

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA SANTANA FERREIRA SMOLAREK

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO, TOXICOLÓGICO E DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE VEGETAL *Solidago microglossa* DC (Compositae)**



CURITIBA

2011

FERNANDA SANTANA FERREIRA SMOLAREK

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO, TOXICOLÓGICO E DAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE VEGETAL *Solidago microglossa* DC
(Compositae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel
Co-orientador: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

**CURITIBA
2011**

Smolarek, Fernanda Santana Ferreira

Contribuição ao estudo fitoquímico, toxicológico e das atividades biológicas da espécie vegetal *Solidago microglossa* DC (Compositae)
/ Fernanda Santana Ferreira Smolarek – Curitiba: UFPR, 2011.
140 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Dr. Obdúlio Gomes Miguel

Orientadora: Dra Marilis Dallarmi Miguel

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná

Referência bibliográfica: f. 133-140

1. *Solidago microglossa*. 2. Arnica do mato. 3. Quercitrina.
4. Atividade antioxidante. 5. Tirosinase. 6. Toxicidade. 7. CLAE I.
Miguel, Obdulio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.32

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a *Deus* por permitir esse acontecimento.

Aos meus filhos *Duda e João*, razões da minha existência e ao *Toninho*, meu marido, por seu amor, companheirismo e amizade.

Aos meus pais *Acir e Mariana*, meus exemplos de vida.

À *Universidade Federal do Paraná* e ao *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas* pela oportunidade.

Ao meu orientador *Dr. Obdúlio Gomes Miguel*, pelos ensinamentos, confiança, dedicação e paciência. À minha co-orientadora *Dra Marilis Dallarmi Miguel*, pelas palavras de incentivo, confiança e amizade.

A professora *Dra Patrícia Maria Stuelp Campelo*, por ter me acolhido em seu laboratório e pelos seus ensinamentos. A *Nicole, Cassiano* e a todos que colaboraram para que este projeto fosse concluído.

Ao amigo, professor e psicólogo *Dr. João Luiz Carvalho*, pelo incentivo e apoio e ao colega e amigo *João Gasparetto* pelas análises de espectrometria de massas e pelas incansáveis discussões.

Ao professor *Michel*, em especial a *Patrícia Mazureki*, pelas análises da tirosinase. As colegas *Cristiane Peitz, Cristiane Mayumi* pelas análises de RMN.

A Imcopa, em especial a *Paula Fernandes e Liceres Miranda* pela oportunidade e incentivo.

À *As Ervas Curam* por ter cedido o material vegetal, bem como possibilitado o meu crescimento profissional por todos esses anos. E aos meus amigos que lá estão pela ajuda e amizade.

Aos colegas do laboratório de Fitoquímica pela companhia e amizade. Em especial as amigas *Patrícia Nunes, Camila Mercali, Beatriz, Fernanda Colombi e Milena Kalegari* pelas conversas, desabafos e risadas.

Às minhas amigas *Caroline Prochaska, Fernanda Voos, Fernanda Gaensly, Consuelo Fortes, Nathalia Iensen, Ana Paula Licheski, Fernanda Bertoli, Daniela Bianchini*, pelas boas vibrações mesmo que muitas vezes à distância.

A toda minha família, em especial a minha segunda mãe *Izabel Cristina* e ao meu irmão *Guilherme* pelo amor e por fazerem parte da minha vida!

A todos os amigos que de alguma forma me ajudaram nessa minha conquista....

Muito Obrigada!

"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito.
Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser...
mas Graças a Deus, não somos o que éramos."
(Martin Luther King)

RESUMO

Solidago microglossa DC, conhecida popularmente como arnica do mato, é uma planta medicinal bastante utilizada na América do Sul graças às suas propriedades antiinflamatórias, analgésicas e cicatrizantes. Apesar do amplo uso, existem poucos relatos na literatura envolvendo sua composição química bem como estudos caracterizando suas atividades biológicas e toxicológicas. Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo atender a esses requisitos contribuindo para o controle de qualidade de um fitoterápico à base de arnica por meio do desenvolvimento de um método analítico por CLAE-DAD. Com base na caracterização fitoquímica desta espécie, isolou-se uma substância, a qual foi analisada por espectroscopia de absorção no ultravioleta, ressonância nuclear magnética de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas, sendo esta identificada como quercetina-3-ramnosídica (quercitrina). Este flavonóide possui propriedades antiinflamatórias comprovadas, fato este que pode justificar o uso popular deste extrato. Em virtude destas propriedades e da grande quantidade desta substância encontrada nos extratos medicinais, esta foi considerada o marcador fitoquímico desta espécie. Para sua quantificação um método rápido e sensível foi desenvolvido utilizando como fase estacionária uma coluna Zorbax Bonus RP (100 x 3,0 mm, 3,5 μm de partícula). A fase móvel consistiu em um gradiente linear entre acetonitrila (A) e solução a 0,5% de ácido fórmico (B) iniciando com 10% de A até 60% de A em 8 min. O fluxo foi de 1,3 mL min^{-1} e o volume de injeção de 10 μL . A temperatura do forno foi mantida em 35 $^{\circ}$ C e detecção realizada em 346 nm. Parâmetros de validação indicaram que o método é linear, preciso, exato e robusto dentro do intervalo compreendido entre 10 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os ensaios de atividades biológicas revelaram uma potente capacidade antioxidante do extrato bruto e das frações clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica por meio do método da redução do complexo do fosfomolibdênio e do radical DPPH. O extrato bruto exerceu ainda influência positiva sobre a atividade da enzima tirosinase, indicando uma possível utilização no tratamento de patologias pigmentares. Além dos efeitos benéficos, estudos de toxicidade revelaram que o extrato bruto é inativo frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. A baixa toxicidade foi também observada por meio de ensaios pré-clínicos envolvendo a ingestão do extrato em ratos Wistar. Neste caso, não foram evidenciadas alterações significativas nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, comprovando sua segurança no caso de exposição aguda ao fitoterápico.

Palavras-chaves: *Solidago microglossa*, arnica do mato, quercitrina, atividade antioxidante, tirosinase, toxicidade, CLAE.

ABSTRACT

Solidago microglossa DC, popularly known as arnica bush, is a medicinal plant widely used in South America because of its anti-inflammatory, analgesic and healing properties. Despite its widespread use, there are few studies about its chemical composition and the characterization of its biological and toxicological activities. In this context, the goal of this paper is to provide these requirements, and contribute to the quality control of a medicine based on arnica. This is possible by developing an analytical method by HPLC-DAD. Based on the phytochemical characterization of this species, a substance was isolated. It was analyzed by ultraviolet absorption spectroscopy, nuclear magnetic resonance of ^1H and ^{13}C NMR and mass spectrometry. It was identified as quercetin-3-rhamnosidic (quercitrin). This flavonoid has proven anti-inflammatory properties, a fact that may justify the popular use of its extract. Because of these properties and the large quantity of this substance found in medicinal extracts, this was considered the phytochemical marker of this species. To the quantification, a rapid and sensitive method was developed using as stationary phase Zorbax Bonus RP column (100 x 3.0 mm, 3.5 mm in particle). The mobile phase consisted of a linear gradient of acetonitrile (A) and a solution of 0.5% formic acid (B) starting with 10% A to 60% A in 8 min. The flow was 1.3 mL min⁻¹ and the injection volume was 10 μL . The oven temperature was maintained at 35 ° C and the detection was performed at 346 nm. Validation parameters indicated that the method is linear, precise and accurate within the range from 10 to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The biological activities test revealed a potent antioxidant capacity of the crude extract and chloroform, ethyl acetate and water-alcohol fractions, by the method of reducing the phosphomolybdenum complex and DPPH radical. The crude extract also demonstrated a positive influence on the activity of tyrosinase enzyme, indicating the possibility to use the extract in the treatment of pigmentary disorders. Besides the beneficial effects, toxicity studies revealed that the crude is inactive against brine shrimp. Low toxicity was also observed in pre-clinical trials involving the ingestion of the extract by rats. In this case, there were no significant changes in biochemical and hematological parameters, confirming its safety in cases of acute exposure to the herbal medicine.

Key words: *Solidago microglossa*, arnica bush, quercitrin, antioxidant, tyrosinase, toxicity, HPLC

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE VEGETAL <i>Solidago microglossa</i>	22
FIGURA 2	FOTO <i>Solidago microglossa</i> DC.....	23
FIGURA 3	QUERCITRINA.....	25
FIGURA 4	EXSICATA DE <i>Solidago microglossa</i> , ACERVO NO 308742.....	45
FIGURA 5	PARTES AÉREAS DE <i>Solidago microglossa</i>	46
FIGURA 6	APARELHO DE SOXHLET.....	53
FIGURA 7	SISTEMA DE PARTIÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO.....	55
FIGURA 8	REAÇÃO DO DPPH COM ESPÉCIES ANTIOXIDANTES.....	65
FIGURA 9	ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO DE ARNICA PELO MÉTODO DE GAVAGEM....	71
FIGURA 10	CROMATOGRAMA REFERENTE À CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DAS PARTES AÉREAS DA ESPÉCIE VEGETAL <i>Solidago microglossa</i>	77
FIGURA 11	ESPECTROS DAS SUBSTÂNCIAS DETECTADAS NO CROMATOGRAMA DA CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DAS PARTES AÉREAS DE <i>Solidago microglossa</i>	78
FIGURA 12	ESPECTROS DOS PICOS IDENTIFICADOS COMO 1 A 3 NO CROMATOGRAMA DA CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DAS PARTES AÉREAS DE <i>Solidago microglossa</i> CORRELACIONADOS COM O ESPECTRO PADRÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	79
FIGURA 13	ESPECTROS DOS PICOS IDENTIFICADOS COMO 4 A 6 NO CROMATOGRAMA DA CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DAS PARTES AÉREAS DE <i>Solidago microglossa</i> CORRELACIONADOS COM ESPECTROS PADRÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	80
FIGURA 14	ESTRUTURA QUÍMICA DOS FLAVONÓIDES.....	81
FIGURA 15	ESPECTRO DO PICO IDENTIFICADO COMO 7 NO CROMATOGRAMA DA CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DAS PARTES AÉREAS DE <i>Solidago microglossa</i> CORRELACIONADO COM O ESPECTRO PADRÃO DE QUERCITRINA.....	81
FIGURA 16	FINGERPRINT DA ESPÉCIE VEGETAL <i>Solidago microglossa</i>	82
FIGURA 17	FRAÇÃO CLOROFÓRMIO OBTIDA POR MEIO DA PARTIÇÃO SÓLIDO LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Solidago microglossa</i>	83
FIGURA 18	ESPECTRO DO PICO DE TR 19,78 MINUTOS DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO A QUAL FOI OBTIDA POR MEIO DA PARTIÇÃO SÓLIDO LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Solidago microglossa</i>	83
FIGURA 19	CORRELAÇÃO ESPECTRAL DO PICO DE TR 19,78 MINUTOS DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO COM O PADRÃO PRIMÁRIO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO (TR 16,32 MINUTOS).....	84
FIGURA 20	ESPECTRO DO PICO DE TR = 25,55 MINUTOS DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO A QUAL FOI OBTIDA POR MEIO DA PARTIÇÃO SÓLIDO LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Solidago microglossa</i>	84
FIGURA 21	CORRELAÇÃO ESPECTRAL DO PICO DE TR 25,7 MINUTOS DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO COM O PADRÃO PRIMÁRIO DE QUERCITRINA (TR 26,10 MINUTOS).....	85
FIGURA 22	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA OBTIDA POR MEIO DA PARTIÇÃO SÓLIDO LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Solidago microglossa</i>	85
FIGURA 23	FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA OBTIDA POR MEIO DA PARTIÇÃO SÓLIDO LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Solidago microglossa</i>	86

FIGURA 24	ESPECTROS DOS PICOS DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REFERENTES AOS PICOS DE DERIVADOS DE ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS E/OU SEUS DERIVADOS.....	86
FIGURA 25	FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA ÁCIDA OBTIDA POR MEIO DA PARTIÇÃO SÓLIDO LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Solidago microglossa</i>	87
FIGURA 26	COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR MEIO DA PARTIÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Solidago microglossa</i>	87
FIGURA 27	COMPOSTO ISOLADO A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	88
FIGURA 28	CROMATOGRAMA DO COMPOSTO ISOLADO A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	89
FIGURA 29	ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO ISOLADO A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	89
FIGURA 30	COMPARAÇÃO ESPECTRAL DO COMPOSTO ISOLADO COM O ESPECTRO DO PADRÃO DE QUERCITRINA.....	90
FIGURA 31	SOBREPOSIÇÃO DO CROMATOGRAMA DO COMPOSTO ISOLADO A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, SOB OS CROMATOGRAMAS DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. microglossa</i> E DO PADRÃO DE QUERCITRINA.....	90
FIGURA 32	ESPECTRO RMN ¹³ C DO COMPOSTO ISOLADO A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (CD ₃ OD 200 MHz).....	92
FIGURA 33	DEPT 135 ⁰ DO COMPOSTO ISOLADO (CD ₃ OD 200 MHz).....	92
FIGURA 34	ESPECTRO RMN H ¹ DO COMPOSTO ISOLADO A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (CD ₃ OD 200 MHz).....	93
FIGURA 35	ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCITRINA.....	93
FIGURA 36	ESPECTRO DE MASSAS DO PADRÃO DE QUERCITRINA (FULL SCAN) UTILIZANDO ESI NO MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO.....	96
FIGURA 37	ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO ISOLADO (FULL SCAN) UTILIZANDO ESI NO MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO.....	96
FIGURA 38	PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO PADRÃO DE QUERCITRINA (<i>m/z</i> 447,1) NO MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO.....	97
FIGURA 39	PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DA SUBSTÂNCIA ISOLADA (<i>m/z</i> 447,1) NO MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO.....	97
FIGURA 40	MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DOS FLAVONÓIDES POR ESI-MS MODO NEGATIVO PROPOSTO POR TIBERTE E COLABORADORES (2007).....	98
FIGURA 41	CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DE <i>Solidago microglossa</i> UTILIZADO PARA AVALIAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DO MÉTODO.....	99
FIGURA 42	COMPARAÇÃO ESPECTRAL ENTRE O PICO DE QUERCITRINA NO EXTRATO BRUTO DE ARNICA DO MATO E O PADRÃO PRIMÁRIO DE QUERCITRINA.....	100
FIGURA 43	VERIFICAÇÃO DA PUREZA DO PICO DE QUERCITRINA NO EXTRATO BRUTO DE ARNICA DO MATO PELO SOFTWARE CHEMSTATION	101
FIGURA 44	CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS NO ENSAIO DE SELETIVIDADE PELO MÉTODO DE ADIÇÃO DO PADRÃO PARA AS AMOSTRAS DE EXTRATO BRUTO FORTIFICADO E PADRÃO DE QUERCITRINA.....	102
FIGURA 45	GRÁFICO DE RESÍDUOS DA CURVA DE LINEARIDADE DA QUERCITRINA.....	104
FIGURA 46	CURVA DE LINEARIDADE DA QUERCITRINA.....	105

FIGURA 47	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>S. microglossa</i> POR MEIO DO MÉTODO DO COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO.....	111
FIGURA 48	ATIVIDADE DA ENZIMA TIROSINASE FRENTE AO EXTRATO BRUTO DE <i>Solidago microglossa</i>	113
FIGURA 49	ACOMPANHAMENTO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. microglossa</i> SOBRE O CONSUMO DE RAÇÃO EM RATOS MACHOS DURANTE OS 14 DIAS DE OBSERVAÇÃO.....	116
FIGURA 50	ACOMPANHAMENTO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. microglossa</i> SOBRE O CONSUMO DE ÁGUA EM RATOS MACHOS DURANTE OS 14 DIAS DE OBSERVAÇÃO.....	117
FIGURA 51	ACOMPANHAMENTO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. microglossa</i> SOBRE O CONSUMO DE RAÇÃO EM RATOS FÊMEAS DURANTE OS 14 DIAS DE OBSERVAÇÃO.....	118
FIGURA 52	ACOMPANHAMENTO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. microglossa</i> SOBRE O CONSUMO DE ÁGUA EM RATOS FÊMEAS DURANTE OS 14 DIAS DE OBSERVAÇÃO.....	118
FIGURA 53	NÍVEIS SANGUÍNEOS DE LEUCÓCITOS ($10^3/\text{MM}^3$) EM RATOS MACHOS TRATADOS COM DIFERENTES DOSES DO EXTRATO DE ARNICA.....	121
FIGURA 54	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. microglossa</i> EM RATOS MACHOS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA ENZIMA ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST).....	123
FIGURA 55	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. microglossa</i> EM RATOS FÊMEAS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA ENZIMA ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST).....	124
FIGURA 56	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. microglossa</i> EM RATOS FÊMEAS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA ENZIMA ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT).....	124
FIGURA 57	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. microglossa</i> EM RATOS FÊMEAS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA ENZIMA ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT).....	124
FIGURA 58	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO DE <i>S. microglossa</i> EM RATOS MACHOS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA (FA).....	125
FIGURA 59	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO DE <i>S. microglossa</i> EM RATOS FÊMEAS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA (FA).....	125
FIGURA 60	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO DE <i>S. microglossa</i> EM RATOS FÊMEAS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA URÉIA.....	127
FIGURA 61	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. microglossa</i> EM RATOS FÊMEAS SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE COLESTEROL PLASMÁTICO.....	129

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE <i>Solidago microglossa</i>	21
QUADRO 2	CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA SEGUNDO TESTE DE DOSE FIXA.....	38
QUADRO 3	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DO FINGERPRINT DA ESPÉCIE VEGETAL <i>S. microglossa</i>	56
TABELA 1	ESQUEMA DE DILUIÇÃO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE QUERCITRINA PARA O ENSAIO DE LINEARIDADE.....	62
TABELA 2	PREPARO DAS AMOSTRAS DO EXTRATO BRUTO DE ARNICA PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO.....	63
TABELA 3	RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS COM A MATÉRIA-PRIMA.....	74
TABELA 4	RESULTADOS DA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DA PLANTA <i>S. microglossa</i>	74
TABELA 5	DADOS REFERENTES A OBTENÇÃO E AS ANÁLISES DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. microglossa</i> OBTIDO POR EXTRAÇÃO EM SOXHLET COM ETANOL 77°GL.....	75
TABELA 6	PARTIÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO.....	76
TABELA 7	COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) DE RMN – ¹³ C E ¹ H OBTIDOS PARA O COMPOSTO ISOLADO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA COM DADOS DA LITERATURA PARA O COMPOSTO QUERCITRINA.....	94
TABELA 8	PARÂMETROS AVALIADOS PARA VERIFICAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE QUERCITRINA.....	99
TABELA 9	ÁREAS OBTIDAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA SOLUÇÕES DA AMOSTRA DE EXTRATO BRUTO DE ARNICA FORTIFICADA E PARA AS SOLUÇÕES PADRÕES.....	102
TABELA 10	COMPARAÇÃO DOS COEFICIENTES ANGULARES OBTIDOS A PARTIR DE CURVAS ANALÍTICAS DE SOLUÇÃO PADRÃO DE QUERCITRINA E DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. microglossa</i> FORTIFICADO PARA AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE.....	103
TABELA 11	MÉDIA DAS ÁREAS DOS PICOS DE QUERCITRINA REFERENTES À CURVA DE LINEARIDADE.....	104
TABELA 12	ANÁLISE POR REGRESSÃO LINEAR DA CURVA DE LINEARIDADE DA QUERCITRINA.....	105
TABELA 13	RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE DO ANALISTA 01.....	107
TABELA 14	RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	107
TABELA 15	CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES TEÓRICAS NO ENSAIO DE EXATIDÃO.....	108
TABELA 16	RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EXATIDÃO.....	108
TABELA 17	RESULTADOS OBTIDOS MODIFICAÇÕES REALIZADAS NO ENSAIO DE ROBUSTEZ.....	109
TABELA 18	TEOR DE QUERCITRINA NAS AMOSTRAS.....	110
TABELA 20	TEOR DE QUERCITRINA NAS FRAÇÕES.....	110
TABELA 21	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO RADICAL DE DPPH.....	112
TABELA 22	MORTALIDADE DE <i>Artemia salina</i> E ESTIMATIVA DE LC50 APÓS A EXPOSIÇÃO AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>S. microglossa</i>	115

TABELA 23	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE <i>Solidago microglossa</i> EM RATOS MACHOS SOBRE OS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS APÓS 14 DIAS.....	117
TABELA 24	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE <i>Solidago microglossa</i> EM RATOS FÊMEAS SOBRE OS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS.....	119
TABELA 25	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE <i>Solidago microglossa</i> EM RATOS MACHOS SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	120
TABELA 26	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE <i>Solidago microglossa</i> EM RATOS MACHOS SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS (Continuação).....	120
TABELA 27	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE <i>Solidago microglossa</i> EM RATOS FÊMEAS SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	122
TABELA 28	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE <i>Solidago microglossa</i> EM RATOS FÊMEAS SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS (Continuação).....	122
TABELA 29	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE <i>Solidago microglossa</i> EM RATOS MACHOS E FÊMEAS SOBRE A FUNÇÃO RENAL.....	127
TABELA 30	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE <i>Solidago microglossa</i> EM RATOS MACHOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	128
TABELA 31	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE <i>Solidago microglossa</i> EM RATOS FÊMEAS SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALT	- Alanina aminotransferase
ANOVA	- Análise de variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	- <i>Atmopheric pressure chemical ionization</i>
AST	- Aspartato aminotransferase
CAD	- <i>Collision gas</i>
CE	- <i>Collision energy</i>
CEP	- <i>Collision cell entrance potencial</i>
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	- Cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodos
CUR	- <i>Curtain gas</i>
CV	- Coeficiente de variação
CXP	- <i>Cell exit potencial</i>
DAD	- Detector de arranjo de diodos
DP	- Desvio Padrão
DP*	- <i>Declustering Potencial</i>
DPR	- Desvio Padrão Relativo
EM	- Espectrômetro de massa
EP	- <i>Entrance potencial</i>
ESI	- <i>Electrospray</i>
FA	- Fosfatase alcalina
FIA	- Análise por injeção em fluxo
FDA	- Food and Drug Administration
GS1	- <i>Nebulizer gas</i>
GS2	- <i>Turbo gas</i>
HCT	- Hematócrito
HDL	- Lipoproteínas de alta densidade
HGB	- Dosagem de hemoglobina
ICH	- International Conference on Harmonisation
IS	- <i>Ion spray voltage</i>
IUPAC	- International Union of Pure and Applied Chemistry
K'	- Fator de retenção
LD	- Limite de detecção
LDL	- Lipoproteínas de baixa densidade
LQ	- Limite de quantificação

MCH	- Hemoglobina corpuscular média
MCHC	- Concentração de hemoglobina corpuscular média
MCV	- Volume corpuscular médio
MPV	- Volume plaquetário médio
<i>m/z</i>	- massa/carga
[M+H] ⁺	- Massa molecular mais um hidrogênio
[M-H] ⁻	- Massa molecular menos um hidrogênio
n	- Número de amostras
N	- Número de pratos teóricos
PCT	- Plaquetócrito
PDW	- Coeficiente de variação do volume plaquetário médio
PLT	- Contagem de plaquetas
PNPIC	- Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
RBC	- Glóbulos vermelhos
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RDW	- Coeficiente de variação do volume de glóbulos vermelhos
RE	- Resolução
RENAME	- Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RENISUS	- Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
Rs	- Resolução
SUS	- Sistema Único de Saúde
T	- Fator de cauda
Tr	- Tempo de retenção
USP	- <i>The United States Pharmacopeia Convention</i>
UV	- Ultravioleta
VLDL	- Lipoproteínas de densidade muito baixa
WBC	- Leucócitos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 <i>Solidago microglossa</i> DC.....	21
3.1.1 Taxonomia.....	21
3.1.2 Sinônimos e nomes populares	22
3.1.3 Distribuição geográfica.....	22
3.1.4 Descrição macroscópica	23
3.1.5 Descrição Microscópica.....	24
3.1.6 Uso Popular.....	24
3.1.7 Constituição química	25
3.1.8 Atividades biológicas.....	26
3.1.9 Atividades farmacológicas.....	26
3.1.10 Avaliação toxicológica	27
3.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	28
3.2.1 Seletividade.....	28
3.2.2 Linearidade.....	29
3.2.3 Intervalo.....	30
3.2.4 Limite de Detecção (LD).....	30
3.2.5 Limite de Quantificação (LQ).....	31
3.2.6 Precisão	31
3.2.7 Exatidão	32
3.2.8 Robustez	33
3.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	33
3.3.1 Atividade Antioxidante.....	33
3.3.2 Atividade frente à enzima tirosinase.....	34
3.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS.....	36
3.4.1 Avaliação da toxicidade frente aos náuplios de <i>Artemia salina</i>	36
3.4.2 Toxicidade oral aguda em ratos	37
3.4.2.1 Hemograma.....	38
3.4.2.2 Provas Bioquímicas.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	45
4.1.1 Coleta, identificação e exsicata	45
4.1.2 Análises físico-químicas	46

4.1.2.1 Umidade	46
4.1.2.2 Cinzas totais	47
4.1.2.3 Cinzas insolúveis em ácido	47
4.1.3 Marcha fitoquímica	48
4.1.3.1 Preparo do extrato aquoso a 20%	48
4.1.3.2 Pesquisa de heterosídeos antociânicos	48
4.1.3.3 Pesquisa de heterosídeos saponínicos	48
4.1.3.4 Pesquisa de gomas e mucilagens	49
4.1.3.5 Pesquisa de taninos	49
4.1.3.6 Pesquisa de aminogrupos	50
4.1.3.7 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%	50
4.1.3.8 Pesquisa de alcalóides	50
4.1.3.9 Pesquisa de flavonóides	51
4.1.3.10 Pesquisa de cumarinas	51
4.1.3.11 Pesquisa de antraquinonas	52
4.1.3.12 Pesquisa de esteróis e triterpenos	52
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO	52
4.2.1 Análises físico-químicas	53
4.2.1.1 Determinação do teor de sólidos	53
4.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO	54
4.3.1 Sistema de partição sólido-líquido	54
4.3.2 Análise em cromatografia líquida de alta resolução (CLAE)	55
4.4 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS	56
4.4.1 Elucidação estrutural	57
4.5 DESENVOLVIMENTO DE ANÁLISE PARA QUANTIFICAÇÃO EM CLAE	58
4.5.1 Validação da metodologia por CLAE	60
4.5.1.1 Seletividade	60
4.5.1.2 Linearidade e Intervalo	61
4.5.1.3 Precisão	62
4.5.1.4 Exatidão	63
4.5.1.5 Robustez	64
4.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	64
4.6.1 Formação do complexo fosfomolibdênico	64
4.6.2 Redução do radical de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina)	65
4.7 ENSAIO <i>In Vitro</i> DA ATIVIDADE DA ENZIMA TIROSINASE	67
4.8 TESTE DE LETALIDADE PARA OS NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i>	68
4.8.1 Preparo da solução salina	68
4.8.2 Eclosão dos ovos	68
4.8.3 Preparo das amostras	69

4.8.4 Avaliação da toxicidade.....	69
4.9 TOXICIDADE ORAL AGUDA EM RATOS	70
4.9.1 Preparo das amostras	70
4.9.2 Animais a serem utilizados.....	70
4.9.3 Teste toxicidade oral aguda	70
4.9.4 Hemograma.....	72
4.9.5 Provas Bioquímicas.....	72
4.9.6 Avaliação histopatológica	73
4.9.7 Análise estatística.....	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1 ANÁLISES DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL.....	74
5.2 ANÁLISES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES	75
5.2.1 Obtenção e análises das frações	75
5.2.1.1 Obtenção das frações	75
5.2.1.2 Análise da matéria-prima, extrato bruto e frações por CLAE	76
5.3 ISOLAMENTO DO COMPOSTO	88
5.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO EM CLAE	98
5.4.1 Seletividade.....	100
5.4.1.1 Uso de detector de arranjo de diodo	100
5.4.1.2 Método de adição do padrão.....	101
5.4.2 Linearidade e intervalo	103
5.4.3 Precisão	106
5.4.3.1 Repetibilidade.....	106
5.4.3.2 Precisão intermediária.....	107
5.4.4 Exatidão	107
5.4.5 Robustez	109
5.4.6 Determinação do teor de quercitrina nas amostras de matéria-prima, extrato bruto, extrato liofilizado e frações.....	110
5.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	111
5.5.1 Formação do complexo de fosfomolibdênio.....	111
5.5.2 Redução do Radical de DPPH	112
5.6 ENSAIO <i>In Vitro</i> DA ATIVIDADE DA ENZIMA TIROSINASE	113
5.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE AOS NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i>	114
5.8 TOXICIDADE ORAL AGUDA EM RATOS	116
5.8.1 Avaliação comportamental, consumo de água, ração e variação de peso.....	116
5.8.2 Hemograma.....	119
5.8.3 Avaliação da função hepática.....	123
5.8.4 Avaliação da função renal	126
5.8.5 Provas bioquímicas	128

5.8.6 Avaliação histopatológica	129
6 CONCLUSÃO	131
REFERÊNCIAS.....	133

1 INTRODUÇÃO

Os fitoterápicos são formas farmacêuticas obtidas exclusivamente de matéria-prima ativa vegetal. São caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2010).

Globalmente o setor de fitoterápicos movimentava cerca de US\$ 21,7 bilhões por ano. Apesar de não existirem dados oficiais atualizados, acredita-se que este setor movimentava no Brasil cerca de US\$ 160 milhões por ano. Porém, o fator comercial mais atraente é o ritmo de crescimento das vendas interno, cerca de 15% ao ano, muito acima do crescimento referente aos medicamentos obtidos por síntese, cerca de 4% (CARVALHO *et al*, 2008).

Acredita-se que o aumento na demanda dos fitoterápicos deve-se à busca por terapêutica dita e compreendida pelo senso comum como saudável, menos agressivas sob o ponto de vista de reações adversas e sobretudo mais acessíveis economicamente (FREITAS, 2007).

Associado a isso, estima-se que atualmente o processo de obtenção de novos fármacos por meio de síntese orgânica ao acaso necessite de um incentivo financeiro de aproximadamente quinhentos milhões de dólares. Além disso, a chance de encontrar um novo fármaco por screening ao acaso diminui progressivamente ano após ano (YUNES, FILHO, 2001).

Diante deste panorama demonstra-se a necessidade de se explorar a flora brasileira em busca de novos fármacos. Esse é um dos motivos que torna o estudo de plantas medicinais tão interessante e promissor, pois além de embasar cientificamente a fitoterapia como uma alternativa de tratamento, é fonte de novos e potentes fármacos para a medicina alopática. Para isso é necessário que se realizem estudos científicos relativos aos aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos e de desenvolvimento de metodologias analíticas (MIGUEL, MIGUEL, 1999).

Em um levantamento sobre a origem dos fitoterápicos registrados na ANVISA durante o período de 2008, verificou-se que do total de espécies vegetais efetivamente com registro, somente 30% pertencem à flora da América do Sul. Tal

fato pode ser visto como um indicativo de que há necessidade de investimentos em pesquisa envolvendo avaliação da eficácia e segurança de espécies medicinais brasileiras, bem como no desenvolvimento de fitoterápicos (CARVALHO *et al*, 2008).

O governo nacional, a partir do ano de 2006, elaborou algumas estratégias para estimular o incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento do setor de plantas medicinais e fitoterápicos. A primeira foi a Portaria Ministerial MS/GM nº 971, de 03 de maio de 2006, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). A segunda foi o Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e dá outras providências. Ambas as políticas apresentam em suas diretrizes o incentivo à pesquisa e desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do país. Além disso, estimulam a adoção da Fitoterapia nos programas de saúde pública. Espera-se com isso, um aumento no número de fitoterápicos, principalmente com base em espécies nativas (CARVALHO, 2008).

Em fevereiro de 2009, o Ministério da Saúde publicou a relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS (RENISUS). Nesta relação são citadas setenta e uma espécies vegetais nativas com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse ao SUS. Muitas destas plantas são utilizadas popularmente, porém sem nenhuma comprovação científica de segurança e eficácia. Entre estas plantas nativas destaca-se a presença da espécie vegetal *Solidago microglossa*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Promover evidências que subsidiem o uso seguro e eficaz da espécie vegetal nativa brasileira *Solidago microglossa*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Purificar e identificar componentes fitoquímicos e selecionar um marcador fitoquímico.

Desenvolver e validar análise de quantificação do marcador selecionado.

Analisar a atividade antioxidante do extrato bruto e das frações.

Analisar a atividade do extrato bruto sobre a enzima tirosinase.

Analisar a toxicidade do extrato e das frações sobre o microcrustáceo *Artemia salina*.

Avaliar a toxicidade oral aguda do extrato bruto em ratos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Solidago microglossa* DC

3.1.1 Taxonomia

A espécie vegetal *S. microglossa* é uma planta nativa da América do Sul, cuja classificação botânica vegetal está apresentada no Quadro 1.

	CRONQUIST (1981)	JOLY (1991)
Divisão	Magnoliophyta	Angiospermae
Classe	Magnoliopsida	Dicotyledoneae
Subclasse	Asteridae	Sympetalae (Gamopetalae)
Ordem	Asterales	Campanulales (Synandreae)
Família	Asteraceae	Compositae
Gênero	<i>Solidago</i>	<i>Solidago</i>
Espécie	<i>microglossa</i>	<i>microglossa</i>
Nome científico	<i>Solidago microglossa</i>	<i>Solidago microglossa</i>

QUADRO 1- ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *Solidago microglossa*

A família Compositae é a maior família da divisão angiospermae, compreendendo cerca de 920 gêneros com aproximadamente 19.000 espécies. São plantas de hábitos muito variados, ervas, subarbustos, trepadeiras ou excepcionalmente árvores. A grande maioria dos gêneros (cerca de 98%) é constituída por plantas de pequeno porte. As folhas são também muito variadas, inteiras ou fendidas, de disposição alterna ou oposta, podem ser latescentes ou não. Apresenta flores sempre reunidas em inflorescência característica, o capítulo. As flores são de simetria radial ou zigomorfas até bilabiadas, são hermafroditas ou de sexo separados, podendo estar na mesma inflorescência ou em plantas dióicas

(JOLY, 1991). O gênero *Solidago* possui cerca de 120 representantes, sendo que a maioria de suas espécies são nativas da América do Norte (WEBER, JAKOBS, 2005).

