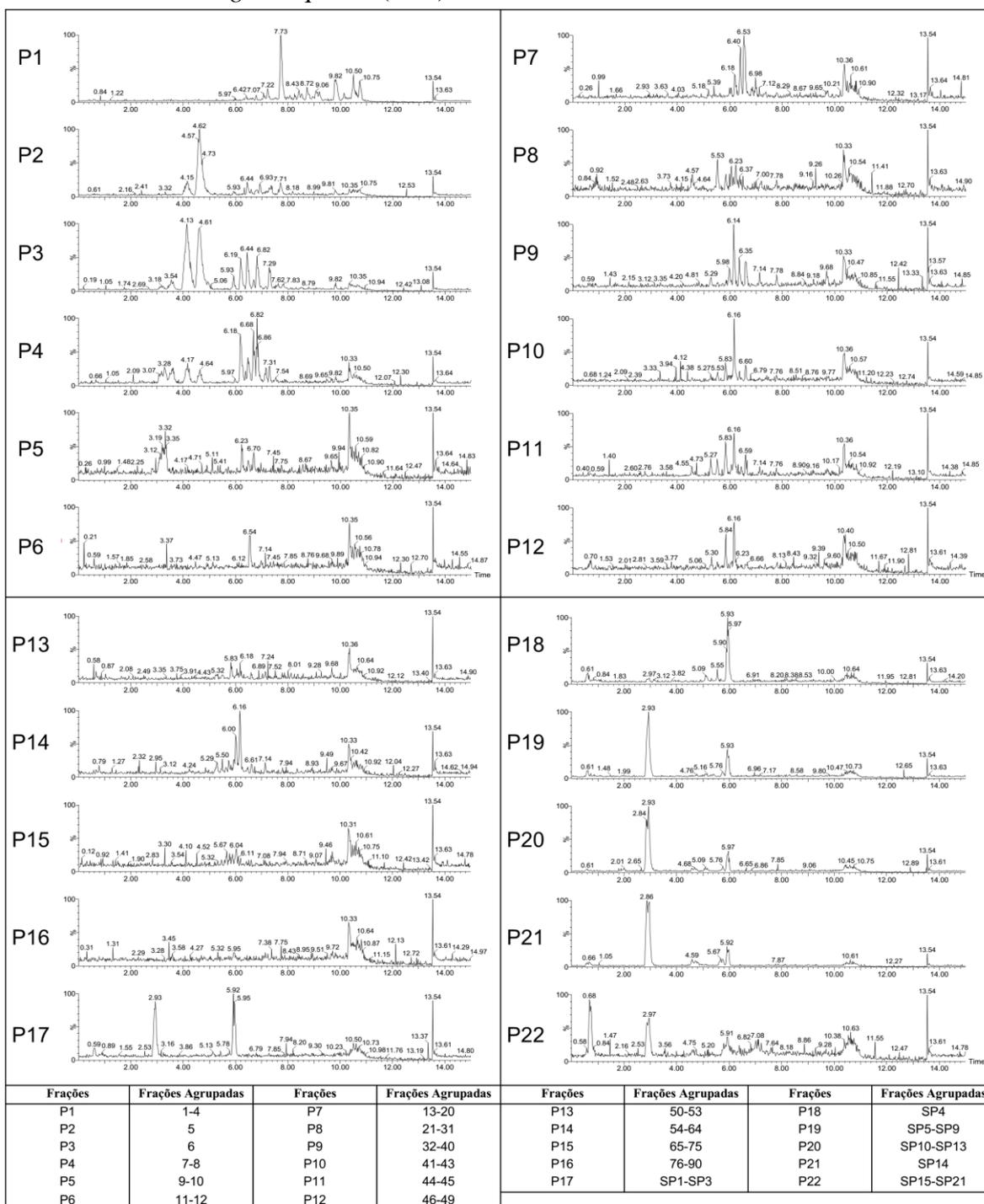
- *Mikania glomerata* hidroetanólicos (MS+)