3.1.2 Sinônimos e nomes populares

Solidago chilensis Meyen, *Solidago marginella* DC; *Solidago nitidula* Martius; *Solidago odora* Hook ET Arn; *Solidago polyglossa* DC; *Solidago vulneraria* Martius, *Solidago linearifolia* DC são as sinônimas científicas desta espécie (OLIVEIRA, AKISUE, AKISUE, 1991; LORENZI, MATOS, 2000).

Popularmente é conhecida como arnica, arnica do mato, arnica brasileira, erva-lanceta, arnica silvestre, espiga de ouro, lanceta, macela miúda, marcela miúda, rabo de rojão, sapé macho (LORENZI, MATOS, 2000).

3.1.3 Distribuição geográfica

Solidago microglossa é uma planta nativa da parte meridional da América do Sul, incluindo o sul e sudeste brasileiro (LORENZI, MATOS, 2000).

Na Figura 1 estão representadas as localidades onde é possível encontrar esta espécie vegetal.



FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE VEGETAL *Solidago microglossa*
 FONTE: MOBOT (2009)

3.1.4 Descrição macroscópica

Vegetal ereto que mede geralmente cerca de 1 metro de altura, quando florido, por até 1,5 cm de diâmetro na base. O caule é simples, não ramificado, de coloração verde clara na parte superior e verde acinzentada na inferior, pubescente e de forma cilíndrica. Apresenta fratura fibrosa. As folhas são sésseis, alternas, inteiras e membranosas, medindo até 10 cm de comprimento por até 1,5 cm de largura. A margem foliar é ligeiramente serrilhada na porção apical e quase lisa na porção basal. As flores estão reunidas em grandes panículas que alcançam, algumas vezes, 20 cm de comprimento. Os capítulos apresentam cor amarela e são constituídos de oito a dez floretas tubulosas e dezoito a vinte floretas liguladas. As brácteas que envolvem os capítulos variam de lineares a lanceoladas, medindo o involúcro, que é campanular, cerca de 3 cm de comprimento. As floretas externas do capítulo são femininas e as floretas internas são hermafroditas. O fruto é do tipo aquênio, mede cerca de 1 mm de comprimento e apresenta elevações em sua superfície (OLIVEIRA, AKISUE, AKISUE, 1991).



FIGURA 2 - FOTO *Solidago microglossa* DC
FONTE: LORENZI e MATOS (2000)

3.1.5 Descrição Microscópica

A folha apresenta mesófilo de estrutura heterogênea e simétrica. As epidermes, vistas em secção transversal, apresentam células de contorno retangular, alongadas no sentido periclinal. As células da epiderme inferior são um pouco menores que as da epiderme superior. Ambas as epidermes são providas de pêlos tectores unisseriados, geralmente formado por duas a quatro células, sendo frequentemente a célula terminal alongada e fina. Os estômatos ocorrem em ambas às epidermes e são do tipo anomocíticos. As epidermes vistas em secção paradérmica apresentam células de paredes finas e contorno aproximadamente poligonal. O parênquima paliçádico é formado por duas fileiras de células tanto do lado da epiderme superior como do lado da epiderme inferior. A região mediana do mesófilo é constituída por uma ou duas fileiras de células parenquimáticas grandes e de paredes finas. Estas estão em continuidade com a bainha dos feixes vasculares que apresentam, caracteristicamente, a região floemática relacionada com o canal secretor. A região da nervura mediana apresenta secção transversal biconvexa com a parte relacionada com a epiderme inferior bastante proeminente. Esta região possui três feixes vasculares, envolvidos pelo parênquima fundamental, relacionados com o canal secretor. Logo abaixo das epidermes, nas regiões adjacentes aos feixes vasculares, nota-se a presença de colênquima angular. A droga não apresenta cristais de oxalato de cálcio (OLIVEIRA, AKISUE, AKISUE, 1991).

3.1.6 Uso Popular

O uso desta espécie vegetal vem sendo realizado com base na sua tradição popular (LORENZI, MATOS, 2000).

São atribuídas a esta espécie propriedades antiinflamatórias (LORENZI, MATOS, 2000; GOULART, 2006; LIZ, 2007; TAMURA *et al*, 2009), analgésicas (LORENZI, MATOS, 2000; GOULART, 2006), cicatrizante (LORENZI, MATOS, 2000;

GOULART *et al*, 2006), estomáquica, adstringente, vulnerária (LORENZI, MATOS, 2000), laxante, estimulante gastrointestinal e para o tratamento de úlceras (GRIZA, 2007).

Topicamente é utilizada para o tratamento de ferimentos, escoriações, traumatismos e contusões (LORENZI, MATOS, 2000).

3.1.7 Constituição química

Alguns grupos fitoquímicos já foram identificados nesta espécie vegetal, tais como flavonóides, taninos, saponinas (BAGATINI *et al*, 2009) e alcalóides, sendo este dependente da estação do ano (CHICOUREL *et al*, 1997).

Estudos fitoquímicos utilizando as partes aéreas de *Solidago microglossa* determinaram a presença de um flavonóide glicosídico, denominado quercitrina (TORRES, AKISUE, ROQUE, 1987; ROQUE *et al*, 1988; LORENZI, MATOS, 2000, GRIZA, 2007), representado na Figura 3.

Alguns compostos já foram isolados das raízes de *Solidago microglossa*, entre eles a rutina, ácido quínico, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido hidrocínâmico e seus derivados (LORENZI, MATOS, 2000; BAGATINI *et al*, 2009), campferol e quercetina (GRIZA, 2007).

O composto solidagenona foi isolado das flores e rizoma, o que pode contribuir para alguns dos efeitos farmacológicos utilizados popularmente, uma vez que este composto demonstrou possuir atividade antiúlcerosa (LEDA, TOMASSINI, 2002).

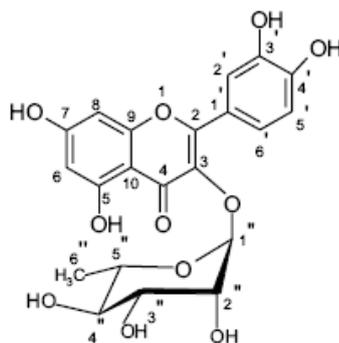


FIGURA 3 - QUERCITRINA

3.1.8 Atividades biológicas

DUARTE *et al.* (2005) verificaram atividade antibacteriana contra *Candida* do óleo essencial da espécie *Solidago microglossa*. Em outro estudo, realizado por Duarte e colaboradores (2004), o extrato hidroalcoólico desta espécie vegetal apresentou forte atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. O extrato metanólico e alguns compostos isolados (quercitrina, α -spinasterol e solidagenona) apresentaram atividade antimicrobiana moderada contra *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella setubal*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (GRIZA, 2007).

Os extratos brutos obtidos a partir das flores, folhas e raízes de Arnica do mato demonstraram ação antioxidante através do ensaio *in vivo* utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *in vitro* através do método da hipoxantina/xantina oxidase (GRIZA, 2007).

3.1.9 Atividades farmacológicas

LIZ (2007) demonstrou por meio de um estudo pré-clínico em camundongos, que o extrato aquoso e as frações isoladas de *Solidago microglossa* inibiram os mediadores pró-inflamatórios liberados pela inserção de carragenina e a infiltração de leucócitos para o sítio de inflamação, comprovando desta forma um importante mecanismo de ação para justificar sua atividade antiinflamatória. Outro ensaio biológico foi realizado por GOULART (2006) a qual verificou que as frações butanólicas e aquosas das raízes de arnica são efetivas na inibição dos parâmetros inflamatórios no modelo de pleurisia induzida por diferentes agentes flogísticos. Além disso, a inibição da interação dos leucócitos ao endotélio pode ser mais um mecanismo importante para a ação antiinflamatória desta espécie vegetal (TAMURA *et al.*, 2009).

O extrato hidroalcoólico de *S. microglossa* é capaz de reduzir edema de pata de rato provocado pela administração de carregenina. Além disso, demonstrou alta atividade analgésica, devido ao aumento do limiar da dor, induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (ROCHA, 2006).

3.1.10 Avaliação toxicológica

O potencial efeito citotóxico do extrato aquoso de *S. microglossa* foi avaliado no ciclo celular de *Allium cepa*. Os resultados demonstraram que as infusões de *S. microglossa*, na concentração de 14 mg.mL^{-1} , causaram redução do índice mitótico, apresentando, portanto, efeito antiproliferativo (BAGATINI *et al*, 2009).

Utilizando o ensaio do cometa alcalino, verificou-se que os extratos brutos das folhas e raízes de *S. microglossa* não induziram efeitos genotóxicos ou antigenotóxicos, ao contrário do extrato bruto das flores desta espécie, o qual apresentou significativa ação antigenotóxica e genotoxicidade (GRIZA, 2007).

Facury Neto e colaboradores (2004) sugeriram que a DL_{50} e DL_{100} do extrato aquoso de *S. microglossa* eram respectivamente, 3,4 e 5,4 vezes maiores do que a dose terapêutica considerada efetiva no processo de cicatrização ($16,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Os autores sugeriram cautela no uso sistêmico da arnica brasileira e recomendam mais estudos que comprovem sua segurança e eficácia.

A complexidade da composição e a variabilidade na qualidade dos extratos obtidos a partir de uma mesma espécie vegetal influenciam diretamente os resultados de ensaios biológicos e toxicológicos. Desta forma, a padronização dos extratos apresenta-se como um pré-requisito para garantir a constância dos ensaios realizados. Por isso, a determinação de um marcador para cada espécie vegetal, bem como o desenvolvimento de uma metodologia para sua quantificação, se faz tão necessária e importante nesta fase de determinação de sua segurança e eficácia.

3.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O setor de plantas medicinais tem passado por inúmeras transformações desde meados do ano 2000. Atualmente, para o desenvolvimento de novos fitoterápicos é necessário que este possua um marcador definido. Segundo a ANVISA, marcador é um composto ou classe de compostos químicos presentes na matéria-prima vegetal, tendo preferencialmente correlação com o efeito terapêutico. Este marcador deverá ser utilizado como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal, na padronização para realização de estudos biológicos e toxicológicos e posteriormente no desenvolvimento do medicamento fitoterápico (BRASIL, 2010).

Para isso é necessário que se desenvolva e valide metodologias de quantificação dos marcadores selecionados. O desenvolvimento da metodologia deve ser realizado com a finalidade de obtenção da melhor relação entre a separação dos compostos de interesse e componentes da matriz, considerando consumo de solventes e tempo de análise. Durante o desenvolvimento da metodologia alguns parâmetros devem ser analisados durante a corrida cromatográfica, tais como: fator caudal (normalmente menor ou igual a 2), retenção relativa (normalmente maior que 2), resolução (maior que 2 entre o pico do analito e interferente mais próximo) e número de pratos teóricos (maior que 2000) (USP, 2008a). Normalmente, utilizam-se dois ou mais desses parâmetros para garantir a conformidade da corrida analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação da metodologia de quantificação tem como objetivo garantir por meio de dados experimentais que os resultados obtidos são confiáveis (BRASIL, 2003). Um método analítico é considerado validado após a comprovação de alguns parâmetros, como: seletividade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez.

3.2.1 Seletividade

É a capacidade que um método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação

e componentes da matriz (BRASIL, 2003). Este parâmetro pode ser avaliado através da comparação dos resultados obtidos por amostras do analito contaminadas com impurezas e excipientes e amostras não contaminadas, demonstrando que o resultado não é influenciado pela presença destes compostos.

Na impossibilidade de obtenção da matriz isenta de substância de interesse, o método da adição do padrão pode ser aplicado. Este método consiste na comparação de uma curva analítica realizada com a adição do padrão na amostra, e uma curva analítica obtida com solução padrão, sem a presença da matriz. Se após a análise de regressão linear os coeficientes angulares estiverem próximos, ou seja, se as retas estiverem paralelas, significa que o método é seletivo, não havendo, portanto, interferência da matriz na determinação da substância de interesse (RIBANI *et al.*, 2004). A utilização de detectores de arranjos de fotodiodos, fluorescência e espectrofotômetros de massa são ferramentas muito úteis na determinação da seletividade, pois ajuda na determinação da pureza do pico (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

3.2.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003, ICH, 2005, USP 2008). Esse parâmetro é avaliado através da análise de no mínimo cinco concentrações diferentes, cada uma em triplicata, sem a inclusão do ponto zero. Através dos dados obtidos, obtém-se uma relação matemática que pode ser expressa por uma equação da reta. Se esta demonstrar-se linear, faz-se necessário tratamento estatístico para determinação do desvio padrão relativo, intercepto da reta com o eixo y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos e coeficiente de correlação linear (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2008).

3.2.3 Intervalo

É a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico, que possa ser determinada com precisão, exatidão e linearidade adequada, sendo derivada do estudo de linearidade e dependente da aplicação pretendida (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O intervalo pode ser determinado matematicamente através dos dados obtidos pela curva de calibração. Para isto, deve-se dividir o sinal do detector (unidades de área ou altura) pela sua respectiva concentração, fornecendo respostas relativas. As respostas relativas (eixo y) com o logaritmo das concentrações (eixo x) formam um gráfico em linha horizontal por toda a faixa linear, adicionam-se duas linhas horizontais paralelas ao gráfico de $\pm 5\%$ da linha da faixa linear. Aceita-se como intervalo linear o método em que a linha flutuar dentro deste intervalo (HUBER, 1998).

3.2.4 Limite de Detecção (LD)

Limite de detecção é a menor concentração do analito de interesse que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado. Para alguns procedimentos analíticos, os quais demonstram o ruído da linha base, a determinação pode ser realizada através da relação sinal/ruído. O cálculo pode ser feito com base na relação de duas a três vezes o ruído da linha base podendo ser expressa conforme equação abaixo:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

Onde, IC é a inclinação da curva de calibração e DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação (BRASIL, 2003).

3.2.5 Limite de Quantificação (LQ)

Limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

O LQ para métodos como CLAE pode ser determinado com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base, podendo ser calculada de acordo com a equação a seguir:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Onde DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de, no mínimo, três curvas de calibração construídas contendo a concentração do fármaco próxima ao suposto limite de quantificação. Este desvio pode ser obtido também a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco. O IC é a inclinação da curva (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

3.2.6 Precisão

A precisão representa o grau de proximidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, sob condições idênticas de ensaio (ICH, 2005; USP, 2008). Pode ser expressa em termos da característica da dispersão dos resultados, ou seja, através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), de um número suficiente de determinações da amostra, de acordo com a fórmula a seguir (BRASIL, 2003; USP, 2008):

$$DPR = \frac{DP \text{ (desvio padrão)} \times 100}{CMD \text{ (concentração média determinada)}}$$

A precisão pode ser considerada em três níveis: repetibilidade (precisão intracorrída), precisão intermediária (precisão inter-corrída) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial).

A repetibilidade é grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas dentro de um curto período de tempo, efetuada por um mesmo analista, mesma instrumentação e mesmo método. A repetibilidade pode ser verificada pela avaliação do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação, de um mínimo de nove determinações em três níveis de concentrações (alta, média e baixa), de acordo com o intervalo especificado, ou num mínimo de seis determinações para uma única concentração teste (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A precisão intermediária tem maior representatividade na variabilidade dos resultados do método em comparação a repetibilidade (RIBANI *et al.*, 2004).

3.2.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A determinação da exatidão pode ser realizada basicamente por três métodos: através da análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência), pela comparação dos resultados obtidos pela metodologia a ser validada com resultados de uma segunda metodologia bem caracterizada ou pelo método de adição de padrão (BRASIL, 2003; ICH, 2005). O ICH e a ANVISA estabelecem que o ensaio deve ser realizado com um mínimo de nove determinações em três níveis diferentes de concentração dentro dos limites de linearidade pré-estabelecidos. No ensaio da adição de padrão, a exatidão é expressa em porcentagem de recuperação de acordo com a equação a seguir:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração prática do padrão adicionado} \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

3.2.8 Robustez

O ensaio de robustez avalia a capacidade do método em resistir pequenas e deliberadas variações em seus parâmetros, indicando desta forma sua confiança (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A ANVISA recomenda alguns fatores que devem ser variados para análise utilizando a cromatografia líquida: variação do pH da fase móvel, variação da composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, e variações na temperatura e fluxo da fase móvel.

3.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.3.1 Atividade Antioxidante

Radicais livres podem ser definidos como espécies que contém um ou mais elétrons não pareados em orbitais atômicos ou moleculares. A presença deste elétron não pareado na última camada eletrônica confere um considerável grau de reatividades a esses compostos, os quais podem ceder o elétron desemparelhado, oxidando-se, ou receber um elétron, reduzindo-se. Nesta tentativa de se estabilizar quimicamente, os radicais livres propiciam reações em cadeia que terminam alterando a conformação, a estrutura ou as funções de diversos componentes celulares (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; VALKO *et al.*, 2007; LIMA, 2010). O efeito prejudicial dos radicais livres ocorre quando eles estão em quantidade excessiva no organismo, ultrapassando a capacidade do sistema de defesa antioxidante de neutralizá-los. O *stress* oxidativo gerado por este desequilíbrio está associado ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, inflamações crônicas, Alzheimer, Parkinson, além de estarem envolvidos no processo de envelhecimento

(FERREIRA, MATSUBARA, 1997; BIANCHI, ANTUNES, 1999; VALKO *et al.*, 2007; LIMA, 2010).

Compostos antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, presentes em baixas concentrações quando comparadas a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz. Desta forma atua inibindo ou reduzindo as lesões causadas pelos radicais livres nas células. Os mecanismos de ação dos compostos antioxidantes são os mais variados, podendo agir na inibição da formação de radicais livres, principalmente através da complexação de metais como ferro e cobre, pela interceptação dos radicais livres gerados impedindo o ataque sobre os lipídios, aminoácidos das proteínas e as bases de DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (BIANCHI, ANTUNES, 1999).

Neste contexto, há uma busca crescente por compostos ou novos produtos com atividades antioxidantes os quais podem agir complementando as defesas endógenas, atenuando o dano oxidativo, impedindo ou retardando a ação nociva dos radicais livres no organismo.

3.3.2 Atividade frente à enzima tirosinase

O sistema de pigmentação da pele humana é constituído basicamente por dois tipos celulares, melanócitos e queratinócitos, os quais interagem como uma unidade funcional, a melanina-epidermal, cuja atividade funcional é fator determinante pra coloração da pele (SILVEIRA, 2007).

Os queratinócitos são responsáveis pela secreção de alguns fatores os quais induzem a formação de melanócitos. Entre estes estão as prostaglandinas E2, o hormônio melanócito estimulante alfa (MSH), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), endotelina-1 e óxido nítrico (NO). Os três primeiros ativam a via dos melanócitos, enquanto o óxido nítrico ativa o evento de sinalização dependente do GMP (guanosina monofosfato) cíclico (SILVEIRA, 2007).

Os melanócitos são células especializadas responsáveis pela produção de melanina, a qual é produzida dentro de organelas intracelulares especializadas denominadas melanossomos (SILVEIRA, 2007).

A síntese de melanina ocorre por meio de várias reações oxidativas envolvendo a tirosina na presença da enzima tirosinase. Esta catalisa as reações de hidroxilação da tirosina em 3,4-dihidroxiifenilalanina (L -DOPA), devido a atividade tirosina hidroxilase (etapa limitante da melanogênese) e a oxidação da DOPA em dopaquinona (atividade dopa oxidase). A enzima oxida fenóis e difenóis usando um mecanismo catalítico que depende da presença de cobre no sítio ativo. A partir da produção da dopaquinona, uma série de reações enzimáticas e não-enzimáticas ocorrem para produzir compostos dihidroxiindólicos. Os pigmentos de melanina, eumelanina e feomelanina, são produzidos por oxidação e polimerização destes compostos indólicos (SILVEIRA, 2007; OLIVEIRA, 2010).

No sistema nervoso central a tirosinase participa da síntese de dopamina que é precursora direta de outras catecolaminas importantes como a noradrenalina e adrenalina, sendo recentemente implicada em inúmeras doenças neurodegenerativas, especialmente a Doença de Parkinson. Na epiderme, a tirosinase utiliza o radical livre superóxido para produzir melanina. Deste mesmo modo, outros compostos antioxidantes, os quais são capazes de inibir a produção de espécies reativas de oxigênio, podem reduzir a hiperpigmentação ou prevenir a melanogênese (SILVEIRA, 2007).

Distúrbios na quantidade e distribuição da melanina podem causar uma série de doenças relacionadas à hipopigmentação ou à hiperpigmentação. O acúmulo anormal de melanina é responsável por diversos processos de hiperpigmentação como melasma, sardas e melanomas malignos, e como exemplo de problemas relacionados à hipopigmentação temos o vitiligo.

Nos últimos anos, tem-se desenvolvido um grande número de pesquisas voltadas à busca de substâncias com capacidade potencial de inibir ou estimular a melanogênese. Deste modo, as plantas têm sido avaliadas como fontes para o desenvolvimento de antioxidantes naturais que podem interferir com o processo de melanogênese.

3.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS

Toxicidade é a propriedade potencial de uma determinada substância química de instalar um estado patológico em consequência de sua introdução ou interação com o organismo. Esta propriedade é verificada através da avaliação toxicológica onde se obtêm dados como dosagem, sinais, efeitos provocados que irão determinar o potencial de toxicidade (LARINI, 1997).

Plantas medicinais e produtos fitoterápicos possuem muitas vezes uma imagem errônea de que são isentos de efeitos tóxicos, por serem produtos naturais. Estudos já comprovaram que certas substâncias do metabolismo secundário de algumas espécies vegetais, quando encontradas em determinadas concentrações, são reconhecidamente nocivas ao usuário (MARIZ *et al*, 2006; ETGES, 2007; VASCONCELOS *et al*, 2007). Entre estas substâncias podemos citar os alcalóides pirrolizidínicos, harmala eritrínicos, glicosídeos cianogênicos e cardiotônicos. Toda substância pode ser considerada um agente tóxico em potencial, dependendo das condições de exposição, como quantidade administrada, tempo e frequência de exposição. Por outro lado, estas substâncias podem ser empregadas de forma segura mantendo-se as condições de exposição abaixo dos níveis de tolerância e toxicidade (BRASIL, 2004b).

Os estudos de segurança pré-clínica são importantes na determinação da segurança (dose-dependente) de um potencial candidato a medicamento, como também na identificação dos possíveis efeitos toxicológicos produzidos e órgãos mais afetados. A avaliação e determinação da eficácia e segurança das plantas medicinais e fitoterápicos deve ser considerada fator decisivo para a aceitação e permanência destes produtos no mercado, e para que assim possam assumir seu papel social na promoção da saúde coletiva (LIMA, 2006).

3.4.1 Avaliação da toxicidade frente aos náuplios de *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* é um ensaio biológico rápido, de baixo custo, não requer ambiente asséptico, utiliza um grande número de

organismos para validação estatística, não requer equipamentos especiais e a quantidade de amostra requerida é relativamente pequena (2-20mg) (MEYER et al., 1982; KALEGARI, 2009). Estas condições permitem que este teste seja muito utilizado nas primeiras fases de avaliação da toxicidade de plantas medicinais.

3.4.2 Toxicidade oral aguda em ratos

Os estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos são regulamentados através da Resolução 90, de 16 de março de 2004. O regulamento em questão preconiza que o teste de toxicidade aguda deve ser realizado através da exposição de uma dose única ou dose fracionada do fitoterápico, administrada no período de 24 horas em animais, preferencialmente mamíferos em idade adulta. A via de administração deve ser a mesma proposta para o uso do produto (BRASIL, 2004).

Os animais devem ser observados durante 14 dias quanto à aparência geral e a presença ou não de sinais de toxicidade, tais como alterações respiratórias, digestivas, de locomoção e neurológicas (incluindo náusea, vômito, diarreia, tremor e convulsão). Após o período de observação, deve ser realizado o hemograma completo e algumas provas bioquímicas, tais como aminotransferases, fosfatase alcalina, uréia, colesterol, triglicérides, glicose e proteínas totais. Os animais devem ser autopsiados e caso seja observado alterações nas autópsias, estudos histopatológicos dos órgãos acometidos devem ser realizados (BRASIL, 2004).

Em alguns países a classificação toxicológica de novas drogas é realizada através do teste de dose fixa. Neste ensaio grupos de 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) recebem doses pré-determinadas da droga, geralmente 5, 50, 500 e 2000 mg.kg⁻¹. A classificação toxicológica se baseia na determinação da maior dose a qual é capaz de gerar sinais ou indícios de toxicidade sem que ocorram mortes dos animais, conforme Quadro 2 (BRANCO, 2009).

Categoria conforme Comunidade Européia	Toxicidade sem Mortes
Muito tóxica	$\leq 5 \text{ mg.kg}^{-1}$
Tóxica	$\leq 50 \text{ mg.kg}^{-1}$
Nociva	$\leq 500 \text{ mg.kg}^{-1}$
Sem classificação toxicológica	$\geq 2000 \text{ mg.kg}^{-1}$

QUADRO 2 - CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA SEGUNDO TESTE DE DOSE FIXA
 FONTE: BRANCO (2009)

3.4.2.1 Hemograma

O hemograma completo compreende os seguintes parâmetros: glóbulos vermelhos (RBC), dosagem de hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), coeficiente de variação do volume de glóbulos vermelhos (RDW), leucócitos (WBC), contagem de plaquetas (PLT), plaquetócrito (PCT), volume plaquetário médio (MPV) e coeficiente de variação do volume plaquetário médio (PDW).

●Eritrograma

O eritrograma compreende as análises de contagem de glóbulos vermelhos, dosagem de hemoglobina, hematócrito e determinação dos índices hematimétricos (MCV, HCM, CHCM e RDW).

A contagem de glóbulos vermelhos, dosagem de hemoglobina e o hematócrito geralmente são analisados em conjunto. A contagem de glóbulos vermelhos determina o número de eritrócitos em mm^3 de sangue total. O hematócrito indica a porcentagem das hemácias em relação ao volume total de sangue e plasma da amostra. Valores baixos de hematócrito podem estar correlacionados com anemia, hemólise, hemodiluição, enquanto valores altos podem estar associados à policitemia ou hemoconcentração, por exemplo (HENRY, 2008).

A hemoglobina é molécula protéica de estrutura quaternária, composta por quatro cadeias de globina, cada uma com um grupo prostético heme, cujo principal

componente é o ferro. A hemoglobina possui elevada afinidade pelo oxigênio, sendo responsável pelo seu transporte até os tecidos. A dosagem de hemoglobina é o parâmetro mais preciso na avaliação do quadro de anemia (condição na qual a dosagem de hemoglobina sanguínea é menor que o limite inferior da normalidade para determinada raça, idade e sexo) e da situação nutricional do organismo. A carência protéica ou vitamínica de ferro pode interferir na biossíntese de hemoglobina, resultando no desenvolvimento de anemia. Tais condições podem ser observadas clinicamente em animais nos quais tenha havido uma perda de proteínas séricas considerável, inadequada ingestão ou digestão protéica ou baixa ingestão ou absorção de ferro (ALVARES, 2006; VOET, PRATT, 2008).

Os índices hematimétricos devem ser analisados em conjunto, e são utilizados para auxiliar na diferenciação e determinação do grau de anemias. O volume corpuscular médio ou volume globular médio (VGM) demonstra o tamanho médio dos eritrócitos, classificando as hemácias em microcíticas, normocíticas ou macrocíticas. Os parâmetros HCM e CHCM são semelhantes, indicando respectivamente, o peso e a concentração da hemoglobina dentro dos eritrócitos. O aumento no índice de MCHC é normalmente resultado da hemólise *in vitro* ou *in vivo*, e valores baixos ocorrem na diminuição da concentração de hemoglobina, quando as hemácias se tornam hipocrômicas. O coeficiente de variação do volume de glóbulos vermelhos (RDW) é um indicador de anisocitose (variação de tamanho nas hemácias). Expressa o quanto a população de hemácias da amostra desvia-se do VCM, em porcentagem, sugerindo a necessidade de avaliação citomorfológica do material (ALVARES, 2006).

- Leucograma

O leucograma é a parte do hemograma que avalia os leucócitos. Estes são também conhecidos como série branca ou glóbulos brancos e são as células de defesa responsáveis por combater agentes infecciosos. O aumento do número de leucócitos (leucocitose) é causado principalmente por processos inflamatórios, infecciosos, traumatismo e leucemia. A leucopenia, ou seja, a diminuição dos níveis de leucócitos, pode ser proveniente de síndrome de imunodeficiências ou devido à utilização de drogas imunossupressoras (MOREIRA *et al*, 2001).

- Plaquetas

Plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados de megacariócitos, de forma discóide, produzidas na medula óssea. O regulador principal da produção de plaquetas é a trombopoetina, que é produzida pelo fígado e pelos rins, e atua na multiplicação e aceleração do ritmo de maturação dos megacariócitos (HOFFBRAND, MOSS, PETTIT, 2008).

As plaquetas, entre os elementos figurados do sangue, constituem o elemento essencial para a manutenção da hemostasia em resposta à injúria vascular, sendo as responsáveis pelo início do processo de coagulação. Alterações no número de plaquetas circulantes podem resultar em trombocitopenia (números inferiores de plaquetas) que pode ocasionar hemorragias ou trombocitose (valores aumentados de plaquetas) que pode gerar a formação de trombos (JUNQUEIRA, 2008).

3.4.2.2 Provas Bioquímicas

A composição bioquímica do plasma sangüíneo reflete de modo fiel a situação metabólica das células dos tecidos animais, de forma a poder avaliar lesões teciduais, transtornos no funcionamento de órgãos, adaptação do animal diante de desafios nutricionais e fisiológicos e desequilíbrios metabólicos específicos (ALVARES, 2006).

- Colesterol, Triglicerídeos e Lipoproteínas de alta densidade (HDL)

O colesterol é o esteroide mais abundante nos tecidos humanos. É um composto alicíclico cuja estrutura básica inclui o núcleo peridrociclopentanofenantreno contendo quatro anéis fundidos. Somente 25% do colesterol plasmático é proveniente da dieta, o restante é sintetizado endogenamente, principalmente pelo fígado, a partir do acetil-CoA. A molécula de colesterol compõe principalmente as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e membranas celulares, sendo também precursora na síntese dos hormônios esteróides, vitamina D e ácidos biliares. O colesterol plasmático é afetado tanto por

fatores intra-individuais como interindividuais. As medidas da colesterolemia são influenciadas pela dieta, exercícios físicos, idade, sexo e raça. A hipercolesterolemia está associada a diversas patologias, como: aterosclerose, síndrome nefrótica, *diabetes mellitus* e cirrose hepática. O colesterol circula no plasma ligado a lipoproteínas, sendo que 2/3 está esterificado com ácidos graxos. A sua excreção é realizado pela bile, na forma de ácidos biliares, ou na urina, na forma de hormônios esteróides (ALVARES, 2006; SMITH, MARKS, LIEBERMAN, 2007; MOTTA, 2011).

Os triglicerídeos são triésteres de glicerol com ácidos graxos, sintetizados no fígado e intestino. São formas importantes de armazenamento e transporte de ácidos graxos, funcionando como eficientes reservas energéticas. Exceto durante a absorção das gorduras da dieta, o fígado é o principal provedor de triglicerídeos ao plasma (VOET *et al*, 2008; MOTTA, 2011).

Seu transporte no sangue ocorre através de lipoproteínas quilomícrons e VLDL, principalmente. Estes complexos são constituídos por quantidades variáveis de colesterol e seus ésteres, triglicerídeos, fosfolípidios e apoproteínas, sendo solúveis no plasma devido à natureza hidrófila da parte protéica.

Com base na densidade, as lipoproteínas plasmáticas são separadas em: quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL). Os quilomícrons são as principais forma de transporte dos triglicérides exógenos até os tecidos, incluindo o tecido adiposo que é o principal local de captação. As VLDL transportam triglicérides de origem endógena desde o fígado e, em menor quantidade, do intestino delgado para os tecidos, principalmente o tecido adiposo. A LDL é rica em colesterol (constituindo cerca de 2/3 do colesterol total plasmático), sendo transportadas até as células e formando a partícula lipídica mais aterogênica no sangue. Os níveis elevados de LDL estão diretamente associados no prognóstico de risco de aterosclerose coronariana. As lipoproteínas de alta densidade (HDL) exercem importante papel na regulação da concentração do colesterol nos tecidos. As HDL atuam no retorno do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado em um processo denominado “transporte reverso do colesterol”, onde este é transformado em ácidos biliares para a sua eliminação. Devido a isto, as HDL tem ação protetora contra a doença arterial coronária. Foi demonstrado que a prevalência da enfermidade coronariana é muito maior em indivíduos com níveis reduzidos de HDL em relação aos indivíduos com teores elevados. Valores elevados de HDL podem estar

associados a alcoolismo, cirrose biliar (primária), hepatite crônica e devido ao uso de algumas drogas. Valores reduzidos podem estar associados a arteriosclerose, colestase, coronariopatia, *diabetes mellitus*, doença de Tangier, doença renal, hepatopatia, hipercolesterolemia, hiperlipoproteinemia tipo IV, hipertrigliceridemia, hipolipoproteinemia, após infarto do miocárdio, fumo, obesidade, sedentarismo, esteróides, androgênios, progestágenos, anabolizantes, tiazídicos, bloqueadores β -adrenérgicos, neomicina, anti-hipertensivo, infecções bacterianas e infecções virais (VOET, PRATT, 2008; MOTTA, 2011).