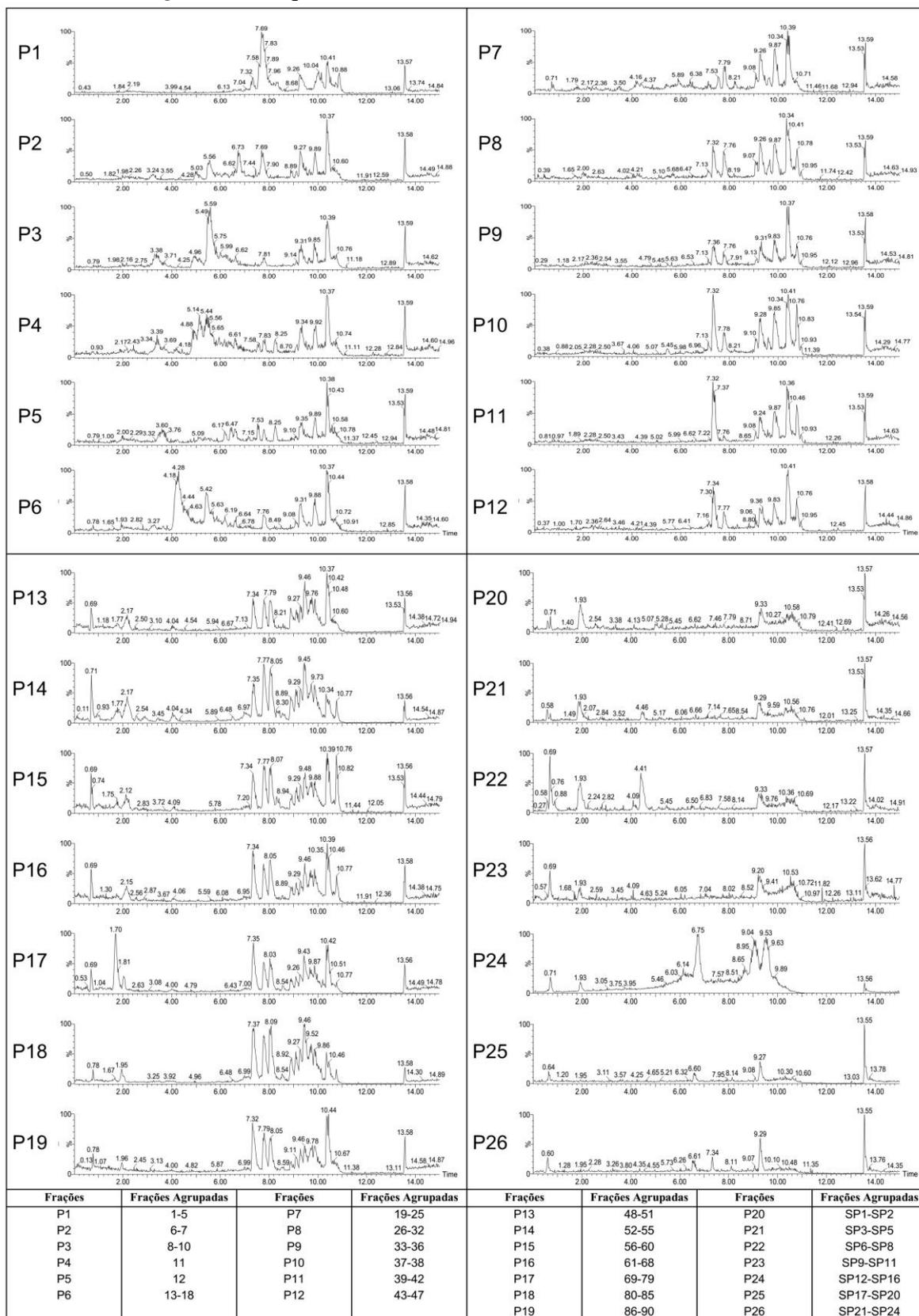
- *Mikania glomerata* hidroetanólicos (MS-)