- Proteínas totais

A determinação das proteínas totais em amostras de sangue e outros líquidos biológicos é útil para avaliar o estado nutricional e as alterações protéicas nas doenças. A proteína total é uma medição aproximada da proteína sérica que pode revelar o estado nutricional, doença renal, intestinal e doença hepática (LUCA, REIS, 2001).

O fígado é considerado um órgão importante na utilização da proteína da dieta, sendo, também, o único entre tecidos e órgãos cujo conteúdo absoluto de proteína se altera continuamente, em função do padrão de consumo alimentar e do metabolismo (ALVARES, 2006).

- Uréia

A dosagem de uréia é uma das formas de avaliação da função renal. Os aminoácidos provenientes do catabolismo protéico são desaminados, ocorrendo à produção de amônia a qual é tóxica para o organismo. No fígado, a amônia e os grupos amino dos aminoácidos são convertidos em uréia, a qual é atóxica, solúvel em água e prontamente excretada pela urina. O processo pelo qual a uréia é produzida é conhecido como ciclo da uréia. A uréia é secretada para a corrente sanguínea e retirada pelos rins para excreção pela urina. O teor de uréia no plasma é afetado pela função renal, pelo conteúdo protéico da dieta e pelo teor do seu catabolismo, pelo estado de hidratação do paciente e presença de sangramento intestinal (SMITH *et al*, 2007; VOET, PRATT, 2008; LIMA, 2009; MOTTA, 2011).

- Glucose

A glicose é um dos mais importantes metabólitos presentes no organismo, sendo responsável por suprir a demanda imediata de energia corporal. A glicose presente no sangue é proveniente da quebra de polissacarídeos ou através de sua síntese a partir de precursores não-glicídicos (gliconeogênese). Nos animais, um suprimento constante de glicose é essencial para tecidos como cérebro e as células vermelhas do sangue, que dependem quase totalmente da glicose como fonte de energia (outros tecidos podem oxidar, também, ácidos graxos para obtenção de energia). A mobilização de glicose dos estoques de glicogênio, principalmente no fígado, permite um suprimento constante desse monossacarídeo para todos os tecidos (VOET, PRATT, 2008).

A manutenção do teor de glicose dentro de limites restritos é realizada por um mecanismo regulador hormonal extremamente sensível, o qual contempla a insulina, adrenalina e glucagon. Em condições patológicas pode ocorrer um desequilíbrio deste mecanismo, acarretando uma diminuição ou elevação dos níveis de glicose sanguínea (BRANCO, 2009).

- Transaminases

A avaliação da função hepática é realizada principalmente através da análise das atividades enzimáticas da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e da fosfatase alcalina (FA).

As aminotransferases AST (também denominada transaminase glutâmico oxaloacética - TGO) e ALT (transaminase glutâmico pirúvica - TGP) exercem papéis centrais em várias reações, tanto para síntese quanto para degradação de aminoácidos. Essas aminotransferases catalisam a transferência reversível dos grupos amino do aspartato ou da alanina para o α -cetoglutarato, formando oxaloacetato e piruvato, além de ácido glutâmico (glutamato). Como essas reações envolvem a interconversão dos aminoácidos a piruvato ou ácidos dicarboxílicos, atuam como ponte entre o metabolismo dos aminoácidos e carboidratos (MOTTA, 2011).

A aspartato aminotransferase (AST), enzima localizada nas mitocôndrias, é encontrada principalmente no tecido cardíaco, fígado e músculo esquelético; e em pequenas quantidades nos rins, pâncreas, baço e eritrócitos. A ALT apresenta-se em elevados níveis no citoplasma dos hepatócitos, sendo considerado um indicador

sensível de lesão nestes. Como as concentrações relativas das enzimas variam consideravelmente em diferentes tecidos, é possível, pelo menos em parte, identificar a origem de algumas enzimas (ALVARES, 2006; LIMA 2009; MOTTA, 2011). E nos casos de seus aumentos na corrente sanguínea podem indicar algumas patologias como hepatite aguda, cirrose hepática, mononucleose infecciosa, colestase extra-hepática aguda, infarto do miocárdio, distrofia muscular progressiva e dermatomiosite, embolia pulmonar, pancreatite aguda e insuficiência cardíaca congestiva (MOTTA, 2011).

- Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina (FA) pertence a um grupo de enzimas relativamente inespecíficas, que catalisam a hidrólise de vários fosfomonoésteres em pH alcalino. Apesar da exata função metabólica da enzima ser desconhecida, parece estar associada com o transporte lipídico no intestino e com processos de calcificação óssea. A enzima FA está amplamente distribuída nos tecidos humanos, principalmente mucosa intestinal, fígado (canalículos biliares), túbulos renais, baço, ossos (osteoblasto) e placenta. A FA sérica tem grande significado clínico na investigação das desordens hepatobiliares e ósseas. Nas enfermidades hepatobiliares, as elevações da atividade da enzima são encontradas, principalmente, na obstrução extrahepática. Neste caso a atividade da FA se eleva devido ao incremento na síntese da enzima, induzida pela colestase (ALVARES, 2006; LIMA, 2009, MOTTA, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

4.1.1 Coleta, identificação e exsicata

As amostras das partes aéreas de *Solidago microglossa* foram coletadas junto ao produtor, sito a Avenida das Nações, bairro Estação, no município de Araucária, localizada no estado do Paraná, no mês de dezembro de 2008. A determinação botânica foi realizada no herbário do Museu Botânico Municipal da cidade de Curitiba, Estado do Paraná pelo biólogo Osmar do Santos Ribas. A exsicata com a qual a amostra foi comparada está depositada neste local e registrada sob o número 308742 (Figura 4).



FIGURA 4 - EXSICATA DE *Solidago microglossa*, ACERVO N^o 308742
FONTE: A autora (2009)

Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizadas as partes aéreas de *Solidago microglossa* (Figura 05). Esta escolha baseou-se na forma de uso tradicional desta planta.



FIGURA 5 - PARTES AÉREAS DE *Solidago microglossa*
FONTE: A autora (2009)

4.1.2 Análises físico-químicas

As análises realizadas para a matéria-prima vegetal são de fundamental importância para a sua caracterização e para auxiliar na determinação dos parâmetros de qualidade desta espécie. As metodologias de análise estão descritas a seguir.

4.1.2.1 Umidade

A metodologia escolhida para a determinação da umidade está descrito na Farmacopéia Brasileira IV. Cinco gramas da planta pulverizada foram acondicionadas em uma placa de petri previamente dessecada e levadas à estufa a 105° C por um prazo de 5 horas. O ensaio deu-se por concluído quando duas pesagens sucessivas não diferiram entre si por mais de 5 mg.

O cálculo utilizado para a determinação do valor da umidade está representado a seguir:

$$\% = \frac{(\text{peso amostra} + \text{peso placa de petri}) - (\text{peso amostra dessecada} + \text{peso placa de petri})}{\text{peso da amostra}} \times 100$$

4.1.2.2 Cinzas totais

O método utilizado para determinação das cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido está preconizado na Farmacopéia Brasileira IV. Acondicionou-se a matéria-prima vegetal seca em cadinho previamente dessecado em mufla a 450°C por 30 minutos. Iniciou-se a combustão com chama pequena do bordo superior ao fundo do cadinho aumentando o aquecimento gradativamente. Após completa combustão (ausência de fumaça), calcinou-se o cadinho em mufla a 450°C por 2 horas (para eliminação total do carvão). O cálculo da porcentagem de cinzas totais foi calculado em relação à droga seca ao ar.

4.1.2.3 Cinzas insolúveis em ácido

O resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi levado à fervura durante 5 minutos com 25 ml de ácido clorídrico (70 g/l) SR em cadinho coberto com vidro de relógio, que em seguida foi lavado com 5 ml de água quente, juntando esta água ao cadinho. A mistura foi filtrada sobre o papel de filtro isento de cinza, e o resíduo insolúvel foi lavado com água quente até que o filtrado mostrou-se neutro. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original, secado sobre a chapa quente e incinerado a cerca de 500°C até peso constante. A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido foi calculado em relação à droga a seca ao ar.

4.1.3 Marcha fitoquímica

A marcha fitoquímica tem como objetivo a identificação dos principais grupos do metabolismo secundário das espécies vegetais, através da identificação por reações de precipitação ou coloração. Esse ensaio foi realizado segundo MOREIRA (1979) com algumas adaptações, as quais constam nas etapas a seguir descritas.

4.1.3.1 Preparo do extrato aquoso a 20%

O extrato aquoso foi obtido pelo método de maceração. Macerou-se cerca de 40 g do material vegetal seco e triturado com 200 mL de água purificada em banho-maria a 70° C por 60 minutos. Após 48 horas o macerado foi filtrado e o volume do extrato completado para 200 mL com água purificada.

4.1.3.2 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

O extrato aquoso foi filtrado com o auxílio de um funil com algodão e transferido para 3 tubos de ensaios médio. Adicionou-se no tubo nº 01, 1 ml de ácido clorídrico concentrado e no tubo nº 02, 1 ml de amônio concentrado. O tubo 03 foi usado como branco para comparação de mudança de coloração. A coloração em meio ácido apresenta tons avermelhados e em meio básico tons azulados, sendo que a mudança de coloração em relação ao tubo padrão indica reação positiva.

4.1.3.3 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Para esse ensaio foram utilizados 3 tubos de ensaio contendo o extrato aquoso. Agitaram-se energicamente os tubos por 5 minutos, medindo em seguida a

espuma formada. Após repouso de 30 minutos, a presença de saponinas é confirmada pela formação de espuma persistente com altura superior a 1 cm.

4.1.3.4 Pesquisa de gomas e mucilagens

Cerca de 5 mL do extrato aquoso foi transferido para um tubo de ensaio juntamente com 3 a 4 gotas da solução de acetato de chumbo. A formação de turvação ou goma confirma a presença de mucilagens e gomas.

4.1.3.5 Pesquisa de taninos

Adicionou-se a 5 mL do extrato aquoso, 5 gotas de cloreto férrico 1%. A formação de um precipitado escuro ou a mudança de coloração para azul, preto ou verde é sugestivo da presença de taninos.

Para a pesquisa de taninos condensados e hidrolisáveis, cerca de 30 mL do extrato aquoso foram transferidos para um balão de fundo chato de 100 mL e nele foram adicionados 6 mL de formaldeído a 37% e 4 mL de ácido clorídrico concentrado. A mistura foi submetida a refluxo por 1 hora. Após seu resfriamento, a solução foi filtrada e o material retido foi lavado com água destilada e álcool.

No material retido foram adicionadas algumas gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%. A formação de coloração verde indica a presença de taninos condensados.

Ao filtrado adicionou-se excesso de acetato de sódio e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. A coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

4.1.3.6 Pesquisa de aminogrupos

Para esse ensaio, 10 mL do extrato aquoso foram concentrados até 5mL. Em uma placa de cromatografia de camada delgada (CCD) construiu-se duas manchas do extrato concentrado. Adicionaram-se algumas gotas do reativo de ninhidrina em uma das manchas e a outra mancha serviu como comparativo para referência. A placa foi mantida na estufa à temperatura de 100° C por 15 minutos. A coloração azul violácea indica presença de aminogrupos.

4.1.3.7 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%

O extrato foi obtido por meio de maceração de cerca de 40 g do material vegetal seco e triturado com 200 mL de álcool etílico a 70%, em banho-maria a 70°C por 60 minutos. Após 48 horas o macerado foi filtrado e o volume do extrato completado para 200 mL com álcool etílico absoluto.

4.1.3.8 Pesquisa de alcalóides

A pesquisa qualitativa de alcalóides foi realizada utilizando os reativos gerais de alcalóides: mercúrio tetraiodeto de potássio (Reativo de Mayer), tetraiodeto bismuto de potássio (Reativo de Dragendorff), ácido sílico túngico (Reativo de Bertrand) e reativo de Bouchardat.

Uma amostra do extrato hidroalcoólico (50 mL) foi levada a secura EM banho-maria a 50° C. O resíduo foi ressuspendido com 1mL de etanol absoluto e 20 mL de ácido clorídrico 1% . Distribuiu-se o filtrado em 5 tubos de ensaio, cada um com 2 ml do extrato e duas a três gotas do reativo específico. Ao quinto tubo não foi adicionado nenhum reativo, o qual foi utilizado como controle negativo.

A amostra foi considerada positiva em relação à presença de alcalóides nos casos em que ocorreu pelo menos uma das seguintes situações com a adição dos reativos:

- Reativo de Mayer: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.
- Reativo de Dragendorff: formação de precipitado de coloração tijolo.
- Reativo de Bouchardat: formação de precipitado de coloração alaranjada.
- Reativo de Bertrand: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

4.1.3.9 Pesquisa de flavonóides

Cerca de 5 mL do extrato hidroalcoólico foram transferidos para 2 tubos de ensaio. Identificou-se o tubo nº 1 como controle e ao tubo nº 2 adicionou-se 2 pedaços de limalha de magnésio e 1 ml de ácido clorídrico concentrado. A formação de um anel de coloração rósea a vermelha indica presença de flavonóides.

4.1.3.10 Pesquisa de cumarinas

Uma amostra de 30 mL do extrato hidroalcoólico foi acidificada com ácido clorídrico concentrado até pH 1,0. Concentrou-se o extrato em banho-maria até o volume de 10 mL. A amostra foi resfriada e transferida para um funil de separação de 250 mL para extração com éter etílico (2x 10 mL). As frações orgânicas foram reunidas e concentradas para 5mL em banho-maria a 70° C. Em um papel filtro foram feitas 3 manchas com cerca de 1cm cada, sendo a mancha nº 01 constituída de uma gota de hidróxido de sódio 1N, a mancha nº 02 com uma gota de extrato orgânico e uma gota de hidróxido de sódio 1N e a mancha nº 03 com uma gota de extrato orgânico e uma gota de hidróxido de sódio 1N, sendo que esta mancha foi coberta por uma moeda. O papel de filtro foi conduzido para dentro da câmara de

UV a 365nm, onde permaneceu por 15 minutos. O desenvolvimento de fluorescência azul, verde-amarelada ou amarela na mancha 02 indica a presença de cumarinas.

4.1.3.11 Pesquisa de antraquinonas

Em balão de fundo chato foram transferidos 20 mL do extrato hidroalcoólico e 3 mL de ácido sulfúrico 10% (v/v). A mistura foi mantida sob refluxo por uma hora. Após o resfriamento, a amostra foi transferida para um funil de separação junto com 30 mL de água destilada para extração com tolueno (3x 10mL). Os extratos toluênicos foram reunidos e concentrados em banho-maria a 70° C até um volume de 10 mL. Posteriormente foi transferido para um tubo de ensaio juntamente com 5 mL de hidróxido de amônio (reação de Borntraeger). A reação é considerada positiva com a formação de coloração vermelha.

4.1.3.12 Pesquisa de esteróis e triterpenos

Cerca de 30 mL do extrato hidroalcoólico foram transferidos para uma cápsula de porcelana e evaporados até *secura* em banho-maria a 70° C. Com o auxílio de um bastão de vidro, dissolveu-se o extrato seco em 5 ml de clorofórmio. Transferiu-se para 3 tubos de ensaio 0,1 ml, 0,5 ml, 1,0 mL do extrato e adicionou-se clorofórmio até volume final de 2mL. Foi realizada a reação de Liberman Bouchard, adicionando a cada tubo 1,0 ml de anidrido acético e 2,0 ml de ácido sulfúrico P.A. lentamente. A formação de coloração azul a verde indica presença de esteróis e triterpenos.

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

O extrato bruto foi obtido a partir da extração da planta seca, estabilizada e moída em aparelho de Soxhlet segundo CARVALHO (2001).

Cerca de 3,75 kg do material vegetal seco e triturado foi acondicionado no suporte do soxhlet (constituído por uma placa porosa e uma camada de algodão para conter o material vegetal). A este aparelho de Soxhlet (Figura 6) foram conectados um condensador e um balão de fundo chato com capacidade de 3 L contendo pérolas de vidro. Adicionou-se álcool etílico 77°GL até aproximadamente 1500 mL. Todo o sistema foi levado ao aquecimento a temperatura de 75° C em manta aquecedora e deixado em refluxo por 12 horas, de modo que o extrato alcoólico foi obtido por extração em meio solvatado (CARVALHO, 2008).



FIGURA 6 - APARELHO DE SOXHLET
FONTE: A autora (2009)

O extrato obtido recebe a denominação de extrato bruto. A partir deste extrato realizou-se a obtenção das frações por partição sólido-líquido com solventes de diferentes polaridades.

4.2.1 Análises físico-químicas

4.2.1.1 Determinação do teor de sólidos

Realizou-se a análise do teor de sólidos de acordo com o preconizado na Farmacopéia Brasileira IV. Mediu-se 10 mL do extrato bruto e este foi transferido

para uma placa de petri previamente dessecada e pesada. Acondicionou-se a placa em estufa a 105° C até peso constante. A diferença entre o peso da placa com o resíduo do extrato e a placa vazia fornece o teor de sólidos em 10 mL do extrato.

4.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO

As frações foram obtidas pelo método de partição sólido-líquido a partir do extrato bruto de arnica. Neste método, realizou-se a extração do extrato utilizando solventes de diferentes polaridades na seguinte ordem: n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e álcool etílico. Todos os solventes utilizados foram de padrão analítico (PA).

4.3.1 Sistema de partição sólido-líquido

Incorporou-se 1L do extrato bruto em 200g de sílica gel 60- Merck, em estufa a 45° C, formando a pastilha do extrato bruto. Transferiu-se essa pastilha para um cartucho de vidro, sendo que na extremidade inferior foi adicionada sílica gel e na extremidade superior chumaço de algodão. Acoplou-se o cartucho de vidro a um aparelho de soxhlet, o qual foi conectado a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato de capacidade de 150 mL, com pérolas de vidro (Figura 7). Todo o sistema foi submetido ao aquecimento em manta aquecedora a temperatura de 75° e deixado sob refluxo por cerca de 6 horas. Após a partição com álcool etílico, realizou-se uma extração com solução de ácido acético em etanol 77° GL, para a retirada dos possíveis constituintes fenólicos que ainda possam ter permanecidos retidos na sílica. Em cada fração foi determinado o teor de sólidos, conforme descrito no item 4.2.1.1.



FIGURA 7 - SISTEMA DE PARTIÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO

FONTE: A autora (2009)

NOTA: A – Sistema de partição sólido líquido; B – Cartucho de vidro contendo sílica gel, pastilha do extrato bruto e algodão

4.3.2 Análise em cromatografia líquida de alta resolução (CLAE)

A composição fitoquímica da droga vegetal, das frações e do extrato bruto foram analisadas por uma metodologia desenvolvida utilizando aparelho Merck-Hitachi composto de bomba L7100, degaseificador de solventes L7812, injetor automático L-7200, detector DAD L7455, interface L7000 conectada ao sistema operacional Windows Professional e uma coluna Phenomenex Gemini C-18 250 x 4,6 mm (5 μ m) à temperatura de 35°C. O detector de arranjos de diodos (DAD) foi configurado para realizar a varredura de 200 a 400 nm e a integrar o cromatograma a 346 nm. O volume de injeção foi de 40 μ l. As condições cromatográficas utilizadas estão demonstradas no Quadro 3. Utilizou-se como fase móvel a fase ácida (FA) composta por solução aquosa de ácido sulfúrico 0,01 M e ácido fosfórico 0,4%; fase ácida concentrada (FAC) - solução aquosa de ácido sulfúrico 0,05 M e ácido fosfórico 2% - e metanol na proporção 95:5; e fase ácida concentrada e acetonitrila na proporção de 90:10.

Tempo (min)	FA (%)	FAC:MEOH 95:5 (%)	FAC:ACN 90:10 (%)	Fluxo (mL/min)
0,0	94	3	3	1,0
5,0	94	3	3	1,0
8,0	78	19	3	1,0
15	60	37	3	1,0
35	35	62	3	1,0
45	35	62	3	1,0
46	20	77	3	1,0
52	20	77	3	1,0
53	94	3	3	1,0
57	94	3	3	1,0

QUADRO 3 –CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DO FINGERPRINT DA ESPÉCIE VEGETAL *S. microglossa*

NOTA: FA: Fase ácida, composta por solução aquosa de ácido sulfúrico 0,01 M e ácido fosfórico 0,4%; FAC: Fase ácida concentrada, constituída por solução aquosa de ácido sulfúrico 0,05 M e ácido fosfórico 2%; MEOH: Metanol; ACN: Acetonitrila.

O preparo das amostras de extrato bruto e das frações de *S. microglossa*, constituíram apenas na diluição das amostras em níveis de concentração compatíveis com a linearidade do método. As diluições foram realizadas utilizando a fase diluente (solução composta por fase ácida concentrada:metanol na proporção de 1:2 v/v), . Para a matéria-prima vegetal realizou-se uma extração utilizando álcool 75° GL como líquido extrator, em aparelho de soxhlet. O extrato obtido por esse processo foi diluído com fase diluente até a proporção de 1:120. Todas as amostras foram filtradas através de filtro de seringa de PVDF (11 mm, 0.45 µm, Millipore Millex) antes das injeções no cromatógrafo líquido.

4.4 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS

Realizou-se o isolamento dos compostos por meio da cromatografia em coluna. Incorporou-se cada fração (hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica) a Sílica-gel 60 (Art. 7734), para a formação da pastilha de sílica. Esta

pastilha foi submetida à cromatografia em coluna, onde a eluição da amostra é realizada pela passagem de solventes com gradientes de polaridades crescentes. Realizou-se o controle de eluição com lâmpada de luz UV à 360 nm. As características das frações recolhidas foram observadas por cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplasmas de Sílica-gel 60 F254 Merck® e visualizadas com lâmpada UV no comprimento de onda de 360 nm.

4.4.1 Elucidação estrutural

Submeteu-se a substância isolada às análises espectrométricas para elucidação de sua estrutura. Realizaram-se as seguintes análises: espectroscopia de absorção no ultravioleta, espectroscopia de ressonância nuclear magnética de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas.

Para a análise de RMN de ^{13}C e ^1H utilizou-se espectrofotômetro Bruker® modelo DPX 200 MHz, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C a 200,13 e 50,62 MHz, respectivamente. Utilizou-se solvente deuterado e TMS como padrão interno de referência. Este equipamento pertence ao Laboratório de RMN do Departamento de Química, da Universidade Federal do Paraná.

Para a análise do íon molecular da substância isolada, utilizou-se um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, da Applied Biosystems modelo API 3200 equipado com bomba de infusão Havard 22 Apparatus e fonte de ionização por eletrospray (ESI). Os dados obtidos através de infusão direta no Espectrômetro de Massas foram processados através do software Analyst, versão 1.4.2. A checagem do sinal dos analitos foi realizada através de análise por injeção direta, onde as amostras foram infundidas através de seringa (Hamilton, Reno, NV, USA) em fluxo constante de $10\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$. A fonte ESI operou no modo negativo de ionização. As condições de análise para verificação do íon molecular foram: *ion spray voltage* -4500,00; *curtain gas* (CUR) 10; *ion source gas* (GS1) 10; *declustering potential* (DP) -40; *entrance potential* (EP) -5. O equipamento estava programado para realizar varredura em Q1 de 400 a 500 Da. As amostras foram

diluídas em acetonitrila/água 70:30 v/v (5 mM de formiato de amônio) até concentração de 200 ng.mL⁻¹ de quercitrina. Uma vez determinado o íon molecular do composto, foi realizada a análise de fragmentação deste sinal. O equipamento foi configurado para analisar os produtos do íon molecular, realizando uma varredura de 100 a 450 Da, sob as seguintes condições: *declustering potential* (DP) -40; *entrance potential* (EP) -5; *collision energy* (CE) -45; *collision cell exit potencial* (CXP) -5.

4.5 DESENVOLVIMENTO DE ANÁLISE PARA QUANTIFICAÇÃO EM CLAE

O marcador selecionado para esta droga vegetal foi a quercitrina (quercetina-3-ramnosídica), visto que este flavonóide possui propriedades antiinflamatórias cientificamente comprovadas (MEDINA *et al.*, 2002; CAMUESCO *et al.*, 2004; COMALADA *et al.*, 2005). Fato este, que pode justificar o uso popular desta espécie vegetal (ROQUE *et al.*, 1988). A atividade antiinflamatória da quercitrina parece estar envolvida sobre os mediadores pró-inflamatórios, incluindo o óxido nítrico (CAMUESCO, 2004). Além disso, a substância quercitrina está presente em grandes quantidades nesta espécie.

Realizou-se o desenvolvimento e a validação da metodologia em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Agilent series 1200, bomba quaternária G1311A, degaseificador G1379B, injetor automático G1329A e detector de fotodiodo (G1315D). Os dados foram processados através do software ChemStation versão B.04.01.

O detector de arranjos de diodos (DAD) foi configurado para realizar varredura na região de 200 a 400 nm, com a finalidade de verificação do perfil espectral do composto quercitrina para determinação do comprimento de onda com intensidade e seletividade adequada para sua quantificação em CLAE-DAD.

Para o desenvolvimento do método escolheu-se a coluna Zorbax Bonus RP (100 x 3,0 mm, 3,5 µm de partícula). Trata-se de uma coluna de alta resolução, com grupos diisopropil-C14 ligados covalentemente por ligações amidas a sílica

ultrapura. Esta composição de fase estacionária elimina ou reduz a forte interação de compostos básicos ou altamente polares pelo suporte de sílica.

O melhor perfil cromatográfico, a resolução entre picos de interesse e o tempo de corrida devem ser fatores determinantes para a escolha da fase móvel. Para isso foram avaliadas as diferentes combinações de soluções aquosas com solventes orgânicos para compor a fase móvel. Testou-se soluções de ácido fórmico e acetonitrila. Essas fases móveis foram eluídas em diferentes proporções na forma isocrática e gradiente. Concomitantes ao desenvolvimento da fase móvel, foram alterados os parâmetros de fluxo e temperatura do forno. As alterações nestes parâmetros foram analisadas e a influência nos resultados avaliadas para obtenção das melhores condições.

Para o desenvolvimento e validação do método utilizou-se o padrão de quercetina-3-ramnosídica hidratada (lote10334/08), do fabricante Sigma (lote do fornecedor 087K1159), com pureza de 94%. Para obtenção das soluções em estoque o padrão de quercitrina foi quantitativamente pesado e em seguida, dissolvido em metanol de modo a se obter uma solução de concentração de $1,0\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de quercitrina. As demais soluções padrões foram obtidas a partir da diluição das soluções estoques de acordo com a necessidade de cada experimento. Todas as soluções foram obtidas utilizando como diluente acetonitrila/água na proporção de 70:30 (v/v), sendo estas filtradas através de filtro de seringa de PVDF (11 mm, 0,45 μm de poro, Millipore Millex) antes das injeções.

O preparo das amostras de extrato bruto e das frações de *S. microglossa*, constituíram apenas na diluição das amostras em níveis de concentração compatíveis com a linearidade do método. As diluições foram realizadas através de uma solução diluente composta por uma mistura de acetonitrila/água nas proporções de 70:30 v/v. Para a matéria-prima vegetal realizou-se uma extração utilizando álcool 75° GL como líquido extrator, em aparelho de soxhlet. O extrato obtido por esse processo foi diluído com mistura acetonitrila/água nas proporções de 70:30(v/v). Todas as amostras derivadas de *Solidago microglossa* analisadas foram filtradas através de filtro de seringa de PVDF (11 mm, 0.45 μm , Millipore Millex) antes das injeções no cromatógrafo líquido.

Após o desenvolvimento do método, o teste de conformidade do sistema (sigla em inglês SST) foi avaliado de acordo com a Farmacopéia Americana 31ª edição. Este teste é utilizado para verificar sensibilidade do detector, resolução dos

analitos e reprodutibilidade do sistema (USP, 2008). Os critérios a serem monitorados dentro de uma corrida analítica, para cada analito são: Fator caudal (T) igual ou inferior a 2, Fator de retenção (K') maior que 2, Resolução (RS) superior 2 entre o pico do analito e interferente mais próximo, Desvio padrão relativo menor que 2% (para $n=5$) e Número de pratos teóricos (N) maior que 2000 (USP, 2008). Normalmente, utilizam-se dois ou mais desses parâmetros para garantir a conformidade da corrida analítica (RIBANI *et al.*, 2004). No entanto, uma resolução de pelo menos 1,5 garante a separação completa entre dois compostos.

4.5.1 Validação da metodologia por CLAE

A validação da metodologia foi realizada de acordo com o preconizado pelo Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, publicado através da resolução RE nº 899/03. As análises de quantificação do marcador possuem como finalidade a determinação quantitativa do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas, sendo classificada na categoria I conforme resolução supracitada. Esta categoria exige os seguintes ensaios: seletividade, linearidade, intervalo, precisão por repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez.

4.5.1.1 Seletividade

A análise da seletividade foi realizada a fim de verificar se a metodologia desenvolvida é capaz de distinguir (resolver) o analito dos outros compostos da matriz sem prejuízos na sua quantificação.

Devido à complexidade da matriz a ser analisada, a seletividade foi avaliada por dois métodos distintos: por meio do uso do detector de arranjo de diodo (DAD) e pelo método da adição do padrão.

O primeiro método utilizado para avaliar a seletividade foi através do uso do detector de arranjo de diodo. Realizaram-se varreduras no ultravioleta (200 a 400 nm) para obtenção das bandas de absorção da substância de interesse. Deste modo realizou-se a comparação espectral do padrão primário e do pico correspondente na amostra. Não sendo verificada diferença entre as bandas de absorção, considerou-se que o pico cromatográfico estava puro, sendo, portanto, o método seletivo para tal analito. Verificou-se também, a pureza do pico cromatográfico do analito de interesse na amostra através da ferramenta Purity do software ChemStation (Agilent).

O método da adição do padrão foi determinado através da comparação de duas curvas analíticas, sendo uma obtida através de soluções padrão, e outra obtida através de uma amostra fortificada com padrões analíticos. Neste método, soluções padrão de quercitrina foram preparadas em triplicata nos seguintes níveis de concentração (20, 50 e 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Em seguida, amostras de extrato bruto de arnica foram diluídas na proporção de 1:300 (v/v) e fortificadas nos mesmos níveis de concentração das soluções padrão. As amostras fortificadas e as soluções padrão foram injetadas no CLAE sendo as áreas obtidas submetidas à análise de regressão linear. A seletividade foi avaliada comparando-se os coeficientes angulares obtidos entre as duas curvas analíticas. Os coeficientes angulares das duas retas não podem possuir um DPR maior que 5%.

4.5.1.2 Linearidade e Intervalo

A linearidade foi determinada pela construção e análise de 3 curvas de calibração contemplando oito concentrações diferentes do analito a ser doseado. Soluções padrão de quercitrina na concentração de 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram preparadas e diluídas em triplicatas, utilizando como diluente solução de acetonitrila:água na proporção 70:30, conforme apresentado na Tabela 1.

TABELA 1 - ESQUEMA DE DILUIÇÃO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE QUERCETRINA PARA O ENSAIO DE LINEARIDADE

Soluções de quercetina-3-ramnosídica								
Sol. de quercetina-3-ramnosídica em metanol 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (μL)	50	100	150	200	250	300	400	500
Acetonitrila:Água 70:30 qsp (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
Concentração final ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	10	20	30	40	50	60	80	100

Os valores médios encontrados foram plotados em um gráfico da concentração da amostra (eixo x) pela resposta do detector (eixo y) para verificar a linearidade do método nas concentrações testadas. Essa verificação ocorreu por tratamentos estatísticos: coeficiente de correlação, interseção no eixo y, coeficiente angular e soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear. Nesse ensaio, o método deve obrigatoriamente apresentar valor de coeficiente de correlação (r^2), igual ou maior que 0,98 (BRASIL, 2003). O coeficiente de correlação fornece uma estimativa da qualidade da curva, pois quanto mais próximo do valor um, menor é a dispersão dos resultados e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004). O intervalo de trabalho foi definido através dos níveis mínimos e máximos de concentração onde foi possível determinar as substâncias de interesse com melhor precisão e exatidão.

4.5.1.3 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intracorrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrída).

A repetibilidade foi determinada utilizando amostra do extrato bruto de arnica diluídos em acetonitrila/água na proporção 70:30 (v/v) nas concentrações de 20, 50 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em triplicata. As amostras foram preparadas em um mesmo dia, pelo mesmo analista. Como forma de avaliar os resultados, o desvio padrão relativo

(DPR) foi aplicado para verificar a dispersão dos resultados entre as corridas analíticas.

A precisão intermediária foi determinada por um segundo analista, nos mesmos níveis de concentração da repetibilidade, porém dois dias após este ensaio. O mesmo tratamento matemático da repetibilidade foi utilizado na comparação entre as áreas obtidas pelos dois analistas.

4.5.1.4 Exatidão

A exatidão foi analisada através do método de adição do padrão. Foram analisadas nove determinações contemplando o intervalo linear. A exatidão foi determinada utilizando extrato bruto de Arnica diluídos em acetonitrila/água (70:30 v/v) na proporção de 1:300 e fortificados com padrão de quercitrina de concentração $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ conforme Tabela 2.

TABELA 2 – PREPARO DAS AMOSTRAS DO EXTRATO BRUTO DE ARNICA PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO

	Conc 1	Conc 2	Conc 3
Extrato bruto de <i>S. microglossa</i> 1:300 (μL)	150	150	150
Padrão Quercitrina $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (μL)	150	450	850
Acetonitrila:Água (70:30) (μL)	700	400	-

A exatidão dos métodos foi determinada através da porcentagem de erro relativo entre as concentrações teóricas e as experimentais de cada analito. A porcentagem de recuperação foi calculada através da equação:

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

4.5.1.5 Robustez

Robustez é a capacidade que um método tem em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Durante a validação do método o doseamento de quercitrina foi avaliado em função de algumas mudanças, como fluxo ($\pm 0,05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), temperatura do forno da coluna (variação de $\pm 2^\circ\text{C}$), composição da fase móvel (concentração da solução de ácido fórmico foi variada para 0,4 e 0,6%) e a estabilidade das soluções após 24 horas de preparo.

4.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1 Formação do complexo fosfomolibdênico

A avaliação da atividade antioxidante total descrita por PRIETO, PINEDA e AGUILAR (1999) é uma técnica simples, barata e possui como vantagem a determinação da capacidade antioxidante de compostos lipofílicos e hidrofílicos em misturas complexas de compostos.

O complexo de fosfomolibdênio é preparado através da adição de uma solução de fosfato de sódio 0,1M (28 mL), molibdato de amônio 0,03M (12 mL) e ácido sulfúrico 3M (20 mL), completando com água para 100 mL. Essa solução possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que se reduz (PRIETO, PINEDA, AGUILAR, 1999). Esse reativo é preparado somente no momento do uso. Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como as amostras a serem testadas (extrato bruto e frações), foram preparadas na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol (BIANCO, 2003).

Em um tubo de ensaio, foram adicionados uma alíquota de 0,3 mL da amostra e 3 mL de reativo. O mesmo procedimento foi realizado para os padrões e para um branco, o qual era composto por 0,3 mL de metanol e 3 mL de reativo. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria a 95°C por 90 minutos. A análise

foi realizada em triplicata, com os tubos hermeticamente fechados. Após o resfriamento dos tubos, foi feita a leitura das absorbâncias (Abs) em 695 nm. Os resultados foram expressos em atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e rutina, conforme as equações a seguir.

$$\text{AAR\% EM RELAÇÃO À VITAMINA C} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs}_{(\text{vitamina C})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}} \times 100$$

$$\text{AAR\% EM RELAÇÃO À RUTINA} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs}_{(\text{rutina})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}} \times 100$$

4.6.2 Redução do radical de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina)

De acordo com Silva (1999), a avaliação da capacidade antioxidante quantitativa tem como base a redução do radical DPPH medida em espectrofotometria de UV/visível. Para este ensaio foi utilizado o extrato bruto e as frações.

O radical DPPH livre é estável, de coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela (Figura 8). Com isso, pode ser facilmente detectado por espectroscopia devido a sua intensa absorção na região visível (LIMA,2010).

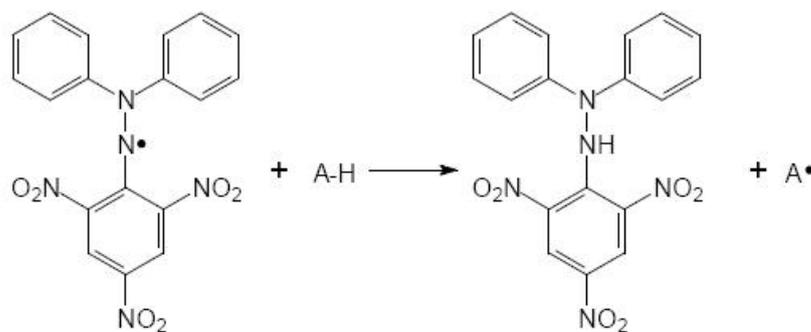


FIGURA 8 - REAÇÃO DO DPPH COM ESPÉCIES ANTIOXIDANTES
 FONTE: LIMA (2010)

A molécula 2,2-difenil-1-picrilhidrazina é um radical livre e estável, devido à localização do elétron desemparelhado no centro de sua estrutura, não permitindo desta forma que esta molécula dimerize, o que normalmente ocorre com os demais radicais livres. Apresenta uma cor violeta intensa e, quando em solução pode entrar em contato com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, passando desta forma para a sua forma reduzida, perdendo a coloração violeta e se tornando amarelo pálido (MOLYNEUX, 2004).

A solução de DPPH foi preparada no momento de sua utilização na concentração de 0,3 mmol/mL. Cinco concentrações diferentes de cada amostra foram analisadas e interpoladas em gráfico para determinação da equação da reta. Em tubo de ensaio foram adicionados 2,5mL de cada concentração a ser analisada e 1 mL da solução de DPPH. O branco da reação constituiu da adição de 2,5 mL de cada amostra com 1mL de solvente. E o controle correspondeu a 2,5 mL solvente com 1mL de solução de DPPH. Os tubos foram mantidos a temperatura de 25° C por 30 minutos. Esta análise foi realizada em triplicata.

O controle positivo da reação foi realizado pela análise da vitamina C e da rutina. Para estas substâncias foram construídas curvas contemplando as concentrações 3 a 12 µg/mL.

A porcentagem da atividade antioxidante (AA%) foi medida através da fórmula abaixo:

$$AA\% = \frac{100 - (Abs\ amostra - Abs\ branco)}{Abs\ controle\ positivo}$$

Os valores da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (IC50) apresentada pelos controles positivos (Vitamina C e rutina) são calculados no gráfico onde a abscissa representa a concentração da amostra da fração e a ordenada é a média da AA% das 3 amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico, do tipo $y = ax + b$, serve de base para determinação do valor de IC50. Para verificar a diferença estatística entre as amostras aplicou-se o teste ANOVA (análise de variância) e para localização das diferenças o teste de Tukey, os quais foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4.7 ENSAIO *In Vitro* DA ATIVIDADE DA ENZIMA TIROSINASE

Trata-se de um teste padronizado de reguladores de pigmentação, onde possíveis compostos reguladores são inicialmente rastreados usando tirosinase purificada, a fim de testar se são capazes de inibir ou promover a melanogênese. A metodologia utilizada foi baseada no método descrito por Miyazawa e colaboradores (2003).

A tirosinase é um polifenol oxidase, sendo um heterotetrâmero constituído por 2 cadeias leves e 2 cadeias pesadas, os quais, por sua vez, formam 3 domínios. Quando age na L-tirosina, promove sua hidroxilação, produzindo L-DOPA; quando age na DOPA, apresenta atividade de dopa oxidase, formando dopaquinona. A dopaquinona, numa sequência de outras reações forma dopacromo, que pode ser lido a 492 nm no espectrofotômetro (SILVEIRA, 2007).

O extrato bruto de *Solidago microglossa* (10 μ L) foi testado em várias concentrações 100, 300, 1000 μ g.mL⁻¹ frente à 20 μ L enzima tirosinase (500U.mL⁻¹), em microplaca de 96 poços. Adicionou-se a cada poço 170 μ L de L-tirosina 1mM, tampão fosfato de potássio 50mM (pH = 6,5) e água destilada (10:10:9). A microplaca foi incubada a 37°C por 30 minutos. A quantidade de dopacromo proveniente da reação com a amostra foi determinada baseada na densidade óptica a 490nm usando espectrofotômetro. O efeito frente à atividade da tirosinase é calculado em função da taxa de absorbância versus poço controle sem o composto ativo (VIRADOR *et al.*, 1999). Como controle positivo (inibidor da tirosinase) foi usado 10 μ L ácido kójico 1mM e controle negativo 10 μ L de água destilada. Todas as reações foram feitas em triplicata. A avaliação dos resultados foi realizada pelo teste estatístico ANOVA (análise de variância entre os grupos), seguidos por teste de Newman-Kewls. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e foram representados nos gráficos dos resultados da seguinte forma: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***), de acordo com o nível de significância.

4.8 TESTE DE LETALIDADE PARA OS NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, conforme descrito por Meyer *et al.* (1982), é um ensaio biológico rápido, de baixo custo, não requer ambiente asséptico, utiliza um grande número de organismos para validação estatística, não requer equipamentos especiais e a quantidade de amostra requerida é relativamente pequena (2-20mg) (MEYER *et al.*, 1982; KALEGARI, 2009).

4.8.1 Preparo da solução salina

Para obtenção das larvas de *Artemia salina* foi realizado a incubação dos ovos deste microcrustáceo em água salgada. A água do mar artificial foi preparada pela adição de 41 g de sal marinho (23 g NaCl; 11 g MgCl₂·6H₂O; 4 g Na₂SO₄; 1,3 g CaCl₂·2H₂O ou CaCl₂·6H₂O; 0,7 g KCl) em 1000 mL de água purificada.

O pH foi ajustado para 9,0 com bicarbonato de sódio, a fim de evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação. Segundo LEWAN *et al.* (1992), um pH superior a 6 é essencial para o desenvolvimento de *Artemia salina*, e um pH superior a 10,5 deve ser evitado.

4.8.2 Eclosão dos ovos

O estímulo da eclosão dos ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foi realizado através da sua incubação em água salgada por 48 horas, sob aeração contínua e exposição à luz diurna. A temperatura foi controlada entre 27 e 30°C e o pH entre 8-9. Na primeira hora do processo foi mantida a iluminação (20W) sobre o recipiente (UTYAMA, 2003).

4.8.3 Preparo das amostras

O estudo foi realizado para o extrato bruto e suas frações.

Uma solução de concentração de 10 mg/mL foi preparada para cada amostra analisada em solvente apropriado (solução 1). A partir desta solução, preparou-se a solução 2 pela diluição de 1 mL da solução 1 em 9 mL de solvente (de acordo com a solubilidade de cada amostra). Em três tubos de ensaio foram transferidas as seguintes tomadas de amostras: para o tubo 1 adicionou-se 250 µL da solução 1, no tubo 2 adicionou-se 25 µL da solução 1 e para o tubo 3 adicionou-se 25 µL da solução 2. Realizou-se esse procedimento em triplicata.

O controle negativo desta metodologia foi preparado pela adição do solvente e salina em um tubo de ensaio. E para o controle positivo foi utilizado uma solução de sulfato de quinidina.

Os tubos foram mantidos em estufa por 24 horas para evaporação completa do solvente.

4.8.4 Avaliação da toxicidade

Foram transferidas 10 náuplios de *Artemia salina* para cada tubo de ensaio contendo o extrato bruto ou as frações secas e para os tubos controles. O volume de todos os tubos foi ajustado com água do mar artificial para 2,5 mL.

Após 24 horas realizou-se a contagem dos náuplios mortos e vivos com auxílio de lupa e iluminação incandescente.

Os dados foram submetidos à análise pelo método estatístico Probitos e determinados os valores de LC50 e 95% de intervalo de confiança. As frações foram consideradas tóxicas quando LC50 foi menor que 1000 µg.mL⁻¹ (MEYER *et al.*, 1982).

4.9 TOXICIDADE ORAL AGUDA EM RATOS

O protocolo experimental para avaliação da toxicidade oral aguda foi realizado conforme preconizado na Resolução nº 90 de 16 de março de 2004 e de acordo com as recomendações feitas pela Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 1996). O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética CEUA nº 534 – 1ª versão da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

4.9.1 Preparo das amostras

O ensaio foi realizado com o extrato bruto liofilizado de *Solidago microglossa*, com teor de 106,8 mg/g de quercitrina. Para administração aos animais o extrato foi ressuspendido em água purificada.

4.9.2 Animais a serem utilizados

Foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus*) variedade Wistar, adultos jovens, machos e fêmeas, pesando entre 220 a 350g, provenientes do Biotério da PUC-PR.

4.9.3 Teste toxicidade oral aguda

Trinta e cinco ratos de cada sexo (machos e fêmeas) foram pesados, identificados e divididos em 3 grupos, cada um contendo 10 animais, sendo cinco animais utilizados como controle. Os animais foram submetidos a jejum de sólidos com água *ad libitum*, durante 13 horas (10 horas anteriores e 3 horas posteriores ao

tratamento), conforme recomendado pela Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (CAVALCANTE, 2002).

O extrato bruto foi administrado via oral através da técnica de gavagem, nas doses de 50, 300 e 2000 mg.kg⁻¹ (Figura 9). Nos animais do grupo controle foram administradas doses isovolumétricas do veículo (água) pela mesma via. No dia da administração, os animais foram observados quanto à aparência geral e a presença ou não de sinais de toxicidade, tais como alterações respiratórias, digestivas, de locomoção e neurológicas (incluindo náusea, vômito, diarreia, tremor e convulsão) por no mínimo duas vezes. Nos dias posteriores foram observados uma vez ao dia.

No biotério, os ratos permaneceram em gaiolas, contendo 5 ratos cada, mantidos sob condições monitoradas de temperatura (20° C ± 2), com livre acesso a uma dieta hiperproteica (ração padrão comercial Nuvital[®]) e água. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas. Uma dieta adequada é necessária para a manutenção do estado fisiológico dos animais, deste modo é garantido que uma resposta inadequada durante o estudo seja causada pelo efeito da droga testada, e não proveniente de deficientes condições nutricionais.



FIGURA 9 - ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO DE ARNICA PELO MÉTODO DE GAVAGEM
FONTE: A autora (2010)

Os ratos foram pesados antes da administração do extrato e todos os dias até o final dos 14 dias de observação. Um acompanhamento diário da quantidade de ração e água consumida também foi realizado. A variação de peso nos grupos durante o estudo foi determinada conforme a equação a seguir:

$$\text{Variação de peso (\%)} = (\text{Peso no 14}^{\text{o}} \text{ dia} - \text{Peso inicial}) \times 100 / \text{Peso inicial}$$

Ao término das duas semanas, os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg) e xylasina (16 mg/kg), e foi feita a coleta de sangue, para

realização do hemograma e da determinação dos parâmetros bioquímicos que incluíram: colesterol total, triglicerídeos, HDL, uréia, proteínas totais, glicose, ALT, AST e fosfatase alcalina, utilizando kits comerciais e seguindo as instruções do fabricante. Para os testes bioquímicos o sangue foi coletado em tubo com EDTA, sendo o plasma obtido a partir da centrifugação a 3000 rpm das amostras de sangue por 10 minutos. Estas amostras foram pipetadas, armazenadas em tubos eppendorf e mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a execução das análises.

Os animais foram posteriormente eutanasiados utilizando novamente ketamina e xylasina, porém com uma dose 3 vezes superior a dose anestésica (300 mg/kg e 48 mg/kg, respectivamente), para remoção do estômago, fígado e rins para avaliação histológica.

4.9.4 Hemograma

O sangue total coletado dos animais foi diluído com solução salina para serem analisados no equipamento ABX MICRO60, marca Sillab. Os seguintes parâmetros foram determinados: glóbulos vermelhos (RBC), dosagem de hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), coeficiente de variação do volume de glóbulos vermelhos (RDW), leucócitos (WBC), contagem de plaquetas (PLT), plaquetócrito (PCT), volume plaquetário médio (MPV) e coeficiente de variação do volume plaquetário médio (PDW).

4.9.5 Provas Bioquímicas

Foram determinados os seguintes parâmetros bioquímicos: colesterol total, triglicerídeos, HDL, proteínas totais, uréia, glicose, transaminases e fosfatase alcalina, em aparelho automatizado Cobas e utilizando kits comerciais.

4.9.6 Avaliação histopatológica

Para a realização das análises histológicas, os órgãos retirados (estômago, fígado e rins) foram fixados em formalina 10% e as lâminas histológicas foram confeccionadas no Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR. A visualização e análise das células foram feitas através de microscopia óptica, utilizando-se os corantes hematoxilina-eosina. As lâminas dos grupos testes foram comparadas as do grupo controle.

4.9.7 Análise estatística

A significância estatística para os resultados com distribuição normal e variâncias semelhantes foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Tukey*, quando diferenças entre os grupos eram detectadas. Os parâmetros cujos grupos não apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

Os resultados dos testes de umidade, cinzas totais e insolúveis em ácido estão dispostos na Tabela 3.

TABELA 3 – RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS COM A MATÉRIA-PRIMA

Teor de Umidade (%)	Determinação de cinzas totais (%)	Determinação de cinzas insolúveis em ácido
6,77%	6,831 %	0,03%

Estas análises físico-químicas foram realizadas com o intuito de auxiliar na determinação dos parâmetros de qualidade para esta droga vegetal.

A análise de prospecção fitoquímica atua como guia para a caracterização desta espécie, pois informa os principais grupos do metabolismo vegetal presentes na amostra. Os resultados desta análise, realizada para a matéria-prima vegetal, estão demonstrados na Tabela 4.

TABELA 4 – RESULTADOS DA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DA PLANTA *S. microglossa*

Análises	Extrato Aquoso	Extrato Hidroalcoólico
Alcalóides		-
Aminogrupos	+	
Antraquinonas		+
Antocianos	-	
Saponinas	+	
Mucilagem	+	
Taninos	+	
Flavonóides		+
Triterpenos		+
Cumarinas		+

NOTA: + = positivo; - = negativo

Através da análise dos resultados supracitados, conclui-se que a espécie *Solidago microglossa* possui os seguintes grupos fitoquímicos: aminogrupos, antraquinonas, saponinas, mucilagem, taninos, flavonóides, triterpenos e cumarinas. Os resultados obtidos corroboram com os resultados apresentados em literatura para esta espécie vegetal (CHICOUREL *et al*, 1997, BAGATINI, 2008).

5.2 ANÁLISES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

Foi utilizado o método de extração por soxhlet à quente para obtenção do extrato bruto. Os resultados do rendimento de extração e teor de sólidos estão dispostos na Tabela 5.

TABELA 5 – DADOS REFERENTES À OBTENÇÃO E AS ANÁLISES DO EXTRATO BRUTO DE *S. microglossa* OBTIDO POR EXTRAÇÃO EM SOXHLET COM ETANOL 77° GL

Obtenção e análises físico-químicas do Extrato bruto	
Quantidade de MP utilizada	3,75 kg
Volume de extrato produzido	5 L
Teor de sólidos do extrato bruto	12,65 g%
Total de sólidos extraídos	632,5 g
Rendimento extração em relação a MP seca	18,09%

NOTA: MP- Matéria-prima

5.2.1 Obtenção e análises das frações

5.2.1.1 Obtenção das frações

A partição sólido-líquido foi realizada utilizando 815,5 mL do extrato bruto, o que corresponde a 611,7 g de matéria-prima vegetal. As frações foram obtidas através de extrações consecutivas com solventes de diferentes polaridades

conforme descrito no item 4.3. O teor de sólidos encontrado para cada fração está representado na Tabela 6.

Para realizar a comparação das frações, calculou-se o rendimento das extrações (teor de sólidos obtidos nas frações/quantidade de matéria-prima utilizada). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6.

TABELA 6 – PARTIÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO

Partição sólido-líquido			
Quantidade utilizada de Extrato bruto = 815,5 mL, equivalente a 611,7 g de matéria-prima vegetal			
	Volume obtido (mL)	Teor de sólidos (g%)	Rendimento* (mg/g)
Fração Hexânica	800	1,09	14,21
Fração Clorofórmio	800	0,48	6,22
Fração Acetato de Etila	875	1,33	19,02
Fração Hidroalcoólica	900	6,86	100,91
Fração Ácido acético em etanol 77° GL	585	3,55	33,946

*NOTA: Rendimento das frações obtidas em relação à quantidade de matéria-prima utilizada

A fração que demonstrou o maior rendimento em relação ao teor de sólidos totais foi à fração hidroalcoólica, seguida pelas frações ácido acético em etanol, acetato de etila, hexânica e clorofórmio. Esses resultados indicam que esta espécie é composta predominantemente por substâncias polares.

5.2.1.2 Análise da matéria-prima, extrato bruto e frações por CLAE

Com posse da informação de que a espécie analisada é composta principalmente por substâncias polares, decidiu-se desenvolver um método em CLAE para visualização de seus principais componentes. O objetivo deste método foi determinar o *fingerprint* (caracterização fitoquímica) desta espécie vegetal, para que em futuras pesquisas esta possa ser utilizada como uma ferramenta de auxílio

em análises de qualidade e de identificação botânica. As condições desenvolvidas para essa análise estão descritas no item 4.3.2.

A análise foi realizada utilizando as partes aéreas da matéria-prima *Solidago microglossa*, extraída em soxhlet, utilizando álcool 75° GL como líquido extrator a temperatura de 75° C, durante um período de 4 horas. O cromatograma obtido está disposto na Figura 10.

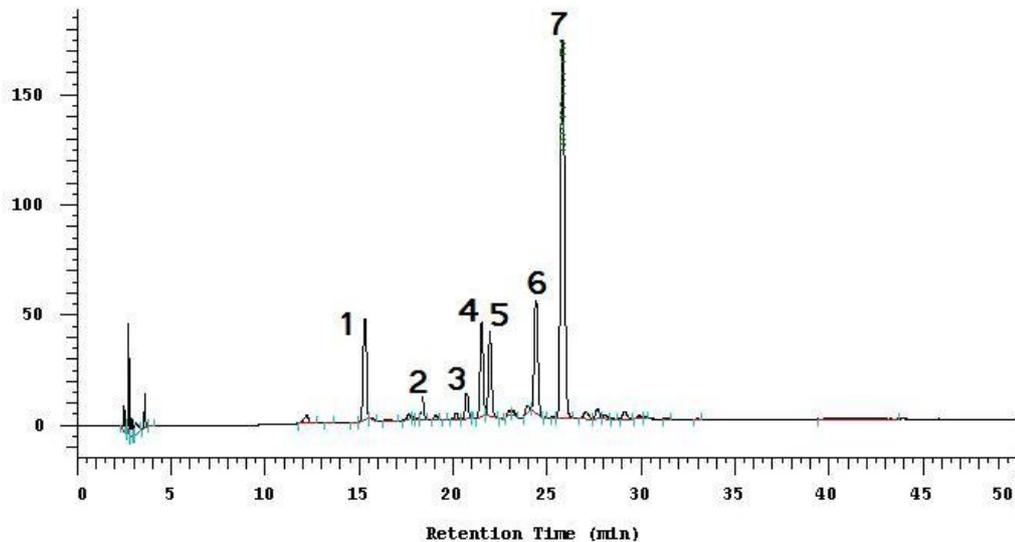


FIGURA 10 - CROMATOGRAMA REFERENTE À CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DAS PARTES AÉREAS DA ESPÉCIE VEGETAL *Solidago microglossa*

NOTA: Condições de análise: Fase móvel: A: FA, B: Solução FAC:MEOH 95:5 v/v, C: FAC:ACN 90:10 v/v; Temperatura de forno: 35°C; Volume de injeção: 40 µl; Coluna: Phenomenex Gemini C-18 250 x 4,6 mm (5µm). FA – Fase ácida, composta por solução aquosa de ácido sulfúrico 0,01 M e ácido fosfórico 0,4%; FAC – Fase ácida concentrada, constituída por solução aquosa de ácido sulfúrico 0,05 M e ácido fosfórico 2%; MEOH – Metanol; ACN – Acetonitrila.

Foram detectados sete picos principais na corrida cromatográfica da droga vegetal *S. microglossa*. Os espectros dos picos selecionados no cromatograma da matéria-prima estão demonstrados na Figura 11.

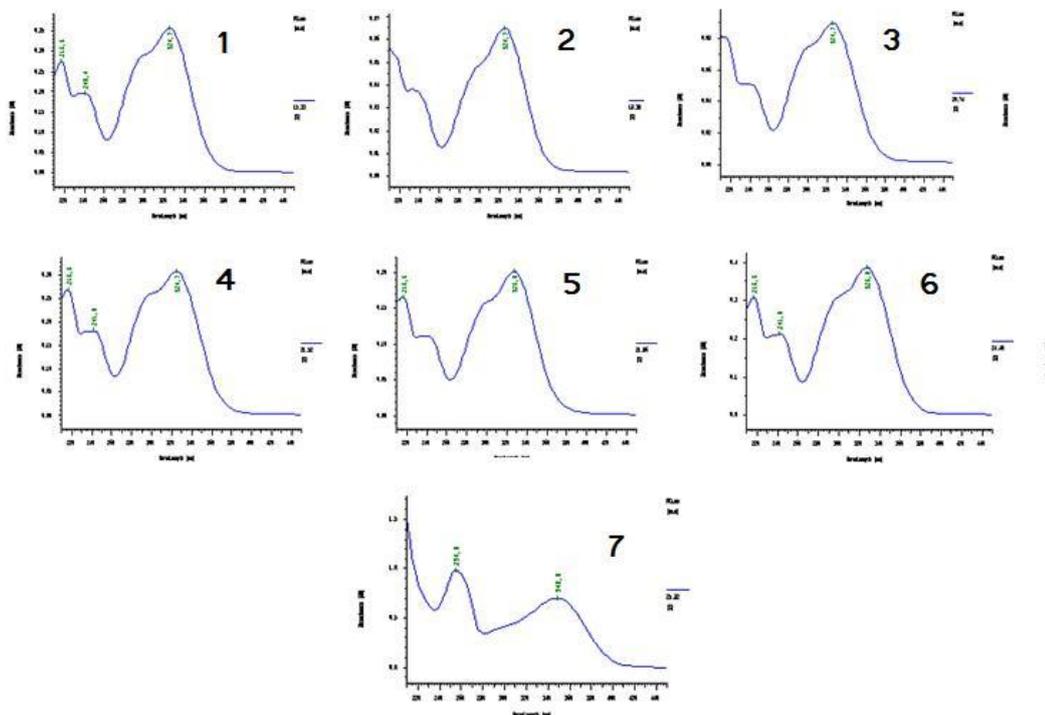


FIGURA 11 - ESPECTROS DAS SUBSTÂNCIAS DETECTADAS NO CROMATOGRAMA DA CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DAS PARTES AÉREAS DE *Solidago microglossa*

Conforme pode-se visualizar na figura anterior, os espectros dos picos 1 a 6 são semelhantes. Esses compostos possuem espectros com três bandas de absorção máxima, a primeira em 216,6 nm, a segunda variando em 233,6 a 241,8 nm e a terceira de 324,7 a 326,9 com ombro em torno de 290 nm, conforme pode ser visualizado nas Figuras 12 e 13. Os espectros supracitados são muito semelhantes aos espectros de ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados (como ácidos cafeoilquínicos). Os ácidos cinâmicos (estrutura química C_6-C_3) apresentam bandas características de absorção no ultravioleta em 290 a 300nm e 305 a 330 nm (POMPEU, 2007) e os ácidos cafeoilquínicos próximos a 299 nm e 325 nm (AMARAL *et al*, 2008). A avaliação espectral realizada para os compostos 1 a 5 indicaram que estes são semelhantes ao espectro do padrão de ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico), apresentando índices de correlações espectrais superiores a 99%, conforme dispostos nas Figuras 12 e 13. O espectro do composto 6 revelou uma correlação de similaridade de 99,86% em relação ao espectro do padrão de ácido caftárico (Figura 13).

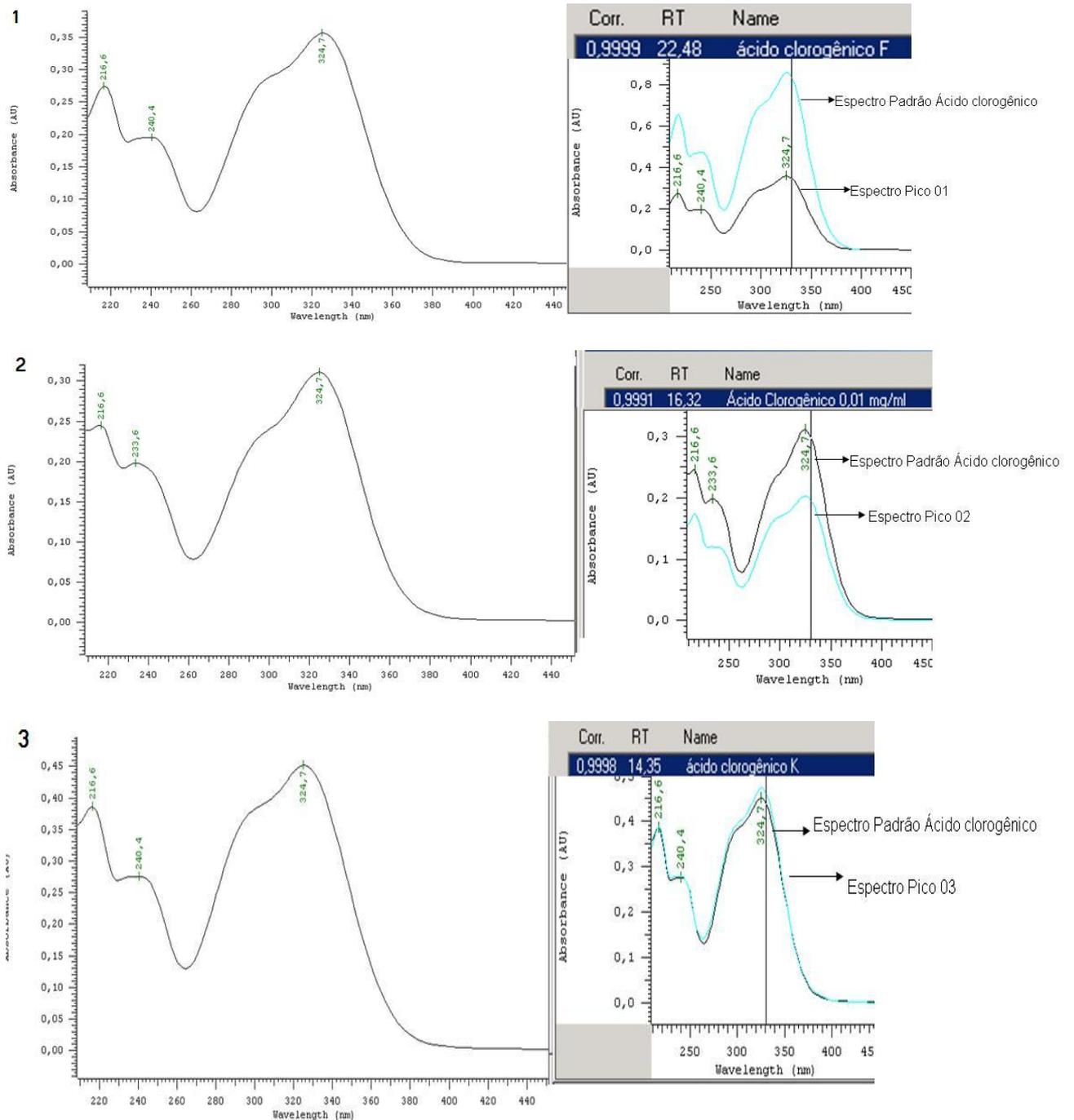


FIGURA 12 - ESPECTROS DOS PICOS IDENTIFICADOS COMO 1 A 3 NO CROMATOGRAMA DA CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DAS PARTES AÉREAS DE *Solidago microglossa* CORRELACIONADOS COM O ESPECTRO PADRÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO.

DADOS: Condições de análise: Fase móvel: A: FA, B: Solução FAC:MEOH 95:5 v/v, C: FAC:ACN 90:10 v/v; Temperatura de forno: 35°C; Volume de injeção: 40 µl; Coluna: Phenomenex Gemini C-18 250 x 4,6 mm (5µm).

NOTA: Corr. = Correlação espectral; RT = tempo de retenção

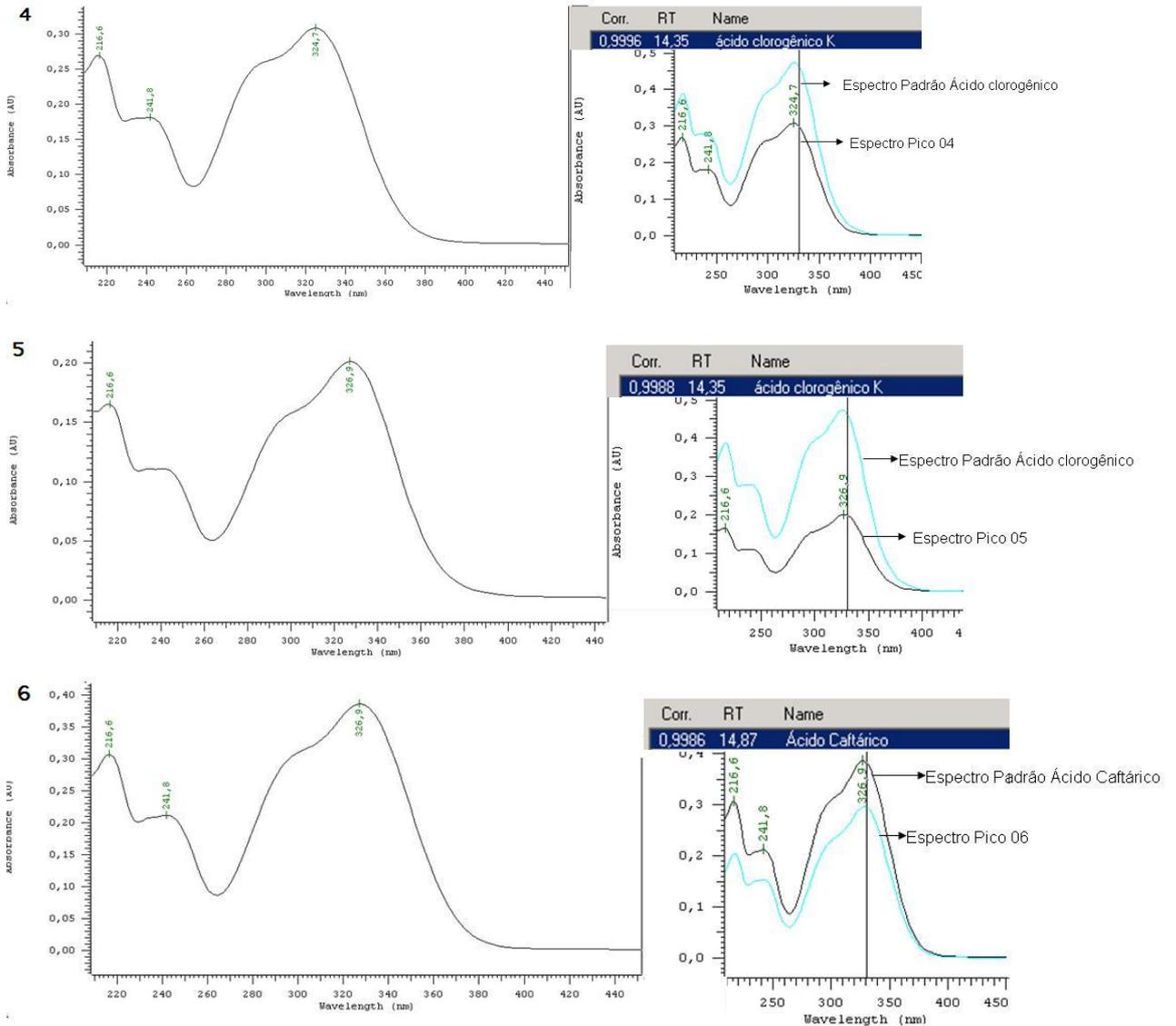


FIGURA 13 - ESPECTROS DOS PICOS IDENTIFICADOS COMO 4 A 6 NO CROMATOGRAMA DA CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DAS PARTES AÉREAS DE *Solidago microglossa* CORRELACIONADOS COM ESPECTROS PADRÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

DADOS: Condições de análise: Fase móvel: A: FA, B: Solução FAC:MEOH 95:5 v/v, C: FAC:ACN 90:10 v/v; Temperatura de forno: 35°C; Volume de injeção: 40 µl; Coluna: Phenomenex Gemini C-18 250 x 4,6 mm (5µm).