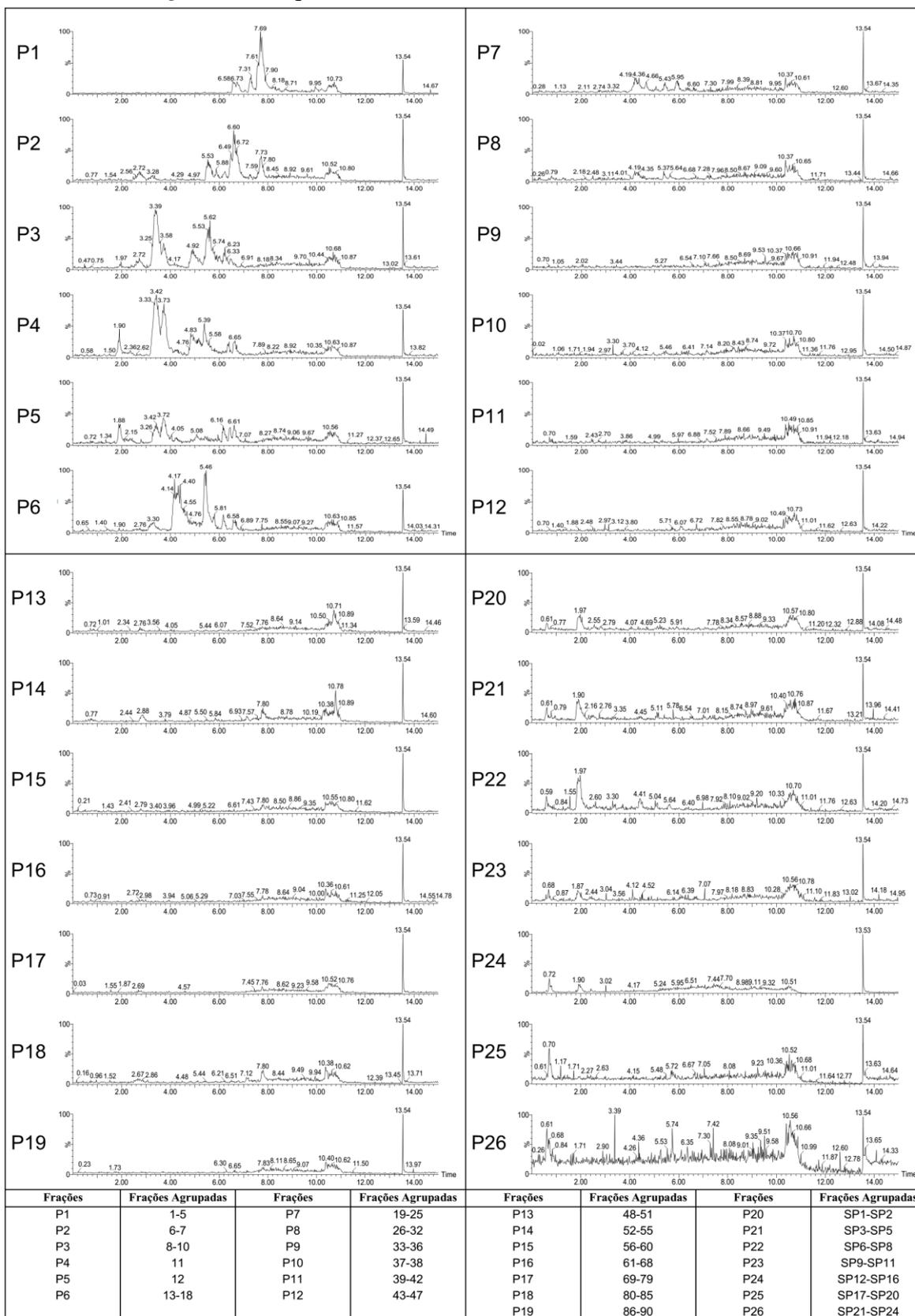
Apêndice 2: UHPLC-MS frações agrupadas de extratos aquosos.
 (MIDI, 912 mL, 4,0 mm diâmetro interno da coluna, 1250 rpm, 30 °C, Gradiente NP HEMWat 11A-7A em 120 min após passagem do solvente, fluxo 24mL/min, 4,0 g amostra em 80 mL LP-11A, loop de 100 mL aquecido à 40°C).

- *Mikania laevigata* aquosos (MS+)



- *Mikania laevigata* aquosos (MS-)

- *Mikania glomerata* aquosos (MS+)

- *Mikania glomerata* aquosos (MS-)

Apêndice 4: Declaração de que o trabalho não versou sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a biossegurança

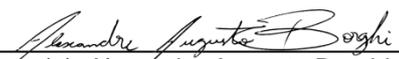


COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada ***“Influência do processo de secagem sobre o perfil químico dos extratos de Mikania laevigata e Mikania glomerata, caracterização química, fracionamento e avaliação das atividades biológicas dos extratos através de estudos in vitro”***, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Alexandre Augusto Borghi

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

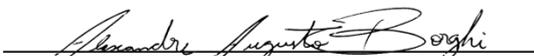
Data: 23 de Abril de 2019

Apêndice 5: Declaração de que a tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Influência do processo de secagem sobre o perfil químico dos extratos de Mikania laevigata e Mikania glomerata, caracterização química, fracionamento e avaliação das atividades biológicas dos extratos através de estudos in vitro**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 23 de Abril de 2019

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Alexandre Augusto Borghi**
RG n.º 33801884-0 SSP/SP

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya**
RG n.º 75308265 SSP/SP