NOTA: Corr. = Correlação espectral; RT = tempo de retenção

O pico de número 7 do cromatograma apresenta um espectro com duas zonas de absorção máximas em 254,9 e 349 nm (Figura 15). Este espectro é condizente aos espectros característicos de flavonóides, os quais também possuem duas bandas de absorção máxima, uma relacionada com os anéis B e C em 300 e 380 nm (banda I) e a segunda entre 240 e 280 nm, a qual está associada ao anel A (Figura 14). Sabe-se que os espectros desta classe variam de acordo com a oxigenação dos compostos, sendo que o aumento da oxigenação provoca desvios das bandas de absorção para comprimentos de onda maiores (COSTA, 2009).

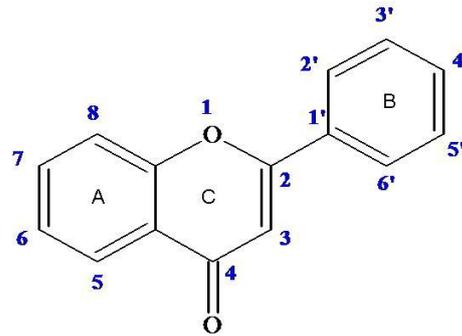


FIGURA 14 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS FLAVONÓIDES

A avaliação do espectro referente ao composto 7 revelou que este possui 99,99% de correlação espectral com o padrão primário de quercitrina (Figura 15).

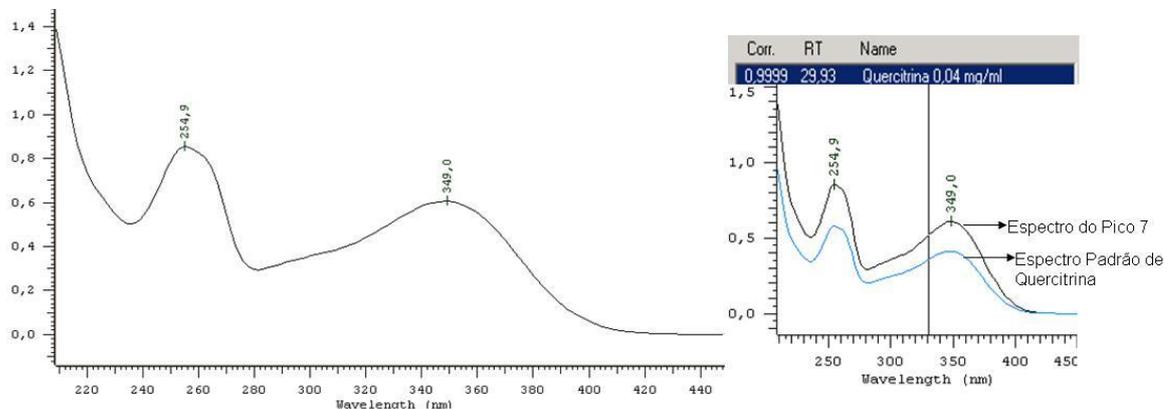


FIGURA 15 - ESPECTRO DO PICO IDENTIFICADO COMO 7 NO CROMATOGRAMA DA CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DAS PARTES AÉREAS DE *Solidago microglossa* CORRELACIONADO COM O ESPECTRO PADRÃO DE QUERCITRINA.

DADOS: Condições de análise: Fase móvel: A: FA, B: Solução FAC:MEOH 95:5 v/v, C: FAC:ACN 90:10 v/v; Temperatura de forno: 35°C; Volume de injeção: 40 µl; Coluna: Phenomenex Gemini C-18 250 x 4,6 mm (5µm).

NOTA: Corr. = Correlação espectral; RT = tempo de retenção

Sob as mesmas condições cromatográficas, os padrões de quercitrina e de ácido clorogênico foram analisados com o intuito de verificar os tempos de retenção de cada substância para realizar a comparação destes com os compostos visualizados no cromatograma da droga vegetal. A sobreposição do cromatograma da matéria-prima de *Solidago microglossa*, sob os cromatogramas do extrato bruto, do padrão primário de quercitrina e do padrão primário de ácido clorogênico está disposta na Figura 16.

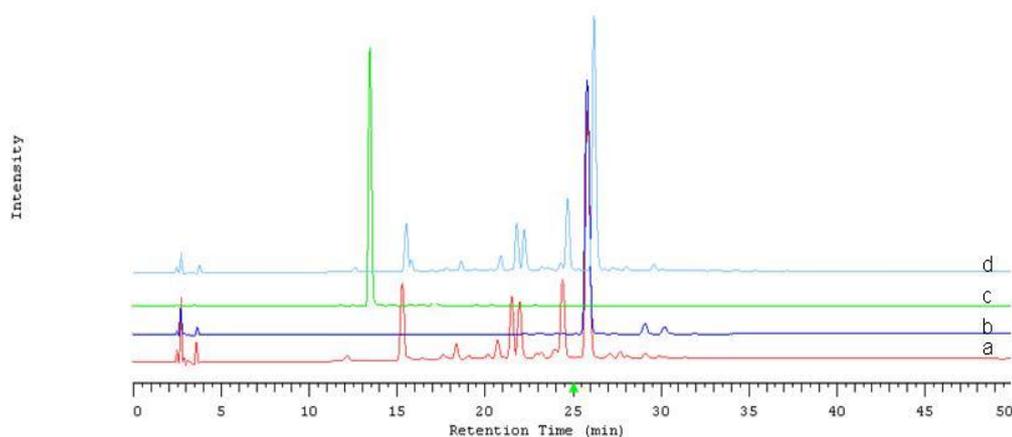


FIGURA 16 - FINGERPRINT DA ESPÉCIE VEGETAL *Solidago microglossa*

DADOS: Condições de análise: Fase móvel: A: FA, B: Solução FAC:MEOH 95:5 v/v, C: FAC:ACN 90:10 v/v; Temperatura de forno: 35°C; Volume de injeção: 40 µl; Coluna: Phenomenex Gemini C-18 250 x 4,6 mm (5µm).

NOTA: a - Matéria-prima vegetal *Solidago microglossa*, b – Padrão primário de Quercitrina, c – Ácido clorogênico, d - Extrato bruto *Solidago microglossa*.

De acordo com os dados visualizados na Figura 16, pode-se afirmar que o composto 7 do cromatograma da droga vegetal possui, além do espectro, tempo de retenção similar ao padrão de quercitrina. Conclui-se, portanto, que o composto em questão é o flavonóide quercetina-3-ramnosídica (quercitrina). Nenhum composto da droga vegetal apresentou tempo de retenção semelhante ao do padrão de ácido clorogênico. Deste modo não é possível realizar a identificação dos demais compostos, apenas pode-se sugerir que estes pertencem provavelmente à classe de ácidos hidroxicinâmicos e /ou seus derivados.

As frações foram submetidas à análise por CLAE, nas mesmas condições cromatográficas do *fingerprint*. Nestas condições, não foi detectado nenhum pico cromatográfico na fração hexânica.

Na fração clorofórmio foram detectados traços de dois picos cromatográficos apresentados na Figura 17. Com auxílio do detector de DAD, foi realizada uma varredura na faixa espectral de 200 a 450 nm, contribuindo deste modo na identificação dos compostos com base nos seus espectros de absorção na região do UV.

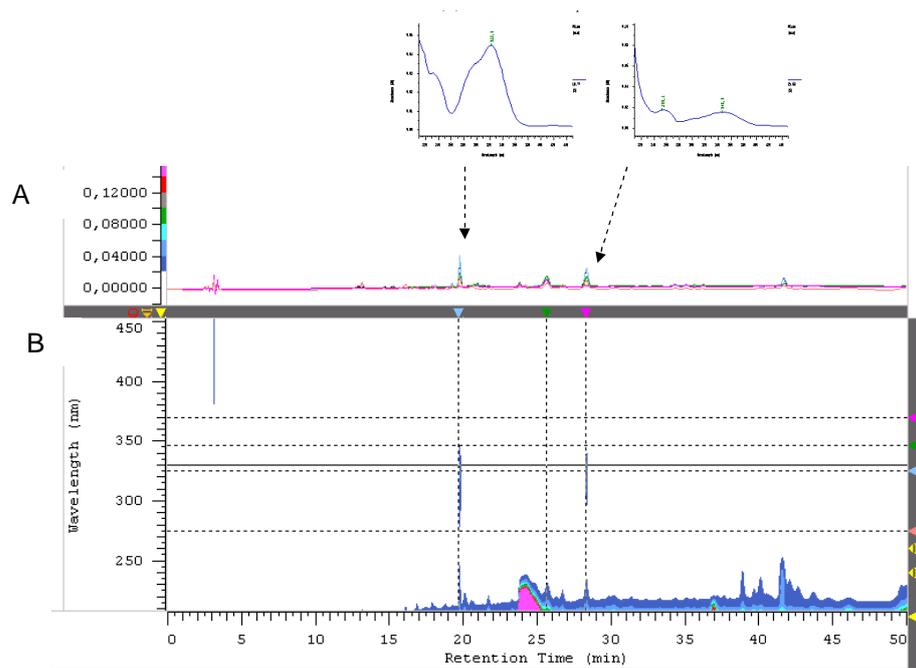


FIGURA 17 - FRAÇÃO CLOROFÓRMIO OBTIDA POR MEIO DA PARTIÇÃO SÓLIDO LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DE *Solidago microglossa*

DADOS: Condições de análise: Fase móvel: A: FA, B: Solução FAC:MEOH 95:5 v/v, C: FAC:ACN 90:10 v/v; Temperatura de forno: 35°C; Volume de injeção: 40 µl; Coluna: Phenomenex Gemini C-18 250 x 4,6 mm (5µm).

NOTA: A – Representação dos espectros dos picos selecionados; B – cromatograma em 346 nm

O primeiro composto presente na fração (tempo de retenção –Tr- de cerca de 19,8 minutos), possui duas bandas de absorção máxima, uma entre 200-220 nm e outra em 322,6 nm, e dois ombros nas regiões de 230 e 290nm (Figura 18).

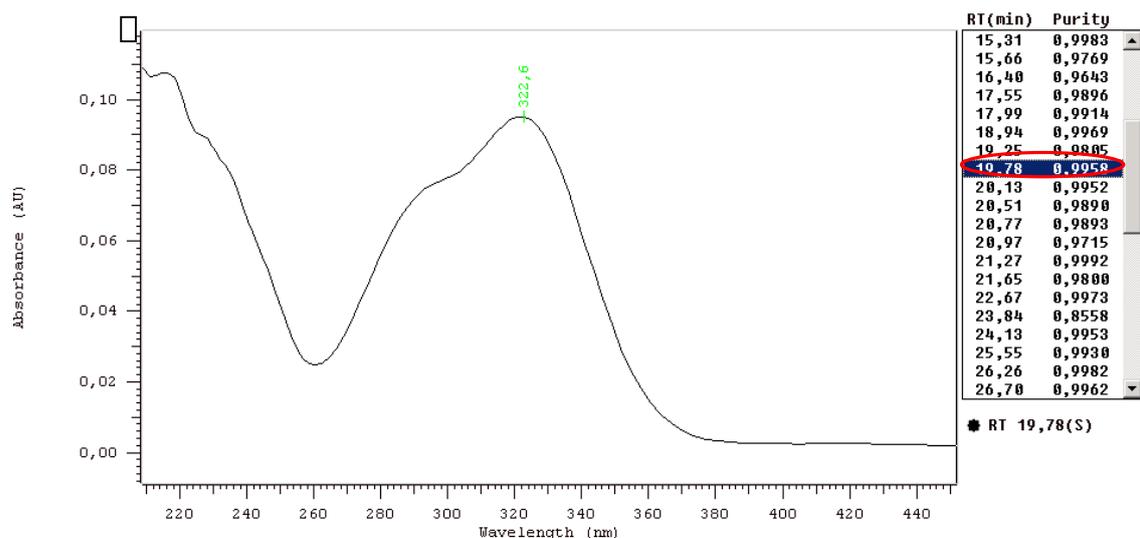


FIGURA 18 - ESPECTRO DO PICO DE TR 19,78 MINUTOS DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO A QUAL FOI OBTIDA POR MEIO DA PARTIÇÃO SÓLIDO LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DE *Solidago microglossa*

Este pico com pureza de 99,58% (Figura 18) possui uma correlação espectral com o padrão de ácido clorogênico de 98,40% (Figura 19), porém possuem tempos de retenção distintos. Com base no tempo de retenção apresentado para este pico, conclui-se que este é o composto 2 visualizado no cromatograma da matéria-prima (Figura 10).

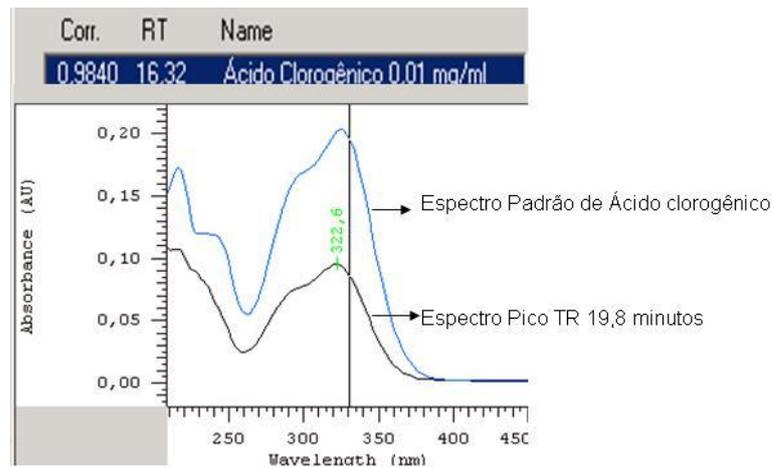


FIGURA 19 - CORRELAÇÃO ESPECTRAL DO PICO DE TR 19,78 MINUTOS DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO COM O PADRÃO PRIMÁRIO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO (TR 16,32 MINUTOS)

NOTA: Corr. = Correlação espectral; RT = tempo de retenção

O segundo pico presente (TR = 25,55 minutos) possui espectro com duas bandas de absorção máxima em 255 e 350nm, demonstrado na Figura 20.

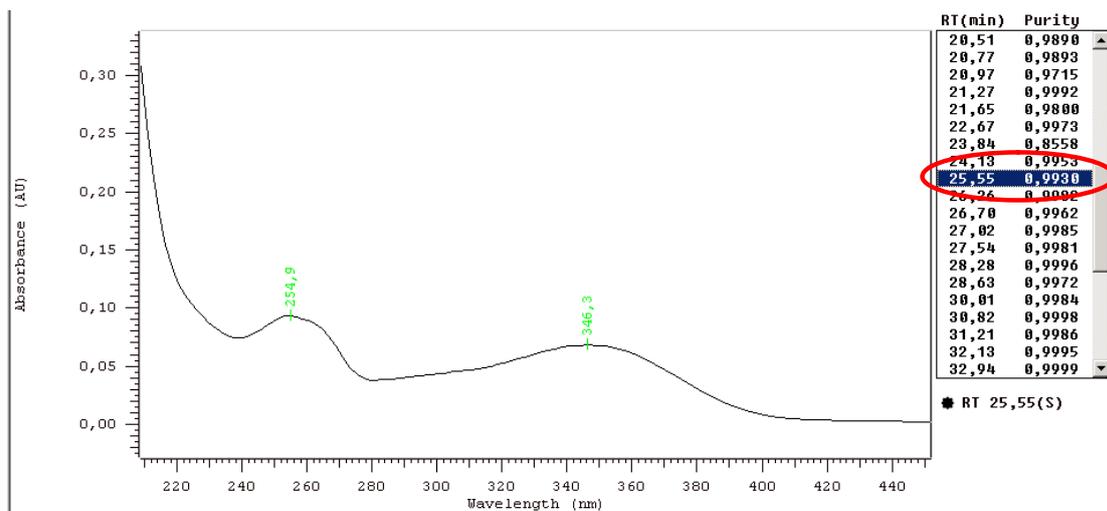


FIGURA 20 - ESPECTRO DO PICO DE TR 25,55 MINUTOS DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO A QUAL FOI OBTIDA POR MEIO DA PARTIÇÃO SÓLIDO LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DE *Solidago microglossa*

NOTA: RT = Tempo de retenção, Purity = Pureza

O pico supracitado, com teor de pureza de 99,38% (Figura 20), possui um tempo de retenção e o espectro semelhante ao flavonóide quercitrina, possuindo uma correlação espectral com este de 100% (Figura 21), podendo-se confirmar portanto, a identidade desta substância.

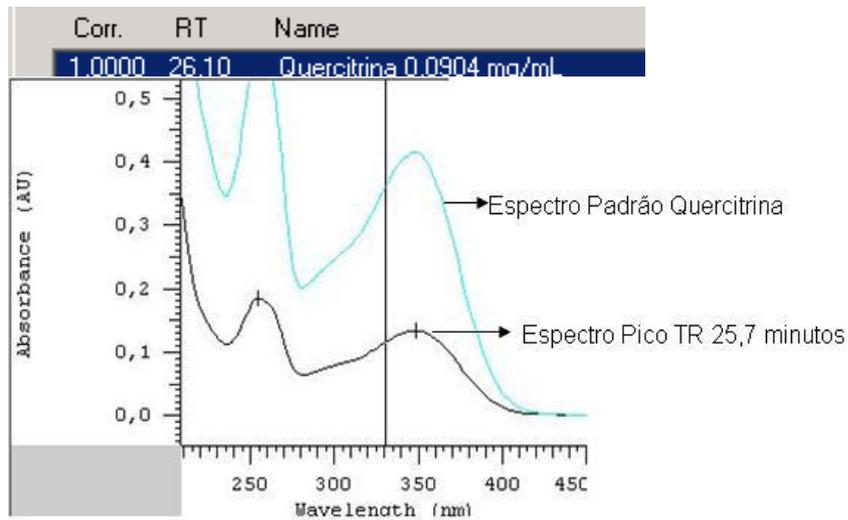


FIGURA 21 - CORRELAÇÃO ESPECTRAL DO PICO DE TR 25,7 MINUTOS DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO COM O PADRÃO PRIMÁRIO DE QUERCITRINA (TR 26,10 MINUTOS)

A fração acetato de etila apresentou um pico majoritário no tempo de retenção em torno de 26 minutos, o qual também pode ser atribuído ao composto quercitrina (Figura 22).

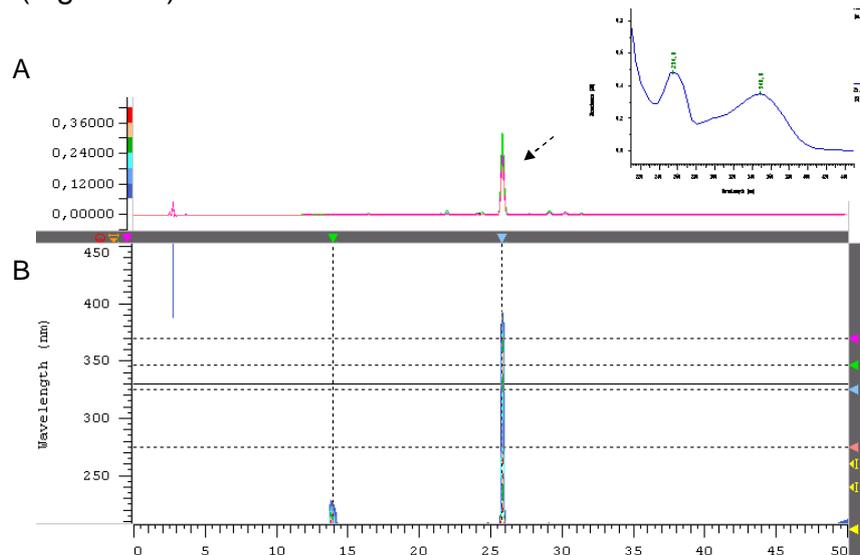


FIGURA 22 - FRAÇÃO ACETATO DE ETILA OBTIDA POR MEIO DA PARTIÇÃO SÓLIDO LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DE *Solidago microglossa*
 DADOS: Condições de análise: Fase móvel: A: FA, B: Solução FAC:MEOH 95:5 v/v, C: FAC:ACN 90:10 v/v; Temperatura de forno: 35°C; Volume de injeção: 40 µl; Coluna: Phenomenex Gemini C-18 250 x 4,6 mm (5µm)
 NOTA: A – Representação do espectro do pico selecionado; B – cromatograma em 346 nm

A partição hidroalcoólica foi a que apresentou qualitativamente uma composição mais variada nestas condições cromatográficas (Figura 23). Esta fração apresentou uma composição semelhante à obtida para a droga vegetal (Figura 10), compreendendo 6 compostos pertencentes, provavelmente, a classe de ácidos hidroxicinâmicos e /ou seus derivados, além da quercitrina (Figura 24).

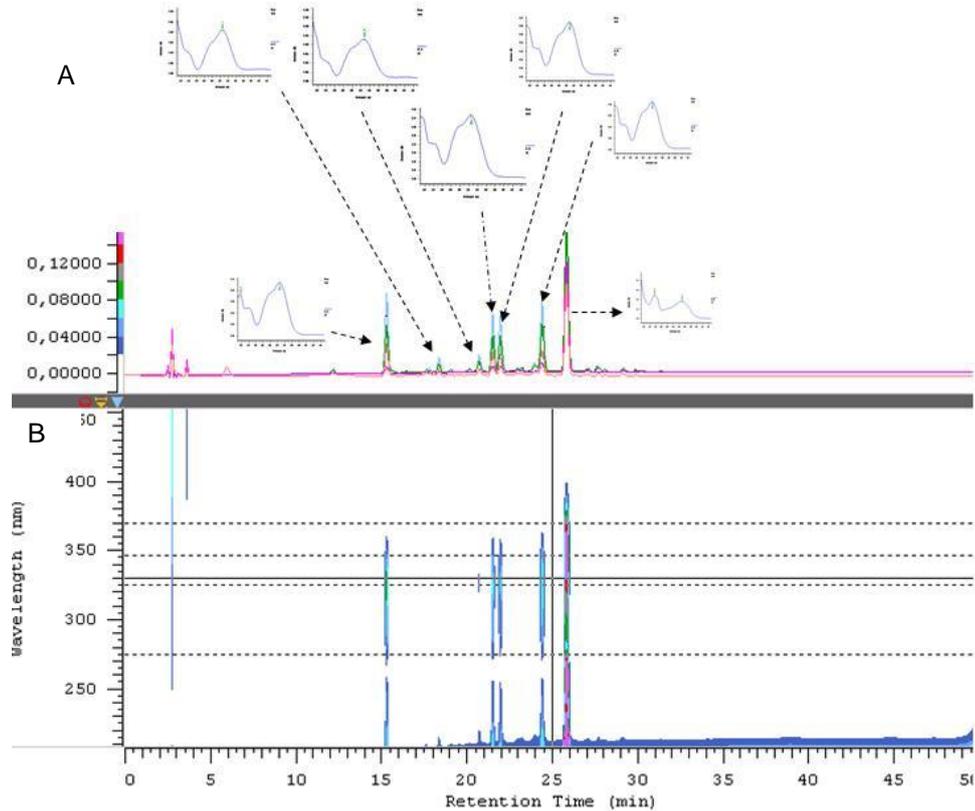


FIGURA 23 - FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA OBTIDA POR MEIO DA PARTIÇÃO SÓLIDO LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DE *Solidago microglossa*

DADOS: Condições de análise: Fase móvel: A: FA, B: Solução FAC:MEOH 95:5 v/v, C: FAC:ACN 90:10 v/v; Temperatura de forno: 35°C; Volume de injeção: 40 µl; Coluna: Phenomenex Gemini C-18 250 x 4,6 mm (5µm).

NOTA: A – Representação dos espectros dos picos selecionados; B – cromatograma em 346 nm

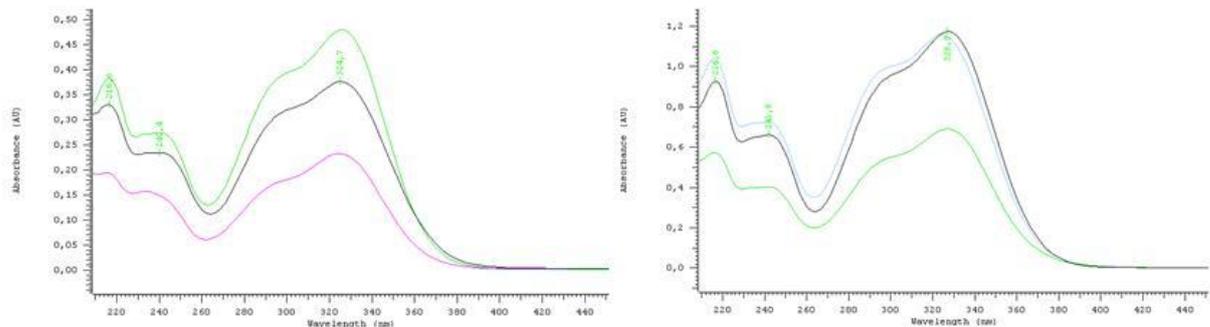


FIGURA 24: ESPECTROS DOS PICOS DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REFERENTES AOS PICOS DE DERIVADOS DE ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS E/OU SEUS DERIVADOS

A fração hidroalcoólica ácida possibilitou a retirada de compostos fenólicos que haviam sido retidos na sílica, conforme pode ser visualizado na Figura 25.

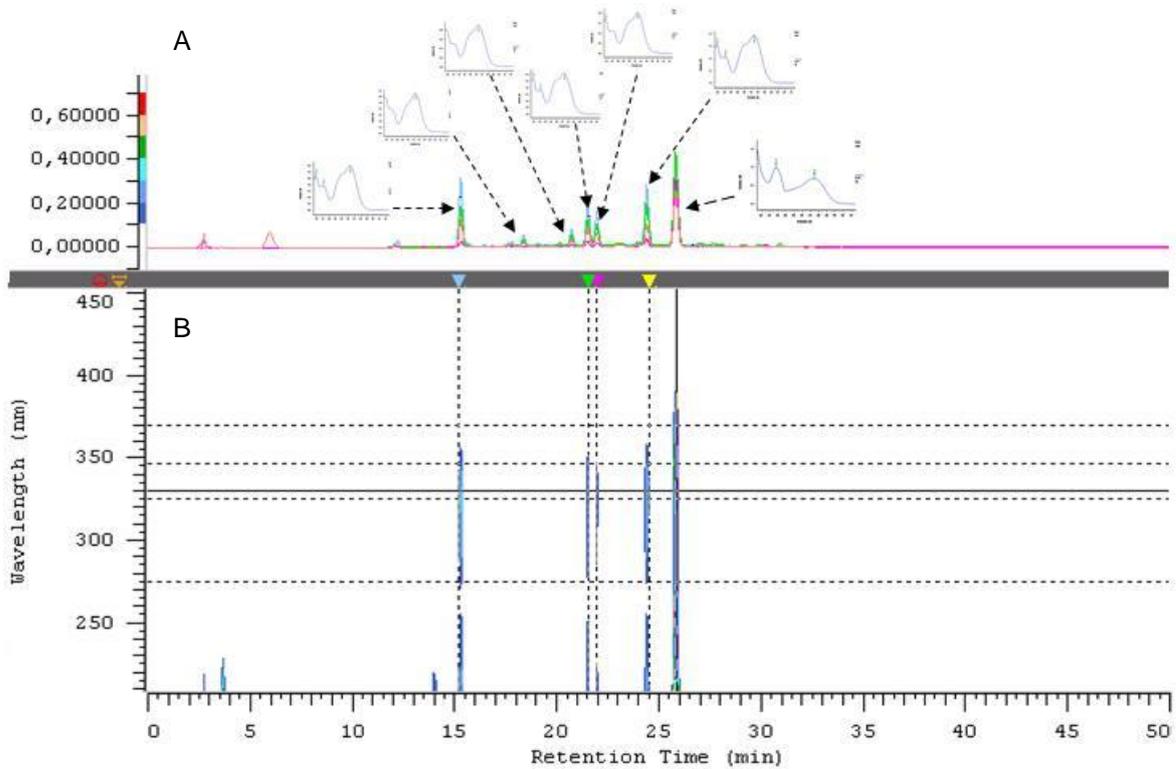


FIGURA 25 - FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA ÁCIDA OBTIDA POR MEIO DA PARTIÇÃO SÓLIDO LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DE *Solidago microglossa*

DADOS: Condições de análise: Fase móvel: A: FA, B: Solução FAC:MEOH 95:5 v/v, C: FAC:ACN 90:10 v/v; Temperatura de forno: 35°C; Volume de injeção: 40 µl; Coluna: Phenomenex Gemini C-18 250 x 4,6 mm (5µm).

NOTA: A – Representação dos espectros dos picos selecionados; B – cromatograma em 346 nm

Essa fração apresentou composição qualitativamente semelhante à fração hidroalcoólica e da droga vegetal.

A comparação dos constituintes das frações, realizado por meio da sobreposição dos cromatogramas, está apresentada na Figura 26.

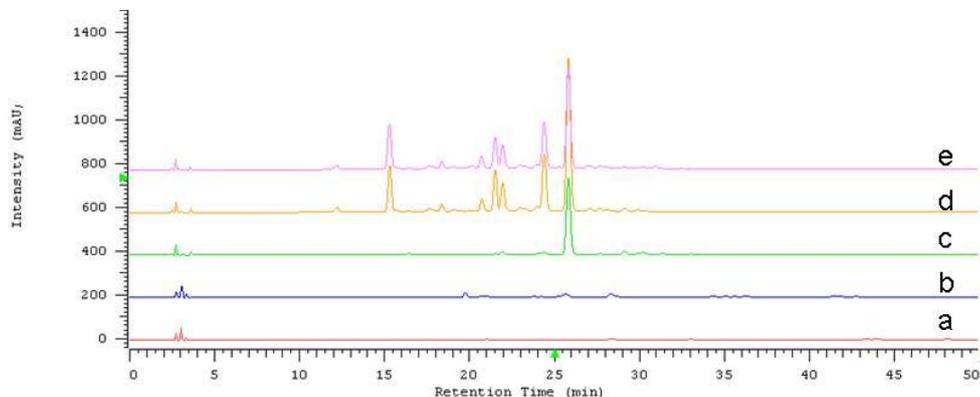


FIGURA 26 - COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR MEIO DA PARTIÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DE *Solidago microglossa*

NOTA: a - Fração hexano; b – fração clorofórmio, c - Fração acetato de etila, d - Fração hidroalcoólica, e – Fração hidroalcoólica ácida

A partição sólido-líquido demonstrou ser seletiva na separação dos possíveis compostos da classe de ácidos hidroxicinâmicos e/derivados de ácidos cafeoilquínicos, os quais se concentraram nas frações hidroalcoólicas. O flavonóide quercitrina pode ser detectado principalmente nas frações acetato de etila e hidroalcoólica. Na fração clorofórmio foram detectados apenas traços desta substância.

5.3 ISOLAMENTO DO COMPOSTO

O composto foi isolado durante a concentração da fração acetato de etila, quando observou-se a formação de cristais amarelos esverdeados. Esses cristais foram filtrados a vácuo em funil sinterizado G3, obtendo-se no final do processo 230 mg (o que corresponde a cerca de 1,98% em relação a quantidade total de sólidos da fração), que após verificação de pureza por CCD e CLAE foram encaminhados para identificação (Figura 27).



FIGURA 27 - COMPOSTO ISOLADO A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA
FONTE: A autora (2009)

O composto foi submetido primeiramente à análise por CLAE, sob as mesmas condições efetuadas para determinar o “fingerprint” desta espécie vegetal. O cromatograma obtido encontra-se na Figura 28.

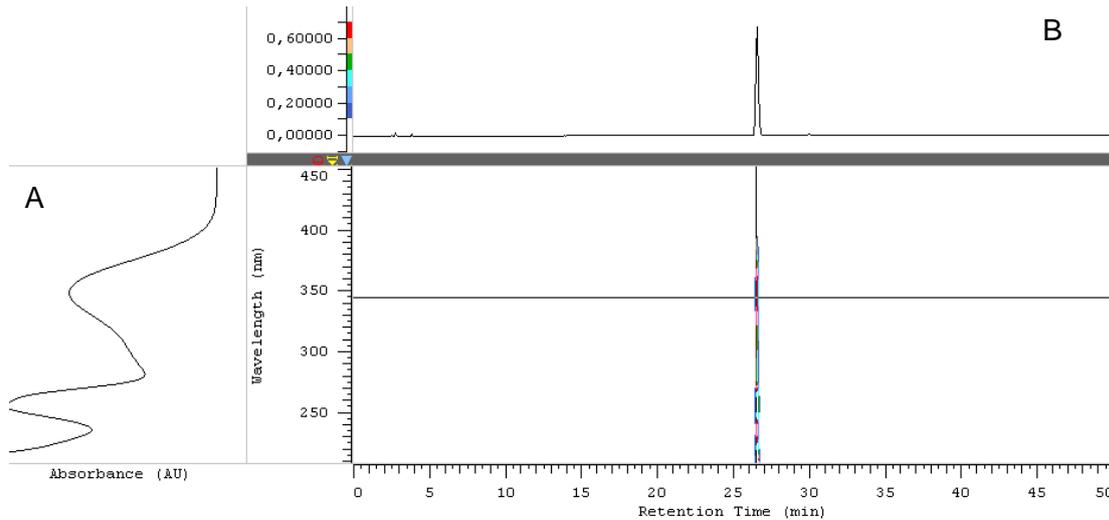


FIGURA 28 - CROMATOGRAMA DO COMPOSTO ISOLADO A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

DADOS: Condições de análise: Fase móvel: A: FA, B: Solução FAC:MEOH 95:5 v/v, C: FAC:ACN 90:10 v/v; Temperatura de forno: 35°C; Volume de injeção: 40 µl; Coluna: Phenomenex Gemini C-18 250 x 4,6 mm (5µm).

NOTA: A – Espectro do pico selecionado de tempo de retenção 26,54 minutos; B – cromatograma em 346 nm

De acordo com a Figura 28, verificou-se que o composto isolado apresentou pico em 26,54 minutos, sendo este semelhante ao tempo obtido pelo padrão de quercitrina quando submetido às mesmas condições. O espectro de UV do composto isolado está representado na Figura 29, a qual demonstra também o índice de pureza do pico na corrida cromatográfica.

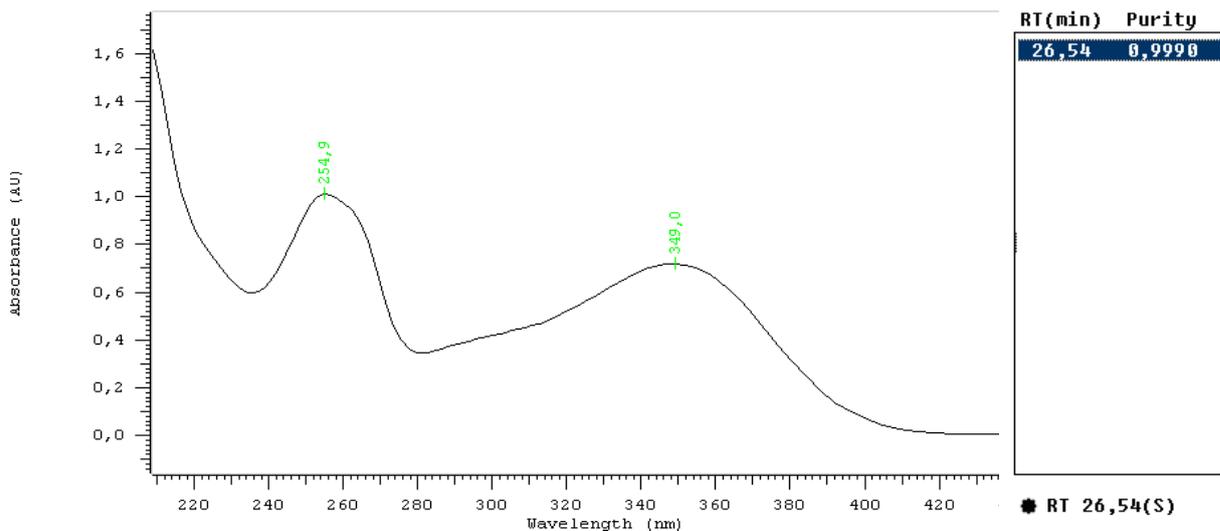


FIGURA 29 - ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO ISOLADO A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

NOTA: RT = Tempo de retenção, Purity = Pureza

O pico do composto em questão apresenta-se puro (pureza de 99,98%) e possui um espectro com duas bandas de absorção máxima em 254,9 e 349 nm, sendo este semelhante ao padrão de quercitrina. Essa afirmação foi comprovada por meio da ferramenta *Library search*, a qual demonstrou que a substância isolada possui 100% de correlação espectral com o espectro do padrão de quercitrina (Figura 30).

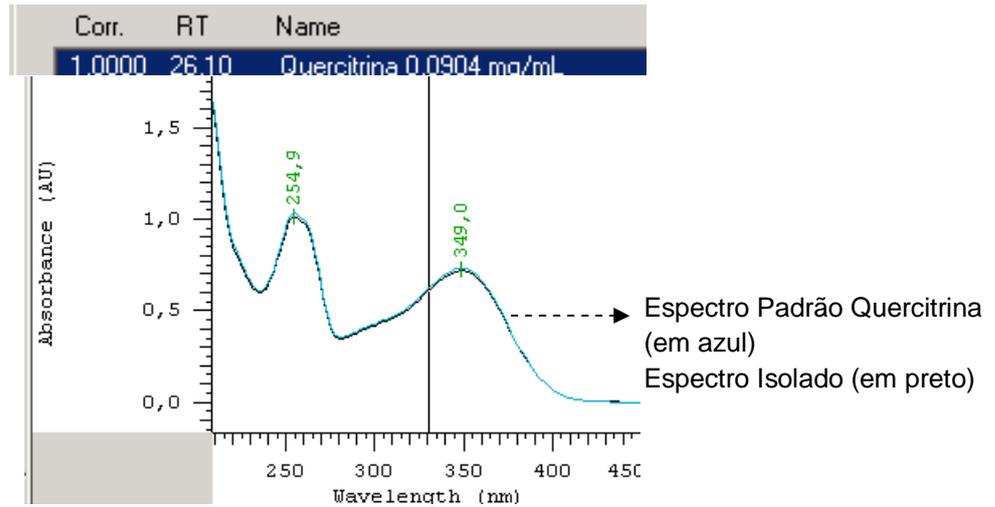


FIGURA 30 - COMPARAÇÃO ESPECTRAL DO COMPOSTO ISOLADO COM O ESPECTRO DO PADRÃO DE QUERCITRINA

Os cromatogramas obtidos na elaboração do “fingerprint” para o extrato bruto de arnica do mato e para o padrão de quercitrina foram sobrepostos ao cromatograma da substância purificada. Conforme visualizamos na Figura 31, o tempo de retenção da substância isolada coincide com o tempo de retenção do pico de quercitrina do padrão e do extrato bruto.

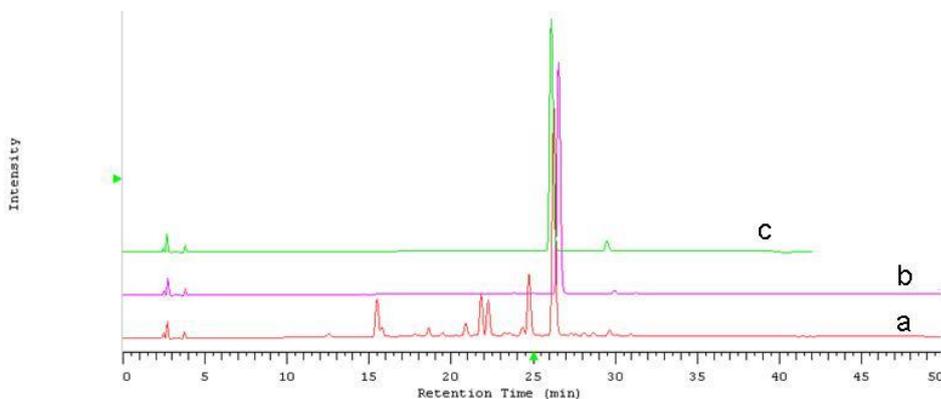


FIGURA 31 – SOBREPOSIÇÃO DO CROMATOGRAMA DO COMPOSTO ISOLADO A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, SOB OS CROMATOGRAMAS DO EXTRATO BRUTO DE *S. microglossa* E DO PADRÃO DE QUERCITRINA

NOTA: a- Extrato bruto de *S. microglossa*; b- Substância isolada da fração acetato de etila, c – Padrão primário de quercitrina

Essas análises iniciais sugerem que o composto em questão é o flavonóide quercitrina. Para comprovação da identidade deste composto foi realizada espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^{13}C e ^1H e espectrometria de massas.

O espectro de RMN- ^{13}C , usando como solvente metanol deuterado (CD_3OD) à 75 MHz, apresentou sinais na região de 17 a 180ppm (Figura 32). Através da análise de espectro DEPT 135° foi possível constatar que o sinal em $\delta 17,40$ é de um CH_3 , e os sinais entre $\delta 71,64$ - $\delta 122,63$ são todos referentes a CH (Figura 33). No espectro de RMN- ^1H (Figura 34) observou-se deslocamentos na região de 0,9 a 7,4ppm. Sabe-se que a região de 6 a 7 ppm é uma região característica de compostos aromáticos e a região de 3 a 4 ppm de açúcares.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se verificar que o composto isolado possui em sua estrutura 21 átomos de carbono, sendo 6 deles pertencentes a uma unidade de açúcar presente na molécula. Os outros 15 carbonos restantes, condizem com o número de carbonos presentes no esqueleto básico de flavonóides. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 7, os quais foram comparados com os dados obtidos por Messias (2005) para o flavonóide quercitrina (Figura 35).

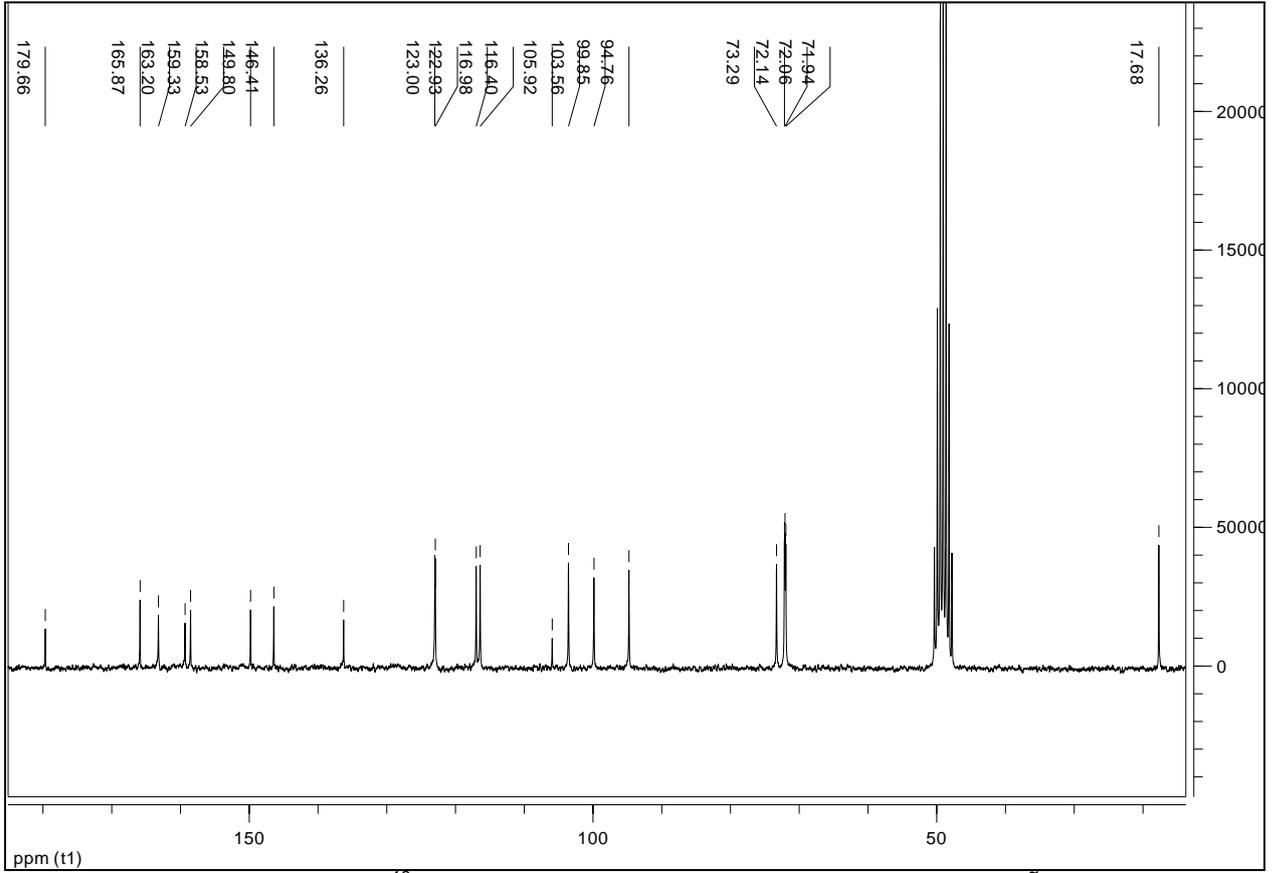


FIGURA 32 - ESPECTRO RMN ^{13}C DO COMPOSTO ISOLADO A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (CD $_3$ OD 200 MHz)

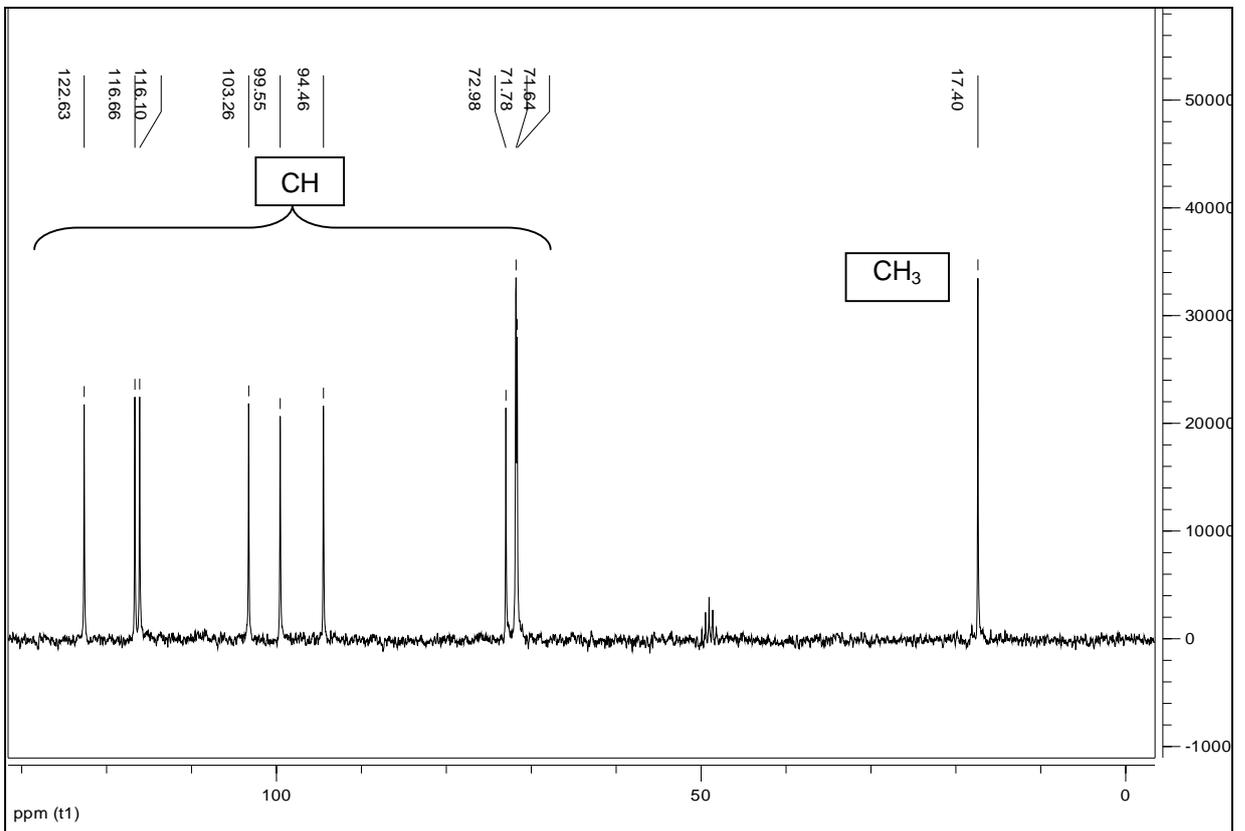


FIGURA 33 - DEPT 135 $^\circ$ DO COMPOSTO ISOLADO (CD $_3$ OD 200 MHz)

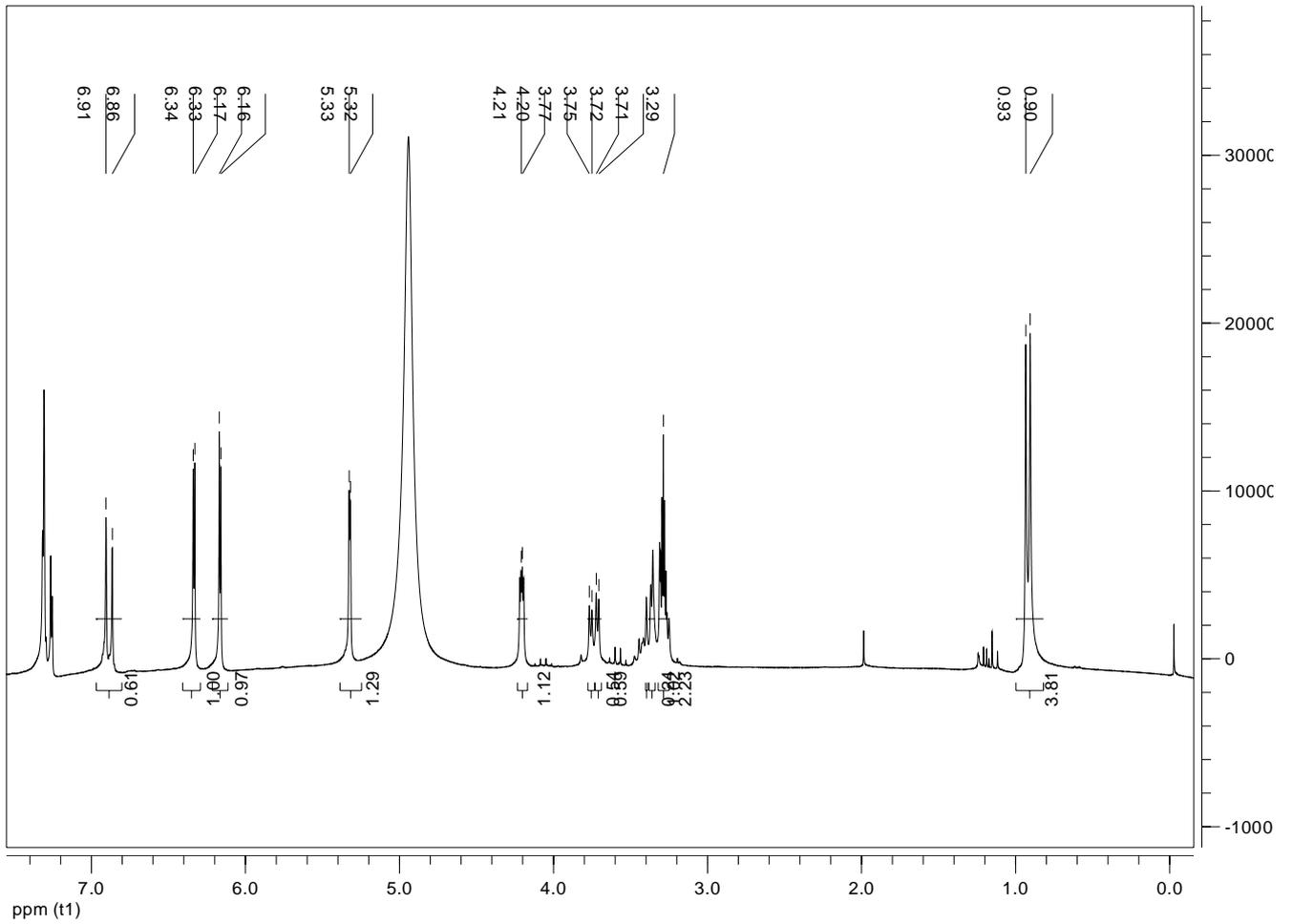


FIGURA 34 - ESPECTRO RMN H^1 DO COMPOSTO ISOLADO A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (CD_3OD 200 MHz)

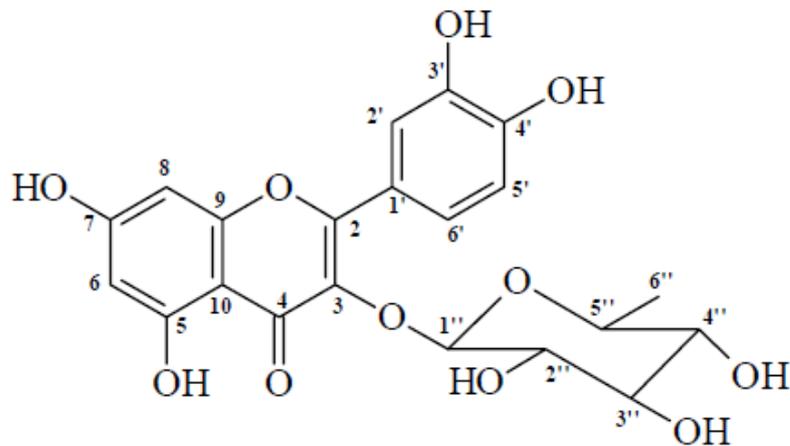


FIGURA 35 – ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCITRINA

TABELA 7 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) DE RMN – ^{13}C E ^1H OBTIDOS PARA O COMPOSTO ISOLADO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA COM DADOS DA LITERATURA PARA O COMPOSTO QUERCITRINA

	RMN- ^{13}C (δ)			Dept 135			RMN- ^1H			
	Messias (2005) ^a	Messias (2005) ^b	Isolado	Isolado	Messias (2005) ^a	Messias (2005) ^b	Isolado	Messias (2005) ^a	Messias (2005) ^b	Isolado
2	157,5	158,6	158,53							
3	135,8	136,3	136,26							
4	178,9	179,7	179,66							
5	162,7	163,3	163,26							
6	99,5	99,8	99,85	99,55	6,7 (d J=2,0)	6,3 (d J=2,0)	6,16 (d J=2,09)			
7	165,6	165,9	165,87							
8	94,3	94,7	94,76	94,46	6,6 (d J=2,0)	6,4 (d J=2,0)	6,33 (d J=2,09)			
9	158,0	159,3	159,33							
10	105,2	105,9	105,92							
1'	122,1	122,9	123,00							
2'	116,3	116,9	116,9	116,66	8,0 (d J=2,1)	7,4 (d J=2,3)	7,34			
3'	147,1	146,4	146,41							
4'	150,3	149,8	149,80							
5'	116,9	116,4	116,40	116,10	7,3 (d J=8,3)	7,1 (d J=8,2)	6,91 (d J=7,9)			
6'	121,9	123,0	122,93	122,63	7,7 (dd J=8,3;2,1)	7,4 (dd J=8,2;2,3)				
1''	103,8	103,6	103,56	103,26	6,3 (d J=1,4)	5,48 (d J=1,6)	5,32 (d J=1,6)			
2''	73,1	72,1	72,06	72,98	5,1 (dd J=1,5;2,5)	4,3 (dd J=1,6;3,0)	3,29			
3''	72,3	72,1	72,14	71,64	4,6 (dd J=3,3;9,0)	3,9 (dd J=3,2;9,5)	4,20			
4''	71,9	73,3	73,29	71,78	4,32	3,5 (t J=9,5)	3,75			
5''	71,8	71,9	71,94	71,64	4,35	3,5 (dd J=9,5;6,2)	3,72			
6''	18,2	17,7	17,68	17,40	1,5 (d J= 6,0)	1,1 (d J= 6,2)	0,93 (d J=5,75)			

Nota: a = Valores dos deslocamentos químicos para o composto quercitrina em piridina-d₅ encontrados por Messias (2005); b = Valores dos deslocamentos químicos para o composto quercitrina em metanol deuterado (RMN C¹³) e DMSO-d₆ (RMN H¹) encontrados por XI-ZING *et al*, 1997, publicado por Messias (2005);

Os dados apresentados para a substância isolada são compatíveis com os resultados descritos na literatura (MESSIAS, 2005) para o flavonóide quercitrina.

O isolado foi submetido à análise por espectrometria de massas e o seu perfil de fragmentação foi comparado ao perfil de fragmentação do padrão primário de quercitrina. O íon molecular $[M-H]^-$ obtido para o padrão de quercitrina (Figura 36) foi de 447,1 m/z , exatamente a mesma massa carga (m/z) do íon molecular obtido para a substância isolada (Figura 37).

Uma vez determinado o íon molecular $[M-H]^-$ dos compostos (m/z 447,1) foi realizada a análise de fragmentação deste sinal. O perfil de fragmentação para o padrão de quercitrina e para a substância isolada estão dispostos respectivamente nas figuras 38 e 39.

Conforme pode ser visualizado nas Figuras 38 e 39, a substância isolada apresentou um perfil de fragmentação semelhante ao do padrão de quercitrina, resultando na formação dos seguintes íons principais: m/z 301, 300, 271, 254, 179, 151. Esses resultados vêm de encontro aos obtidos por Tiberti e colaboradores (2007) os quais propuseram os mecanismos de fragmentação da quercitrina (Figura 40) idênticos aos desse trabalho, ou seja, m/z 301, 271, 179, 151.

Em virtude dos resultados apresentados, concluiu-se que a substância isolada trata-se da quercitrina. Os mecanismos principais de fragmentação desta substância são melhores visualizados na figura 40.

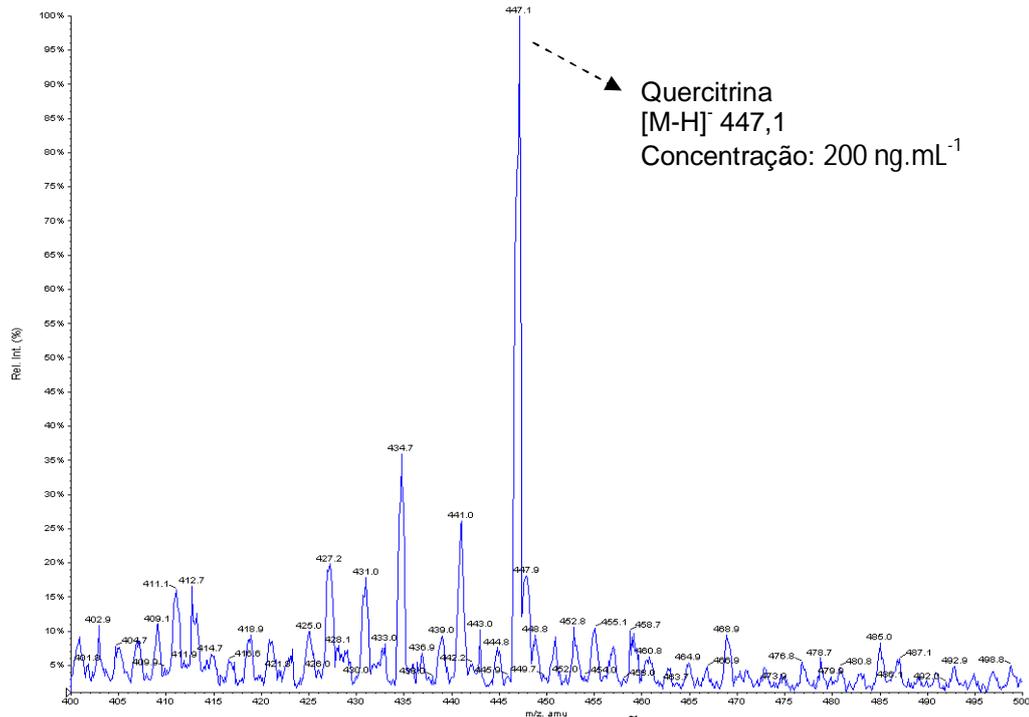


FIGURA 36 – ESPECTRO DE MASSAS DO PADRÃO DE QUERCITRINA (FULL SCAN) UTILIZANDO ESI NO MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO

NOTA: Condições de análise: *Ion spray voltage*: -4500,00; *curtain gas*: 10; *ion source gas*: 10; *declustering potential*: -40; *entrance potential*: -5.

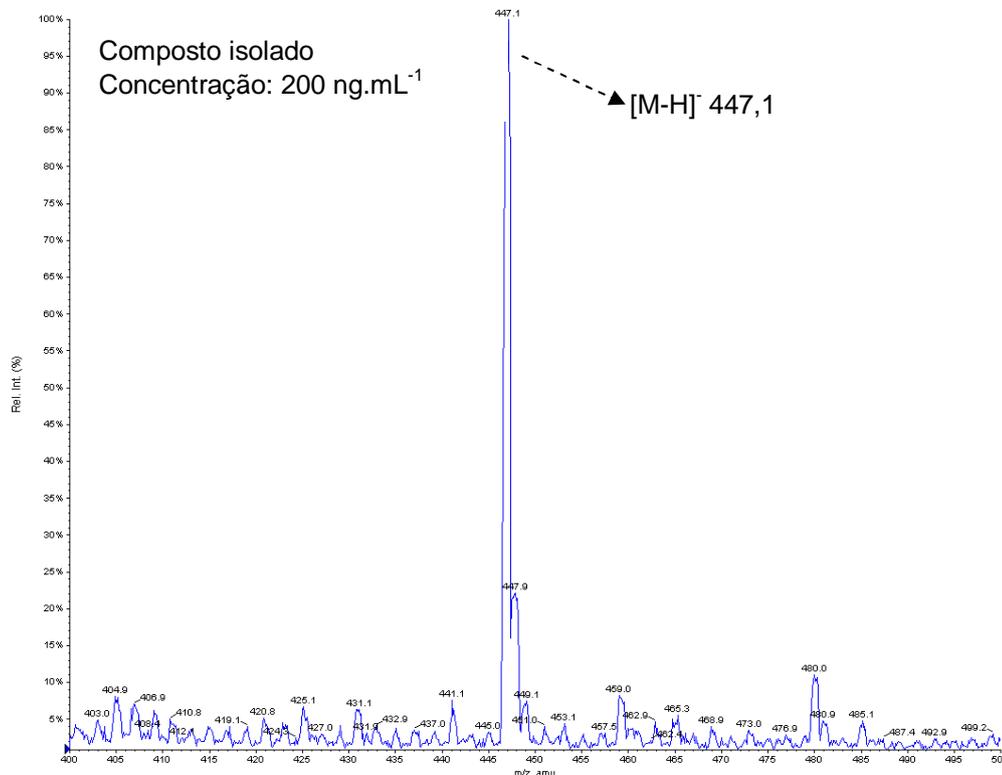


FIGURA 37 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO ISOLADO (FULL SCAN) UTILIZANDO ESI NO MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO

NOTA: Condições de análise: *Ion spray voltage*: -4500,00; *curtain gas*: 10; *ion source gas*: 10; *declustering potential*: -40; *entrance potential*: -5.

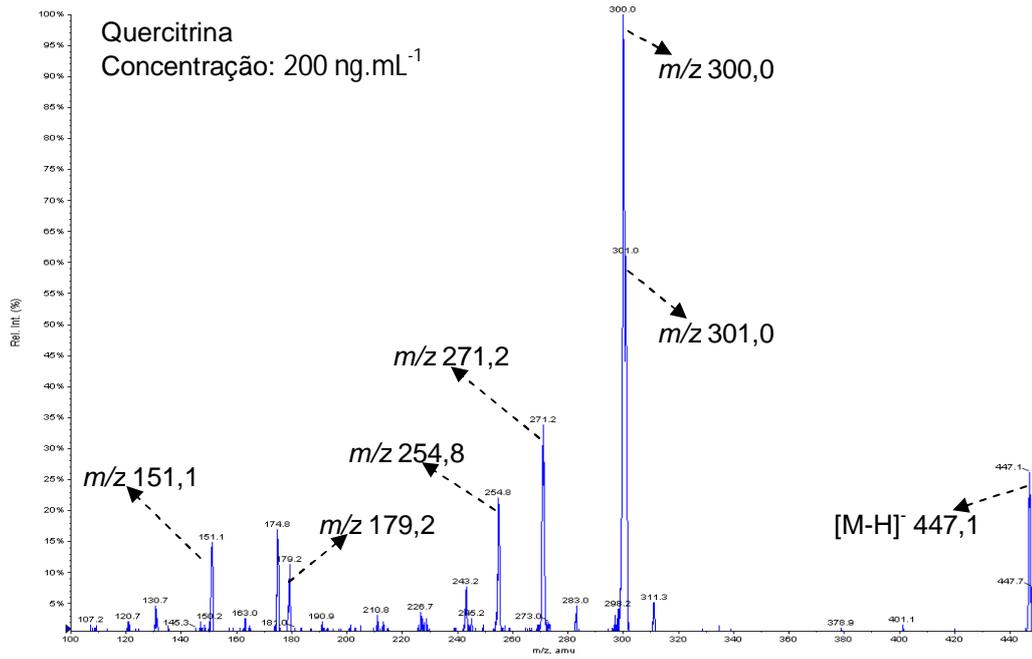


FIGURA 38 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO PADRÃO DE QUERCITRINA (m/z 447,1) NO MODO NEGATIVO DE INONIZAÇÃO

NOTA: Condições de análise: *declustering potential*: -40; *entrance potential*: -5; *collision energy*: -45; *collision cell exit potencial*: -5.

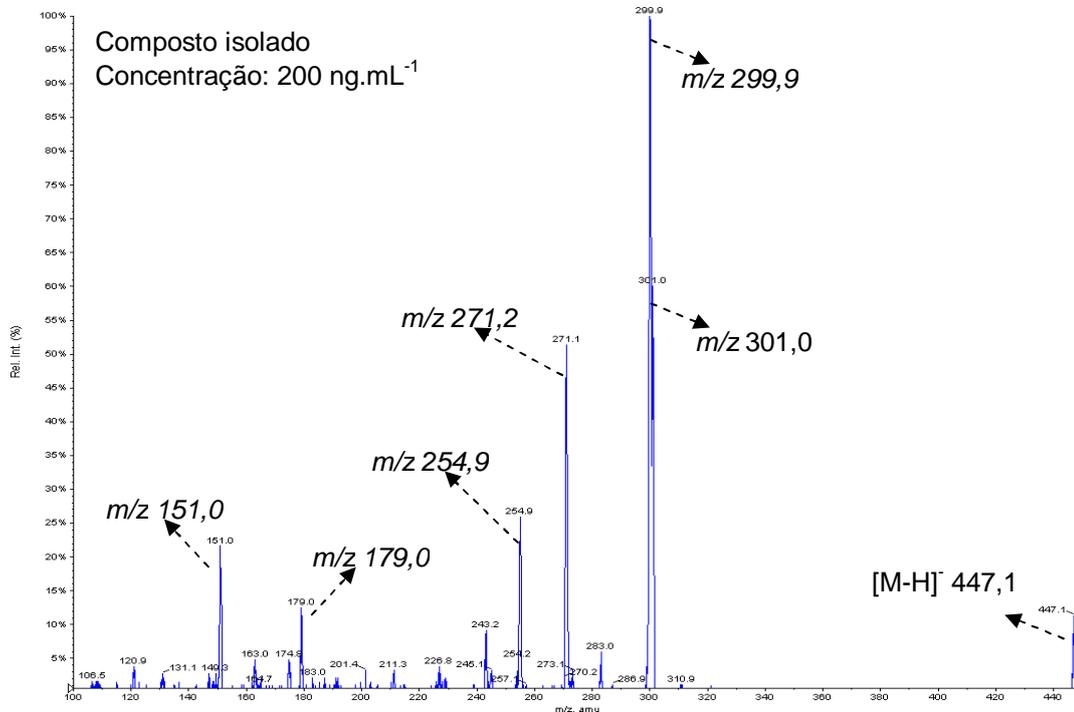


FIGURA 39 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DA SUBSTÂNCIA ISOLADA (m/z 447,1) NO MODO NEGATIVO DE INONIZAÇÃO

NOTA: Condições de análise: *declustering potential*: -40; *entrance potential*: -5; *collision energy*: -45; *collision cell exit potencial*: -5.

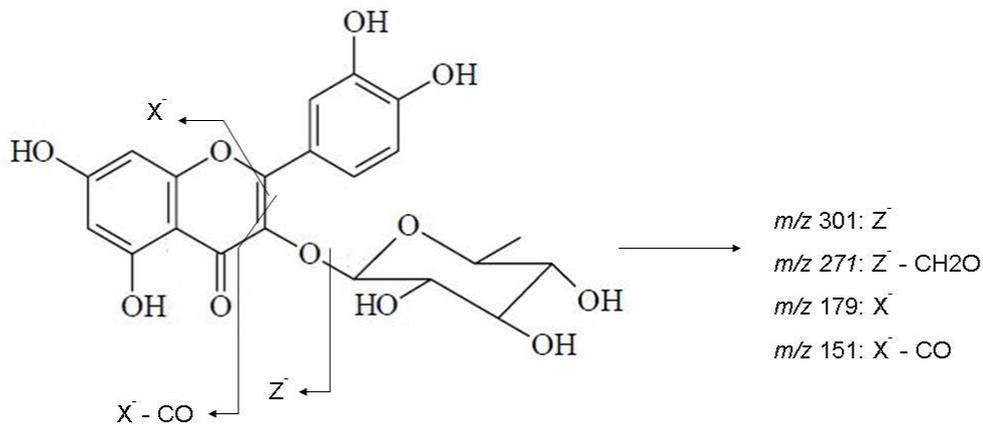


FIGURA 40 - MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DOS FLAVONÓIDES POR ESI-MS MODO NEGATIVO PROPOSTO POR TIBERTE E COLABORADORES (2007)

5.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO EM CLAE

A resolução entre os picos cromatográficos, o tempo de análise e a relação custo benefício dos insumos utilizados, foram os fatores determinantes para a escolha das condições cromatográficas. Utilizou-se como fase móvel acetonitrila (A) e solução de ácido fórmico 0,5% (B). Todos os solventes utilizados possuem grau CLAE.

As condições de análise que atenderam aos requisitos supracitados foram obtidas utilizando um volume injeção de 10 μ L, temperatura do forno de 35° C, fluxo de 1,3 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, detecção em 346 nm e um gradiente linear de eluição de 10% A / 90% B a 60% A e 40% B em 8 minutos. O condicionamento das condições cromatográficas entre as injeções foi realizado em 1,5 minutos.

A adequabilidade do sistema foi determinada conforme preconizado pela Farmacopéia Americana 31ª edição, através da análise de 6 injeções consecutivas de uma mesma amostra. Os parâmetros de análise deste teste foram obtidos automaticamente através do software ChemStation versão B.04.01, os quais podem ser visualizados na Tabela 8.

TABELA 8 – PARÂMETROS AVALIADOS PARA VERIFICAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE QUERCITRINA

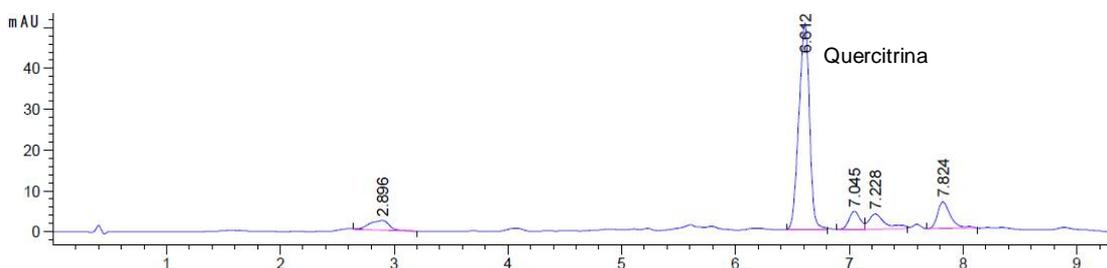
Substância	Tr (min)	K'	Rs ± DPR	T	N	Área ± DPR
Quercitrina	6,47 ± 0,09	13,38 ± 0,10	2,1 ± 0,05	1,45 ± 0,07	18407 ± 8,14	197,63 ± 0,50

DADOS: Condições de análise: Fase móvel: Acetonitrila (A) e solução a 0,5% de ácido fórmico (B); gradiente linear de eluição de 10% a 60% de A em 8 minutos; Detecção em 346 nm; Temperatura de forno: 35°C; Volume de injeção: 10 µl; Coluna: Zorbax Bônus RP (100 x 3,0 mm, 3,5µm de partícula). Amostra utilizada: Extrato bruto de *S. microglossa*.

NOTA: Tr – tempo de retenção; K': fator de retenção; Rs: resolução; DPR: desvio padrão relativo; T: fator de cauda; N: número de pratos teóricos.

O fator de retenção ($K' = 13,38$) indica que o analito em interesse apresentou alguma afinidade pela fase estacionária, não sendo eluído no volume morto da coluna. A corrida cromatográfica demonstrou uma boa separação dos picos ($R_s = 2,1$), além de uma boa simetria (fator de cauda $T = 1,45$), contribuindo desta forma para uma eficiente quantificação do analito.

O método desenvolvido demonstrou uma excelente eficiência da coluna, com número de pratos teóricos superiores a 18.000. Estes resultados demonstram que o método proposto apresenta uma boa eficiência de separação e que possui a capacidade de detectar analitos, mesmo em baixa concentração. O desvio padrão relativo (DPR) dos valores de áreas para as 6 determinações foi de 0,5%, o que indica que o sistema cromatográfico apresenta reprodutibilidade. O método demonstrou ser capaz de analisar o analito em questão com reprodutibilidade e confiança aceitável, estando apto a submeter-se ao processo de validação analítica (Figura 41).

FIGURA 41 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DE *Solidago microglossa* UTILIZADO PARA AVALIAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DO MÉTODO

NOTA: Condições de análise: Fase móvel: Acetonitrila (A) e solução a 0,5% de ácido fórmico (B); gradiente linear de eluição de 10% a 60% de A em 8 minutos; Detecção em 346 nm; Temperatura de forno: 35°C; Volume de injeção: 10 µl; Coluna: Zorbax Bônus RP (100 x 3,0 mm, 3,5µm de partícula). Amostra utilizada: Extrato bruto de *S. microglossa*.

5.4.1 Seletividade

A seletividade da metodologia foi analisada por duas maneiras: por meio do uso do detector de arranjo de diodo (DAD) e pelo método da adição do padrão. A escolha da utilização de dois modelos de avaliação deste parâmetro foi devido à necessidade de garantir uma resposta seletiva ao analito em meio à complexidade da matriz analisada.

5.4.1.1 Uso de detector de arranjo de diodo

O extrato bruto de Arnica do mato e o padrão primário de quercitrina foram analisados através do detector de diodos, o qual estava programado para realizar varredura de 200 a 400 nm, e integrar a 346nm. Os espectros obtidos para o padrão primário de quercitrina foram comparados ao espectro do pico de quercitrina na amostra de extrato bruto. O ensaio comprovou que não há diferenças entre os espectros analisados, conforme demonstrado na Figura 42, letra C. Na mesma figura, podemos verificar que o software ChemStation realizou o cálculo da correlação espectral destes picos, demonstrando que estes espectros possuem 100% de correlação, o que permite-se dizer que os espectros dos picos cromatográficos são idênticos (letra D – Figura 42).

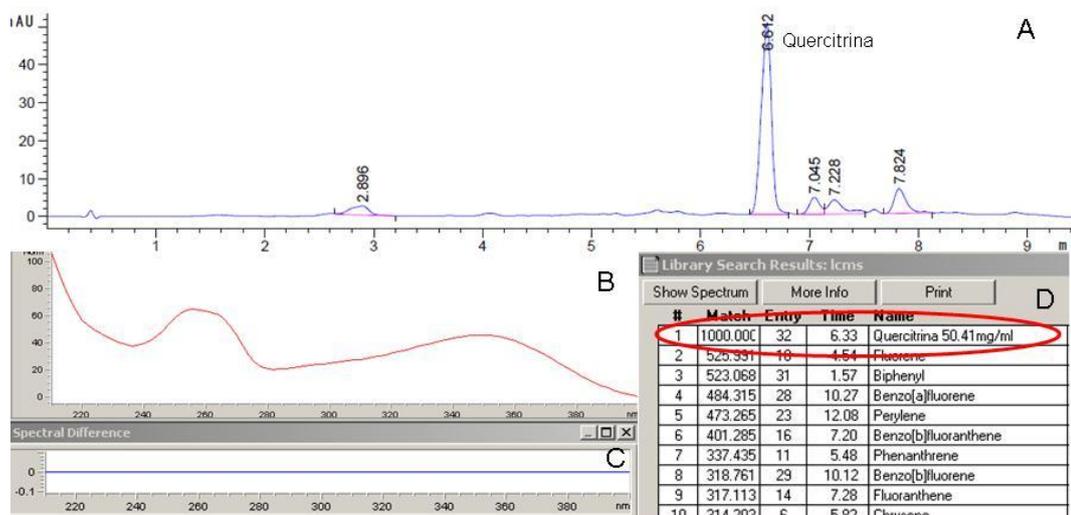


FIGURA 42 - COMPARAÇÃO ESPECTRAL ENTRE O PICO DE QUERCITRINA NO EXTRATO BRUTO DE ARNICA DO MATO E O PADRÃO PRIMÁRIO DE QUERCITRINA

NOTA: A – Cromatograma do extrato bruto; B – Espectro do pico de quercitrina na amostra do extrato bruto (TR= 6,6min); C – Diferença espectral entre o pico de quercitrina na amostra e o padrão de

quercitrina; D – Tabela contendo a correlação espectral entre o pico de quercitrina na amostra em comparação aos espectros dos padrões cadastrados na base de dados.

O pico de quercitrina a ser quantificado na amostra do extrato bruto foi analisado em relação à sua pureza por meio do software ChemStation. O software faz a leitura dos espectros em diferentes pontos do pico selecionado (letra B Figura 43), realizando a comparação desses espectros. O pico é considerado puro nos casos em que não há diferenças nos espectros obtidos, situação representada pela permanência de todos os pontos analisados dentro da zona verde, conforme pode ser visualizado na Figura 43 letra C.

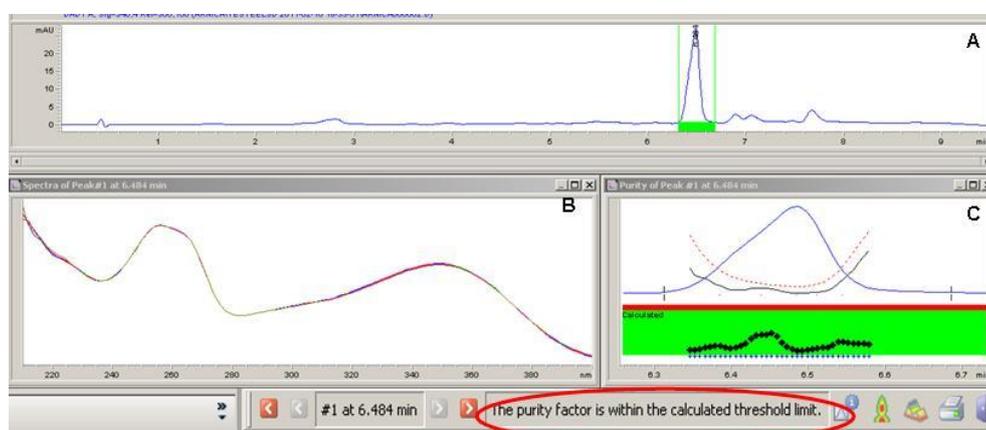


FIGURA 43 - VERIFICAÇÃO DA PUREZA DO PICO DE QUERCITRINA NO EXTRATO BRUTO DE ARNICA DO MATO PELO SOFTWARE *CHEMSTATION* VERSÃO B.04.01

NOTA: A – Cromatograma do extrato bruto; B – Espectros coletados em diferentes pontos do pico selecionado; C – Comparação dos espectros obtidos em diferentes pontos de um mesmo pico

Pela análise através do detector de arranjo de diodos verificamos que o pico correspondente a quercitrina na amostra está puro (Figura 43).

5.4.1.2 Método de adição do padrão

A determinação da seletividade pelo método de adição do padrão baseia-se na comparação dos coeficientes angulares obtidos entre duas curvas analíticas, sendo uma construída através da utilização de soluções padrão, e outra através de uma amostra do extrato fortificada com padrões analíticos.

A primeira curva foi construída utilizando solução padrão de quercitrina em três níveis de concentração: 20, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A segunda curva foi preparada utilizando o extrato bruto de *S. microglossa* diluído em acetonitrila/água (70:30) na proporção de 1:1500 (v/v) e posteriormente fortificado com padrão nos mesmos níveis de concentração da solução padrão. As amostras foram preparadas em triplicatas, e as médias das áreas obtidas estão apresentadas na Tabela 9.

TABELA 9 – ÁREAS OBTIDAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA SOLUÇÕES DA AMOSTRA DE EXTRATO BRUTO DE ARNICA FORTIFICADA E PARA AS SOLUÇÕES PADRÕES

Média das áreas (n=3)		
Níveis de Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Solução padrão	Solução de Extrato bruto fortificado
20	89,696	98,4417
50	215,599	222,848
100	399,69	395,81

Através da análise de regressão linear dos dados obtidos (Tabela 9) foram determinadas as curvas analíticas e suas respectivas equações das retas (Figura 44). Com posse destes dados, realizou-se a comparação dos coeficientes angulares, a qual está disposta na Tabela 10.

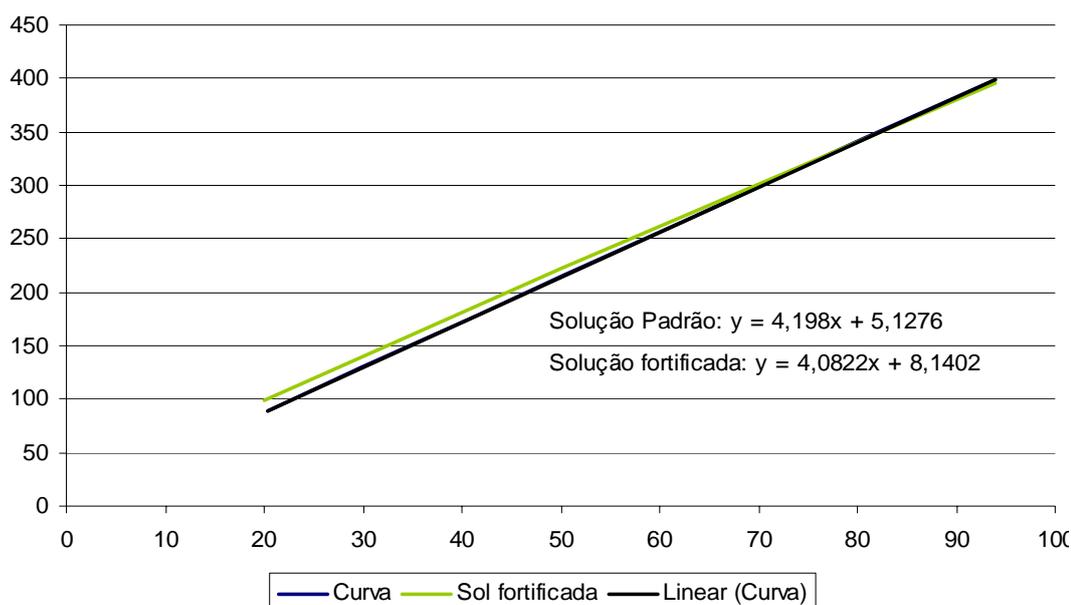


FIGURA 44 - CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS NO ENSAIO DE SELETIVIDADE PELO MÉTODO DE ADIÇÃO DO PADRÃO PARA AS AMOSTRAS DE EXTRATO BRUTO FORTIFICADO E PADRÃO DE QUERCITRINA

TABELA 10 – COMPARAÇÃO DOS COEFICIENTES ANGULARES OBTIDOS A PARTIR DE CURVAS ANALÍTICAS DE SOLUÇÃO PADRÃO DE QUERCITRINA E DO EXTRATO BRUTO DE *S. microglossa* FORTIFICADO PARA AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE

Coefficientes angulares		
	Solução padrão	Solução de Extrato bruto fortificado
Coefficientes angulares	4,198	4,0822
Média		4,1401
DP		0,08188
CV(%)		1,978

O coeficiente de variação (CV%) entre os coeficientes angulares encontrados foi aproximadamente 1,98%. Este valor está dentro dos limites pré-estabelecidos (CV < 5%), comprovando, portanto, que os compostos da matriz não interferem na resposta do analito, sendo o método desenvolvido considerado seletivo.

5.4.2 Linearidade e intervalo

Para determinação da linearidade foram construídas três curvas de calibração utilizando solução padrão de quercitrina, contemplando as seguintes concentrações 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de quercitrina. As médias das áreas encontradas para cada nível de concentração estão dispostas na tabela 11.

TABELA 11 – MÉDIA DAS ÁREAS DOS PICOS DE QUERCITRINA REFERENTES À CURVA DE LINEARIDADE

	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)							
	10	20	30	40	50	60	80	100
Média da áreas	44,5	91,4	135,9	178,2	221,0	257,8	347,5	426,5
DP	0,56	1,31	1,85	2,83	0,24	0,30	2,92	0,74
CV (%)	1,26	1,43	1,36	1,59	0,11	0,12	0,84	0,17

O coeficiente de variação (CV%) disposto na tabela 11, avalia a dispersão dos dados de cada nível de concentração. Em todos os pontos analisados o CV é menor que 5%, demonstrando que o método possui precisão em todos os níveis de concentração e que não houve dispersão nos resultados obtidos. Através da comparação entre os resultados obtidos e os dados teóricos foi construído o gráfico de resíduos. Este gráfico, disposto na Figura 45, sugere que a pequena variação entre os resultados obtidos em cada nível de concentração são decorrentes de erros aleatórios, pois os pontos do gráfico apresentam-se homogeneamente dispersos em relação ao eixo zero, não demonstrando nenhum comportamento tendencioso.

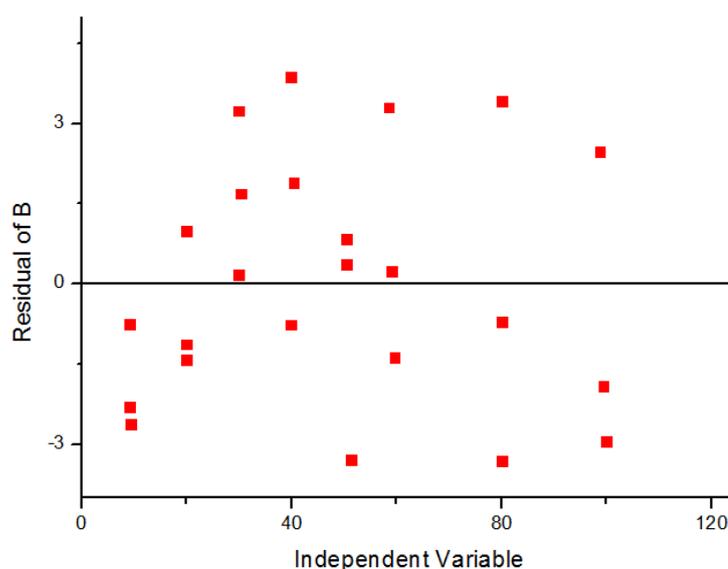


FIGURA 45 - GRÁFICO DE RESÍDUOS DA CURVA DE LINEARIDADE DA QUERCITRINA

O próximo passo foi submeter os resultados obtidos à análise de regressão linear (Figura 46), onde foram obtidas a equação da reta e os coeficientes de correlação (R). Os limites de confiança e predição foram calculados para avaliar o controle da relação entre as variáveis. A análise de variância foi determinada para calcular as incertezas ao longo da curva de calibração, para verificar a aceitabilidade do modelo linear utilizado e para validar a regressão. O teste de variância de resíduos e os limites de confiança e de predição foram realizados no nível de confiança de 95% (GASPARETTO, 2010).

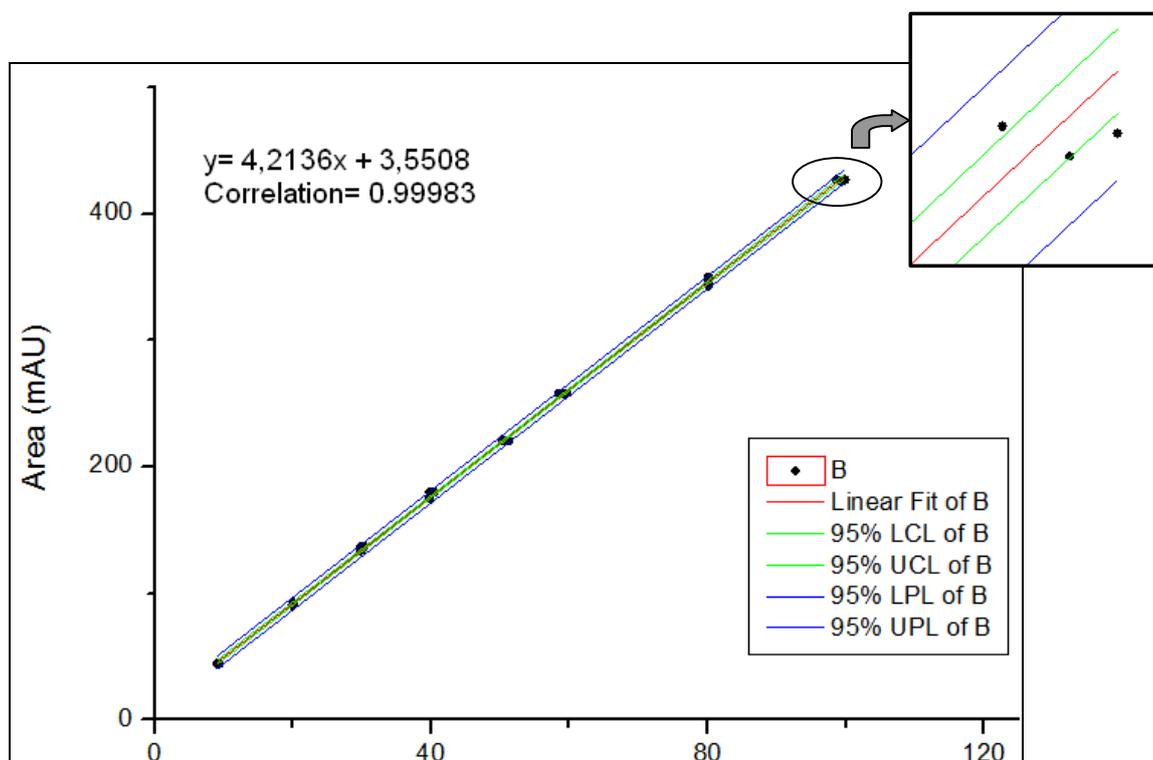


FIGURA 46 - CURVA DE LINEARIDADE DA QUERCITRINA

NOTA: Correlation: correlação; B: resultados obtidos experimentalmente; Linear fit: curva de tendência; LCL: limite de confiança inferior; UCL: limite de confiança superior; LPL: limite de predição inferior; UPL: limite de predição superior.

TABELA 12 – ANÁLISE POR REGRESSÃO LINEAR DA CURVA DE LINEARIDADE DA QUERCITRINA

Intercepto		Slope		Estatística		Valor de F	
Valor	DP	Valor	DP	R	R ²	F Value	Prob >F
7,34612	0,92515	4,22784	0,01644	0,99983	0,99965	66139,91	0

NOTA: DP: desvio padrão; R: coeficiente de correlação.

A curva de linearidade foi aceita por meio do teste de ajuste do modelo linear com valores nulos de probabilidade de $F \geq F$ crítico tabelado ($\text{Prob} > F$), presente na Tabela 12. Os resultados obtidos neste ensaio demonstram que as variações entre as áreas encontradas para um mesmo nível da curva são independentes dos níveis de concentração, comprovando desta forma que o modelo linear utilizado é adequado para análise do analito.

No teste de validade de regressão, o F encontrado de 66139,9 (tabela 12) foi significativamente maior que o F crítico tabelado (2,03), sugerindo desta forma que a inclinação da reta de regressão está correlacionada às variações de concentração (GASPARETTO, 2010).

A curva de calibração foi analisada através dos gráficos de controle de regressão com nível de segurança de 95% (figura 46), sendo considerada controlada. Apesar de alguns pontos da curva permanecerem fora dos limites de confiança, nenhum ponto extrapolou os limites superiores e inferiores de predição. Esses resultados comprovam que a curva construída possui exatidão e que as variações de áreas observadas em cada nível de concentração são decorrentes exclusivamente de erros aleatórios e não sistemáticos.

Com base nos resultados obtidos, comprovou-se que o método foi linear dentro da faixa de concentração de 10 a $100\mu\text{g.mL}^{-1}$, e que pode ser utilizado com segurança na determinação do analito quercitrina.

5.4.3 Precisão

5.4.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade do método foi determinada pelos resultados de 9 determinações em três níveis de concentrações. Amostras do extrato bruto foram diluídas, em triplicata, utilizando a acetonitrila:água (70:30) nas proporções de 1:750; 1:300; 1:190 (v/v).

As médias das áreas encontradas para cada nível de concentração, e o cálculo do desvio padrão relativo estão apresentados na Tabela 13. Todos os

valores de desvio padrão encontrados ficaram abaixo dos limites pré-estabelecidos (DPR $\leq 5\%$). Desta forma, o método proposto pode ser considerado preciso para o ensaio de repetibilidade.

TABELA 13 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE DO ANALISTA 01

Diluição do Extrato bruto	Média das áreas encontradas	DP	DPR (%)
1:750	84,021	0,273	0,325
1:300	196,24	4,363	2,22
1:190	327,87	0,259	0,079

5.4.3.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi determinada pela comparação dos resultados de precisão de dois analistas diferentes em dias diferentes.

Na Tabela 14 estão reportados os resultados obtidos pelos dois analistas, demonstrando que o método desenvolvido é preciso, uma vez que não apresentou valores de desvio padrão relativos acima do limite especificado pela ANVISA e ICH (5%).

TABELA 14 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Diluição do Extrato bruto	Analista 1 Áreas \pm DP	Analista 2 Áreas \pm DP	Média \pm DP	DPR%
1:750	84,02 \pm 0,273	79,77 \pm 0,14	81,89 \pm 2,33	2,85
1:300	196,24 \pm 4,363	203,51 \pm 0,27	199,88 \pm 4,81	2,40
1:190	327,87 \pm 0,259	328,01 \pm 0,24	327,94 \pm 0,23	0,07

5.4.4 Exatidão

Para a determinação da exatidão foi realizado o método de adição do padrão. Foram analisadas 3 concentrações diferentes contemplando o intervalo

linear, sendo que as análises foram realizadas em triplicatas. As amostras foram preparadas conforme Tabela 15. Para o cálculo da concentração teórica de cada nível foi utilizada a média das concentrações do extrato bruto de arnica obtida no ensaio de precisão intermediária ($14,06 \text{ mg.mL}^{-1}$).

TABELA 15 – CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES TEÓRICAS NO ENSAIO DE EXATIDÃO

	Conc 1		Conc 2		Conc 3	
	Vol (μL)	Qtde (μg)	Vol (μL)	Qtde (μg)	Vol (μL)	Qtde (μg)
Extrato bruto 1:300	150	7,03	150	7,03	150	7,03
Padrão Quercitrina $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$	150	15	450	45	850	85
Acetonitrila:Água (70:30)	700	-	400	-	-	-
Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	22,03		52,03		92,03	

Os resultados de exatidão foram avaliados em porcentagem de recuperação. A concentração teórica, a encontrada e a porcentagem de recuperação estão dispostos na Tabela 16.

TABELA 16: RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EXATIDÃO

Amostras	Concentrações de quercitrina (mg.ml^{-1})		
	Concentração teórica (mg.ml^{-1})	Concentração média encontrada ($\text{mg.ml}^{-1} \pm \text{DP}$)	Recuperação (%)
Concentração 01	22,03	$22,14 \pm 0,02$	100,5
Concentração 02	52,03	$52,59 \pm 0,03$	101,1
Concentração 03	92,03	$94,41 \pm 0,54$	102,6

Analisando os resultados provenientes das três concentrações, conclui-se que o método proposto apresenta exatidão, pois todos os resultados estão dentro do limite esperado, ou seja, os índices de recuperação do padrão adicionado permaneceram dentro da faixa de 95% a 105%.

5.4.5 Robustez

Para análise da robustez da metodologia, alguns parâmetros foram modificados tais como temperatura do forno ($\pm 2^\circ \text{C}$), fluxo e composição da fase móvel ($\pm 0,05 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ e $\pm 0,1\%$ na proporção de ácido fórmico) e estabilidade da solução de análise.

Para a realização deste ensaio, foi utilizado o extrato bruto de arnica, o qual foi analisado em sextuplicata nas condições otimizadas e modificadas. Os valores das áreas encontradas foram comparados através de análises estatísticas como CV%, teste *t* de student e ANOVA (one way). Os resultados do ensaio de robustez encontram-se dispostos na Tabela 17.

TABELA 17: RESULTADOS OBTIDOS MODIFICAÇÕES REALIZADAS NO ENSAIO DE ROBUSTEZ

Parâmetro de Robustez	Média das Áreas \pm DP	Concentração ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) \pm DP	CV%	Valor de <i>p</i> *	Valor de <i>p</i> **
Temperatura do forno					
33° C	198,206 \pm 4,120	13,86 \pm 0,293	2,079	0,0600	0,8766
Otimizado: 35° C	197,283 \pm 0,988	13,79 \pm 0,335	2,388		
37° C	197,751 \pm 4,062	13,83 \pm 0,289	2,054	0,8899	0,9827
Fluxo					
1,25ml.min ⁻¹	198,152 \pm 4,158	13,85 \pm 0,296	2,098	0,1039	0,8762
Otimizado: 1,20ml.min ⁻¹	197,283 \pm 0,988	13,79 \pm 0,335	2,388		
1,35ml.min ⁻¹	199,284 \pm 3,77	13,93 \pm 0,268	1,892	0,3329	0,4823
Variação Ac. fórmico					
0,4%	196,277 \pm 4,090	13,722 \pm 0,291	2,084	0,059	0,7852
Otimizado: 0,5%	197,283 \pm 0,988	13,79 \pm 0,335	2,388		
0,6%	195,780 \pm 5,619	13,68 \pm 0,3995	2,87	0,067	0,626
Estabilidade de solução					
Tempo zero do preparo	197,283 \pm 0,988	13,79 \pm 0,335	2,388		
Após 24horas do preparo	198,424 \pm 0,336	13,87 \pm 0,024	0,170	0,587	0,5670

NOTA: *Teste *t* de student ** ANOVA – fator único

Analisando os dados dispostos na Tabela 17, pode-se perceber que pequenas alterações nos parâmetros temperatura do forno, fluxo e composição da fase móvel, não são capazes de influenciar a quantificação do analito. Os resultados obtidos demonstraram exatidão e precisão (pois os valores de p permaneceram superiores a 0,05 para o teste t e ANOVA e os coeficientes de variação foram menores que 5%), comprovando que o método é robusto para estas modificações.

5.4.6 Determinação do teor de quercitrina nas amostras de matéria-prima, extrato bruto, extrato liofilizado e frações

Após a validação do método o teor de quercitrina foi quantificado na matéria-prima, extrato bruto líquido, extrato bruto liofilizado e frações. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 18 e 19.

TABELA 18: TEOR DE QUERCITRINA NAS AMOSTRAS

Teor de Quercitrina			
	Matéria-Prima (mg/g)	Extrato bruto (mg/mL)	Extrato liofilizado (mg/g)
Quercitrina	24,3 mg/g	13,44	106,8

TABELA 20: TEOR DE QUERCITRINA NAS FRAÇÕES

Teor de Quercitrina nas Frações (mg/mL)					
	Hexânica	Clorofórmio	Acetato de Etila	Hidroalcoólica	Hidroalcoólica ácida
Quercitrina	-	0,019	2,616	6,531	1,191

A quantificação do marcador selecionado (quercitrina) nas amostras utilizadas nos testes biológicos e toxicológicos é de grande valia para padronização da composição destas amostra, o que pode auxiliar na garantia da reprodutibilidade dos ensaios realizados e dos resultados obtidos.

5.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.5.1 Formação do complexo de fosfomolibdênio

O método baseia-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) na presença de substâncias antioxidantes, com a posterior formação de um complexo verde entre fosfato-molibdênio(V), em pH ácido. Esse complexo é, então, quantificado espectrofotometricamente a 695nm.

Os resultados obtidos para o extrato bruto e frações foram calculados em porcentagem em relação à atividade apresentada pela vitamina C. Os resultados estão dispostos na Figura 47.

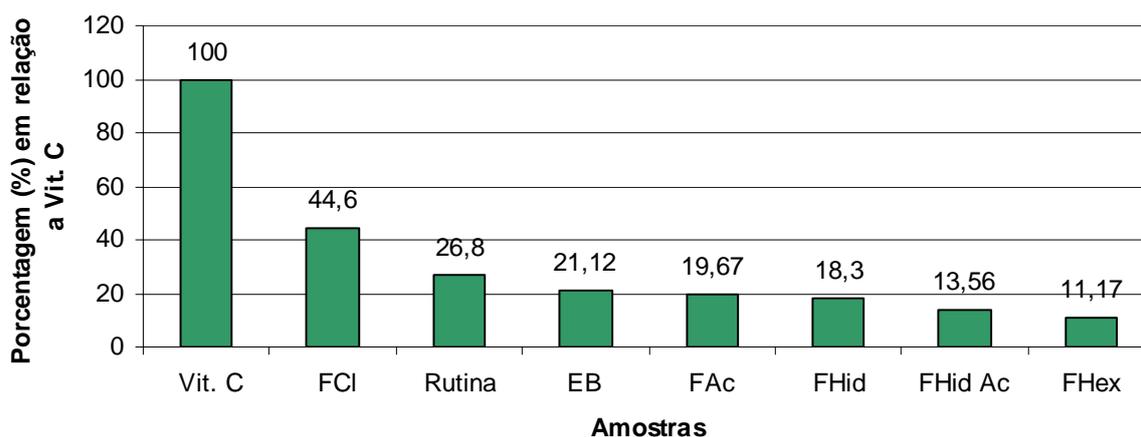


FIGURA 47 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *S. microglossa* POR MEIO DO MÉTODO DO COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO
 NOTA: Vit. C: vitamina C (controle positivo); FCl: fração clorofórmio; Rutina: rutina (controle positivo); EB: extrato bruto de *S. microglossa*; FAc: fração acetato de etila; FHid: fração hidroalcoólica; FHid AC: fração hidroalcoólica ácida; FHex: fração hexano.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 47), comprovou-se que todas as frações apresentam atividade antioxidante quando analisadas pelo método do complexo do fosfomolibdênio. A fração clorofórmio apresentou atividade antioxidante superior ao flavonóide rutina (44% e 26,8%, respectivamente). O extrato bruto e as frações acetato de etila, hidroalcoólica e hidroalcoólica ácida apresentaram atividade moderada em relação aos controles positivos vitamina C e rutina.

5.5.2 Redução do Radical de DPPH

Os resultados obtidos no ensaio de redução do radical de DPPH estão expressos como IC50, significando a concentração (em µg) da amostra necessária para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH. Portanto, quanto menor o valor de IC50 de uma amostra, maior o seu poder antioxidante.

Na Tabela 21 estão reportados os valores de IC50 e o desvio padrão (DP) das análises realizadas para o extrato bruto e frações.

TABELA 21 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO RADICAL DE DPPH

AMOSTRA	IC50 (µg.mL ⁻¹)± DP	Teste de Tukey (p<0,05)*
Extrato bruto	21,39 ± 0,039	a7
Fração Hexano	> 1000	
Fração Clorofórmio	1,75 ± 0,18	a1
Fração Acetato de etila	3,32 ± 0,04	a2
Fração Hidroalcoólica	4,45 ± 0,04	a5
Fração Hid ácida	4,03 ± 0,10	a3
Vitamina C	4,294 ± 0,031	a4
Rutina	6,630 ± 0,026	a6

Nota: IC 50: concentração (em µg) da amostra necessária para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH; *Amostras classificadas em diferentes grupos diferem estatisticamente.

Analisando os resultados verificamos que a espécie vegetal *Solidago microglossa* possui uma atividade antioxidante do seu extrato bruto moderada, ao passo que, as frações clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica ácida possuem uma forte atividade antioxidante, a qual é superior à atividade da vitamina C e rutina. Possivelmente a presença de flavonóides nas amostras analisadas contribuiu para a atividade antioxidante apresentada.

Alguns estudos científicos já foram realizados com o intuito de elucidar a relação estrutura-atividade dos flavonóides e o seu poder antioxidante. Sabe-se,

porém, que o potencial antioxidante pode ser determinado por vários fatores, dos quais a quelação de ferro e a remoção dos radicais livres são os mais importantes (KALEGARI, 2008; LIMA, 2010).

Lima (2010) demonstrou que o flavonóide quercitrina, o marcador selecionado para a espécie em estudo, é mais eficiente no combate ao radical HO• gerado pela fotodecomposição do H₂O₂ em relação aos compostos rutina, campferol, fisetina, quercetina e miricetina.

5.6 ENSAIO *In Vitro* DA ATIVIDADE DA ENZIMA TIROSINASE

A influência exercida pelo extrato de *Solidago microglossa* sobre a atividade da enzima tirosinase foi determinada através da quantificação da formação de dopacromo a partir da L-DOPA.

O extrato bruto demonstrou ser capaz de estimular a ação da enzima tirosinase ($p < 0,01$) nas três concentrações testadas (100, 300 e 1000 mg.Kg⁻¹), conforme demonstrado na Figura 48.

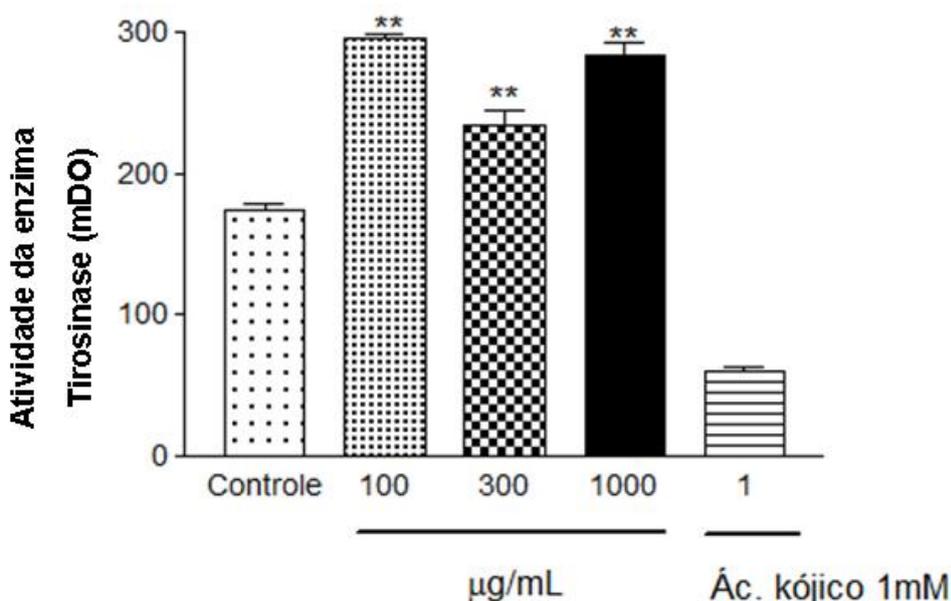


FIGURA 48 - ATIVIDADE DA ENZIMA TIROSINASE FRENTE AO EXTRATO BRUTO DE *Solidago microglossa*

Nota: ** $p < 0,01$ (teste de ANOVA seguidos por teste de Newman-Kewls).

A indução da formação de dopacromo pelo extrato bruto de *Solidago microglossa* é um resultado bastante promissor, principalmente ao se considerar a composição da amostra utilizada. O extrato bruto de arnica é composto em grande parte por derivados fenólicos, entre eles os flavonóides. Sabe-se que os polifenóis são substâncias que frequentemente apresentam a capacidade de inibir a atividade da tirosinase, através da inibição competitiva da enzima ou pela quelação do íon cobre (cofator enzimático). Além disso, segundo Chang (2009) substâncias com atividades antioxidantes podem agir reduzindo a dopaquinona à L-DOPA, evitando desta forma a síntese de dopacromo e de melanina. Algumas substâncias possuem ainda ações diferenciadas dependendo da dose e ou local de ação, como por exemplo a quercitrina, a qual é capaz de induzir a expressão da tirosinase celular (NAGATA *et al.*, 2004) e de inibir fortemente a sua atividade enzimática *in vitro* (XIE *et al.*, 2003).

Diante do disposto, constata-se que, apesar dos possíveis mecanismos supracitados de inibição da atividade da tirosinase apresentado por algumas substâncias presentes na composição do extrato bruto, este foi capaz de promover uma ação antagônica a esperada. Não foi encontrado, até o presente momento, dados em literatura os quais justifiquem esses resultados.

Desta forma, novas pesquisas utilizando o extrato bruto e as frações de *Solidago microglossa* deverão ser realizadas com o intuito de identificação dos responsáveis por essa ação biológica, bem como para determinação da real capacidade da utilização de *Solidago microglossa* e/ou substâncias isoladas no tratamento de patologias pigmentares.

5.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE AOS NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

Os resultados das análises das atividades das frações e extrato bruto de *S. microglossa* estão dispostos na Tabela 22.

TABELA 22 – MORTALIDADE DE *Artemia salina* E ESTIMATIVA DE LC50 APÓS A EXPOSIÇÃO AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *S. microglossa*

Amostra	Mortalidade / Concentração						LC50 µg/mL	Intervalo de confiança 95%
	10 µg/mL	100 µg/mL	300 µg/mL	500 µg/mL	800 µg/mL	1000 µg/mL		
EB	0	0	-	-	-	1	> 1.000	-
FH	0	0	-	-	-	9	>1.000	-
FC	0	3	-	-	-	30	251,19	195,19 – 323,25
FAC	0	0	2	1	3	30	809,79	744,50 – 880,80
FHid	0	7	-	-	-	30	184,78	129,49 – 263,70
FHid.Ac	1	3	-	-	-	23	398,11	279,41 – 567,22
Sulfato de quinidina	16	10	-	-	-	18	50,12	35,80 - 70,16

NOTA: EB: extrato bruto de *S. microglossa*; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FAC: fração acetato de etila; FHid: fração hidroalcoólica; FHid Ac: fração hidroalcoólica ácida; Sulfato de quinidina: controle positivo. N= 30 por dose

Segundo Meyer *et al* (1982), extratos com valores de LC50 inferiores a 1000 µg/mL são considerados bioativos, ou seja, apresentam toxicidade frente aos náuplios de *Artemia salina*. De acordo com os dados apresentados na Tabela 22, verificou-se que as frações clorofórmio, acetato de etila, hidroalcoólica e hidroalcoólica ácida são bioativas contra o microcrustáceo. Os controles negativos, feitos com os solventes de cada fração, não exerceram influência sobre os resultados, uma vez que nenhum náuplio morreu na presença dos mesmos.

Vários estudos tentam correlacionar a bioatividade dos extratos frente à *Artemia salina* com possíveis atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida (MACRAE *et al.*, 1988; CÁCERES *et al.*, 1998) e parasiticida (CHAN-BACAB *et al.*, 2003). Esse ensaio também tem sido utilizado na avaliação prévia de extrato de plantas com possíveis atividades antitumorais (RUPPRECHT *et al.*, 1990; SIQUEIRA *et al.*, 2001). Desde modo, recomenda-se futuras avaliações dessas possíveis atividades nas frações as quais se apresentaram bioativas frente à *Artemia salina*.

5.8 TOXICIDADE ORAL AGUDA EM RATOS

O ensaio de toxicidade foi realizado através da administração oral do extrato de *S. microglossa* nas doses de 50, 300 e 2000 mg.kg⁻¹, as quais equivalem respectivamente a 5,34 mg.kg⁻¹ 32,04 mg.kg⁻¹; 213,6 mg.kg⁻¹ de quercitrina.

5.8.1 Avaliação comportamental, consumo de água, ração e variação de peso

Durante o período de análise (14 dias), não foram detectadas alterações comportamentais ou sinais de toxicidade nos animais, em ambos os sexos, nas doses testadas. Além disso, não houve registro de mortes nos grupos.

Os ratos machos apresentaram um comportamento alimentar semelhante entre os animais controle e grupos testes, conforme podemos visualizar nas Figuras 49 e 50. A administração do extrato de *S. microglossa* em ratos machos não promoveu diferenças no consumo de água e de ração nas doses testadas, conforme comprovado pela análise estatística apresentada na Tabela 23. Após 14 dias da administração oral de uma dose única do extrato de *S. microglossa* não foi observada alteração na variação de peso dos machos entre os grupos analisados.

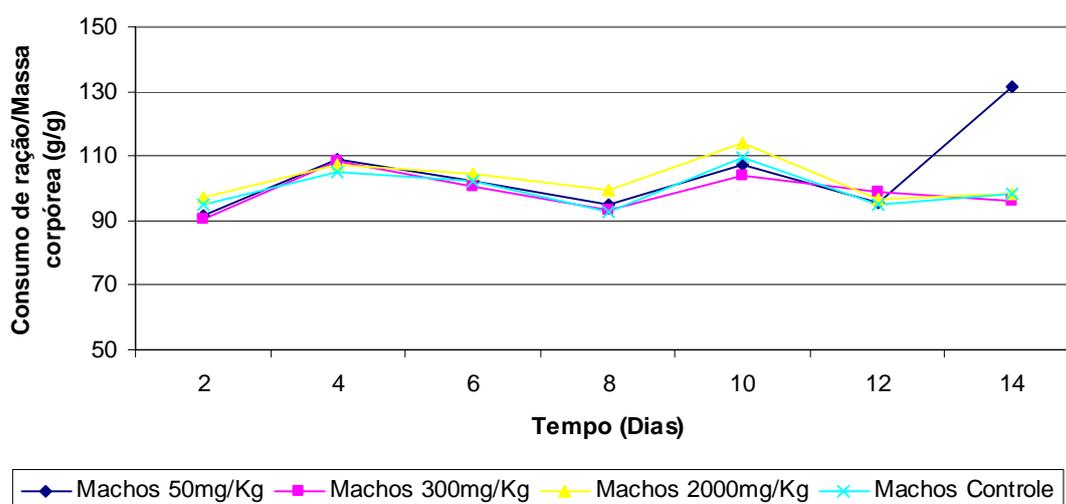


FIGURA 49 – ACOMPANHAMENTO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE *S. microglossa* SOBRE O CONSUMO DE RAÇÃO EM RATOS MACHOS DURANTE OS 14 DIAS DE OBSERVAÇÃO

NOTA: N=10 por dose. Valores correspondem a média dos resultados encontrados.

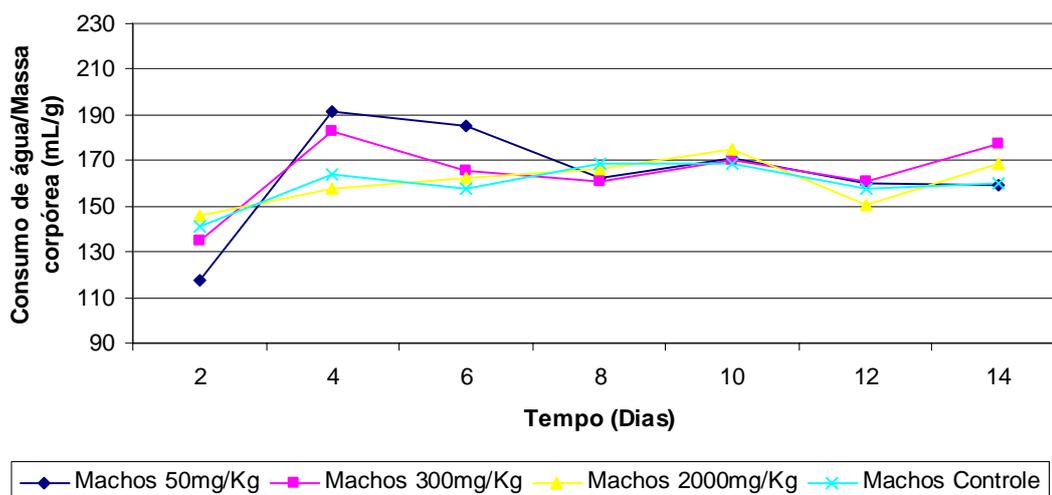


FIGURA 50 - ACOMPANHAMENTO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE *S. microglossa* SOBRE O CONSUMO DE ÁGUA EM RATOS MACHOS DURANTE OS 14 DIAS DE OBSERVAÇÃO

NOTA: N=10 por dose. Valores correspondem a média dos resultados encontrados.

TABELA 23: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE *Solidago microglossa* EM RATOS MACHOS SOBRE OS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS APÓS 14 DIAS

GRUPO	Variação Peso (%) \pm DP	Consumo de ração (g) \pm DP	Consumo de água (mL) \pm DP
Controle	20,23 \pm 1,86	30,28 \pm 2,68	48,86 \pm 5,36
50 mg.kg ⁻¹	18,88 \pm 3,52	30,72 \pm 2,52	51,00 \pm 7,19
300 mg.kg ⁻¹	17,21 \pm 1,40	30,73 \pm 2,14	51,46 \pm 7,38
2000 mg.kg ⁻¹	17,73 \pm 2,84	30,77 \pm 2,44	50,61 \pm 6,42

NOTA: Os valores expressam média \pm DP. N=10 por sexo e dose

As diferentes doses administradas nas ratas fêmeas geraram comportamentos alimentares divergentes entre os grupos testes e controle (Figuras 51 e 52). O consumo do extrato promoveu um aumento do consumo de ração em relação ao grupo controle em todas as doses testadas, porém esse aumento foi estatisticamente significativo apenas nas doses 50 mg.kg⁻¹ (p= 0,0010) e 300mg.kg⁻¹ (p= 0,0250). Em relação ao consumo de água, todas as doses administradas promoveram um aumento no consumo, sendo significativa estatisticamente em relação ao grupo controle (p= 0,0002 para os grupos 50, 300 e 2000 mg.kg⁻¹). Possivelmente, esse maior consumo de água está associado ao aumento da ingestão de ração. Os resultados destas análises estão reportados na Tabela 24.

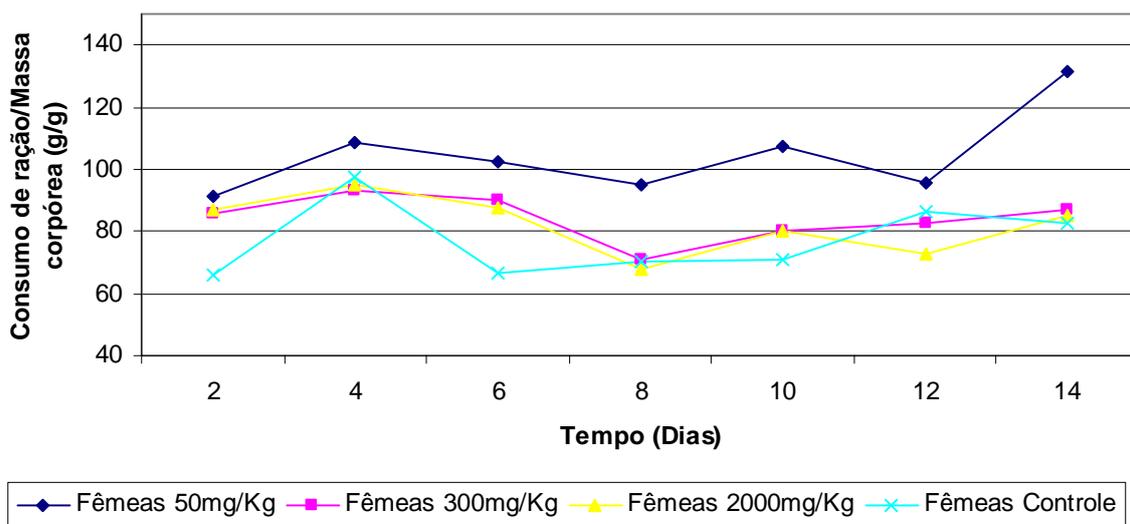


FIGURA 51 - ACOMPANHAMENTO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE *S. microglossa* SOBRE O CONSUMO DE RAÇÃO EM RATOS FÊMEAS DURANTE OS 14 DIAS DE OBSERVAÇÃO

NOTA: N=10 por dose. Valores correspondem a média dos resultados encontrados.

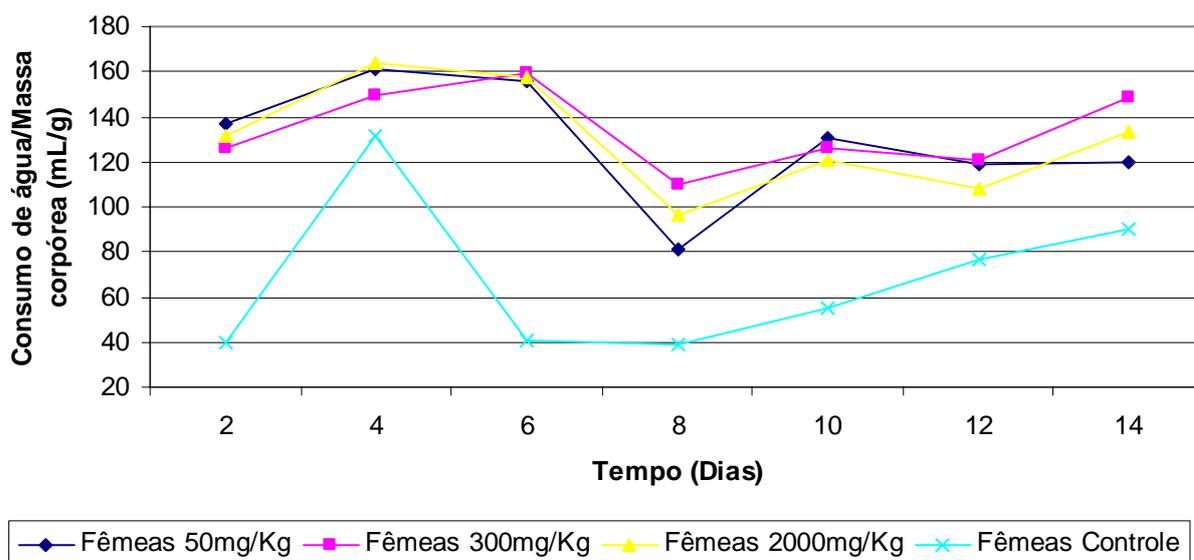


FIGURA 52 - ACOMPANHAMENTO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE *S. microglossa* SOBRE O CONSUMO DE ÁGUA EM RATOS FÊMEAS DURANTE OS 14 DIAS DE OBSERVAÇÃO

NOTA: N=10 por dose. Valores correspondem a média dos resultados encontrados.

TABELA 24 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE *Solidago microglossa* EM RATOS FÊMEAS SOBRE OS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

GRUPO	Varição Peso (%) \pm DP	Consumo de ração (g) \pm DP	Consumo de água (mL) \pm DP
Controle	4,39 \pm 3,99	20,17 \pm 3,16	17,54 \pm 7,11
50 mg.Kg ⁻¹	10,39 \pm 2,94	24,75 \pm 3,86*	32,86 \pm 5,90*
300 mg.Kg ⁻¹	6,50 \pm 2,99	23,46 \pm 2,80*	36,61 \pm 5,94*
2000 mg.Kg ⁻¹	10,59 \pm 3,74	22,11 \pm 2,27	34,38 \pm 5,91*

NOTA: Os valores expressam média \pm DP. N=10 por sexo e dose. *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey)

Após os 14 dias de observação, as ratas tratadas com extrato de arnica apresentaram uma maior variação de peso em relação ao grupo controle nas três doses testadas. Porém essa variação não foi considerada significativa através da análise estatística realizada (Tabela 24).

5.8.2 Hemograma

A avaliação do hemograma durante a fase de determinação da toxicidade da droga *in vivo* é de grande importância clínica. Uma vez que as células sanguíneas representam papel essencial na manutenção das funções vitais do organismo, faz-se necessária a investigação dos efeitos da droga nos mecanismos de produção, diferenciação e especialização celular destas células.

Os parâmetros hematológicos nos machos tratados com as diferentes doses de *S. microglossa* não foram alterados em relação ao grupo controle (tabelas 25 e 26), exceto para a determinação dos leucócitos a qual apresentou um quadro de leucopenia na dose de 2000 mg.kg⁻¹ (Figura 53).

TABELA 25 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE *Solidago microglossa* EM RATOS MACHOS SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Parâmetros Hematológicos (Média ± DP)							
GRUPO	Hemácias (10 ³ /mm ³)	HGB (g/dL)	HCT (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	RDW (%)
Controle	8,66 ± 0,63	14,85 ± 1,25	43,6 ± 3,11	50,6 ± 0,89	17,3 ± 0,28	34,1 ± 0,65	14,5 ± 0,45
50 mg.Kg ⁻¹	8,65 ± 0,48	14,76 ± 0,41	44,94 ± 2,05	52,0 ± 1,49	16,43 ± 0,76	31,2 ± 1,86	14,8 ± 0,63
300mg.Kg ⁻¹	8,66 ± 0,46	14,37 ± 1,30	44,33 ± 1,60	51,3 ± 1,63	17,09 ± 0,82	33,3 ± 1,12	15,0 ± 0,28
2000mg.Kg ⁻¹	8,87 ± 0,27	14,86 ± 0,43	44,70 ± 1,22	50,4 ± 0,70	16,74 ± 0,38	33,2 ± 0,45	15,0 ± 0,60

NOTA: HGB: dosagem de hemoglobina; HCT: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular média; RDW: variação do volume de glóbulos vermelhos. Os valores expressam média ± DP. N=10 por sexo e dose.

TABELA 26: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE *Solidago microglossa* EM RATOS MACHOS SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS (Continuação)

Parâmetros Hematológicos (Média ± DP)					
GRUPO	Leucócitos (10 ³ /mm ³)	Plaquetas (10 ³ /mm ³)	PCT (%)	MPV (fm ³)	PDW (%)
Controle	8,5 ± 0,34	1051,5 ± 10,88	0,33 ± 0,01	6,54 ± 0,40	11,54 ± 0,49
50 mg.Kg ⁻¹	10,2 ± 0,97	1053,4 ± 101,6	0,33 ± 0,3	6,34 ± 0,25	11,45 ± 1,04
300mg.Kg ⁻¹	5,49 ± 3,57	1056,0 ± 79,64	0,33 ± 0,02	6,4 ± 0,17	11,89 ± 0,77
2000mg.Kg ⁻¹	0,9 ± 0,78*	1019,3 ± 69,27	0,34 ± 0,02	6,63 ± 0,13	12,03 ± 0,65

NOTA: PCT: plaquetócrito; MPV: volume plaquetário médio; PDW: coeficiente de variação do volume plaquetário médio. Os valores expressam média ± DP. N=10 por sexo e dose. *p<0,05 (teste Kruskal-Wallis).

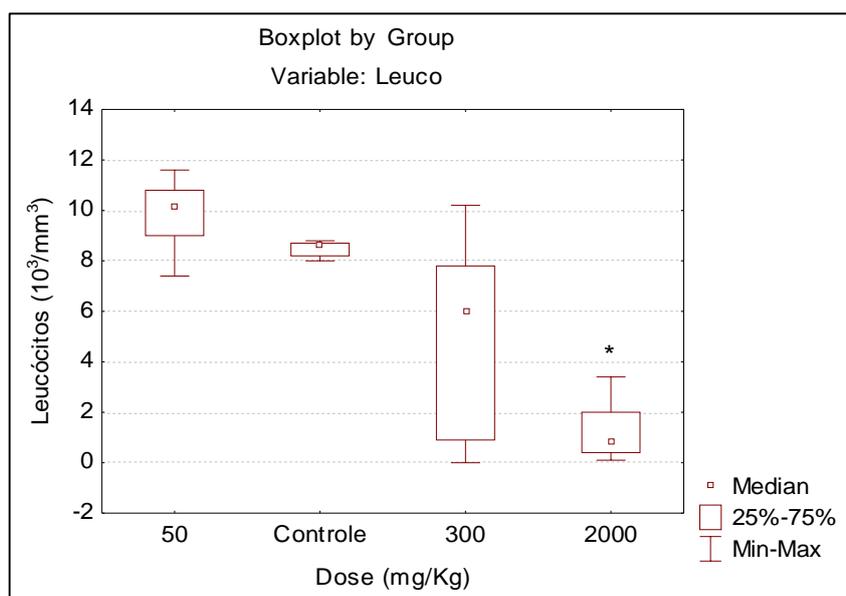


FIGURA 53 - NÍVEIS SANGUÍNEOS DE LEUCÓCITOS ($10^3/\text{mm}^3$) EM RATOS MACHOS TRATADOS COM DIFERENTES DOSES DO EXTRATO DE ARNICA

NOTA: N=10. * $p < 0,05$ (teste Kruskal-Wallis)

Nas ratas fêmeas foram detectadas alterações apenas em algumas constantes corpusculares (Tabelas 27 e 28). Nos grupos das fêmeas, as doses de 50 e 300 mg.kg^{-1} apresentaram hemácias com hiper Cromia ($p=0,0014$ e $p= 0,0019$ respectivamente). Estes resultados podem sugerir a presença de macrócitos, pois apesar destes grupos apresentarem valores superiores de hemoglobina corpuscular média (HCM), a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) não excede a do grupo controle, indicando que as hemácias não transportam hemoglobina além da sua capacidade de saturação. Os grupos tratados com extrato de arnica apresentaram resultados de volume corpuscular médio (VCM) superiores aos valores encontrados para o grupo controle. Porém, somente a dose de 300 mg.kg^{-1} obteve um resultado estatisticamente diferente ($p= 0,0102$), indicando a presença de hemácias macrocíticas.

TABELA 27 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE *Solidago microglossa* EM RATOS FEMÊAS SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Parâmetros Hematológicos (Média ± DP)							
GRUPO	Hemácias (10 ³ /mm ³)	HGB (g/dL)	HCT (%)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	RDW (%)
Controle	7,80 ± 0,21	13,55±0,75	39,48± 2,02	50,6±1,34	17,58± 0,60	34,7 ± 0,23	13,98±0,55
50 mg.Kg ⁻¹	8,33 ± 0,85	14,36±0,62	43,87± 3,52	52,1±1,46	18,87±0,22*	35,74± 1,58	14,42± 0,74
300mg.Kg ⁻¹	7,53 ± 0,63	13,89±0,62	40,12± 2,90	53,3±0,95*	18,84±0,54*	35,3 ± 0,86	13,67± 0,44
2000mg.Kg ⁻¹	7,75 ± 0,41	14,08±0,56	40,44± 2,17	52,2±1,32	18,29±0,54	35,0± 0,70	14,14± 0,29

NOTA: HGB: dosagem de hemoglobina; HCT: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular média; RDW: variação do volume de glóbulos vermelhos. Os valores expressam média ± DP. N=10 por sexo e dose. *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey)

TABELA 28 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE *Solidago microglossa* EM RATOS FÊMEAS SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS (Continuação)

Parâmetros Hematológicos (Média ± DP)					
GRUPO	Leucócitos (10 ³ /mm ³)	Plaquetas (10 ³ /mm ³)	PCT (%)	MPV (fm ³)	PDW (%)
Controle	3,8 ± 1,07	901,5 ± 27,15	0,3355 ± 0,01	6,32 ± 0,28	11,1 ± 0,37
50 mg.Kg ⁻¹	2,44 ± 1,54	939,33 ± 255,74	0,3336 ± 0,03	6,46 ± 0,18	11,81 ± 0,54
300mg.Kg ⁻¹	6,06 ± 4,25	876,2 ± 194,99	0,3357 ± 0,02	6,42 ± 0,44	11,17 ± 0,50
2000mg.Kg ⁻¹	2,96 ± 1,45	944,6 ± 101,21	0,3357 ± 0,02	6,53 ± 0,23	11,53 ± 0,65

NOTA: PCT: plaquetócrito; MPV: volume plaquetário médio; PDW: coeficiente de variação do volume plaquetário médio. Os valores expressam média ± DP. N=10 por sexo e dose.

Faz-se necessário a realização de estudos de toxicidade crônica para confirmação dos efeitos visualizados no hemograma. Os resultados obtidos até o momento, não inviabilizam o uso oral do extrato de arnica. Visto que, Facury Neto e colaboradores (2004) demonstraram que uma de 16,1 mg.kg⁻¹ do extrato aquoso de arnica é efetiva no processo de cicatrização em ratos. Neste ensaio, os machos apresentaram um quadro de leucopenia apenas na maior dose analisada (2000

mg.kg⁻¹), o que corresponde a uma posologia de 140g do extrato liofilizado (ou 14,952g de quercitrina) para um adulto de 70 kg. Além disso, as alterações apresentadas pelas fêmeas (hemácias macrocíticas) não são, a princípio, de grande significado clínico.

5.8.3 Avaliação da função hepática

A avaliação hepática foi realizada através das análises das enzimas AST, ALT e fosfatase alcalina. Em uma lesão hepática essas enzimas podem extravasar para o plasma (por diversos mecanismos) ocasionando elevação de suas concentrações plasmáticas. Por esse motivo a análise destas enzimas são úteis e importantes no diagnóstico e monitoramento de uma lesão hepática (BRANCO, 2009).

A dose de 50 mg.kg⁻¹ apresentou valores superiores de AST em relação aos grupos controles, de cerca de 7% e 10% para machos e fêmeas respectivamente. Nos grupos 300 e 2000 mg.kg⁻¹, houve uma diminuição nesses valores, na faixa de 21% e 8% para os machos e cerca de 25% e 19% para as fêmeas respectivamente. Essas variações não foram estatisticamente significantes (Figuras 54 e 55).

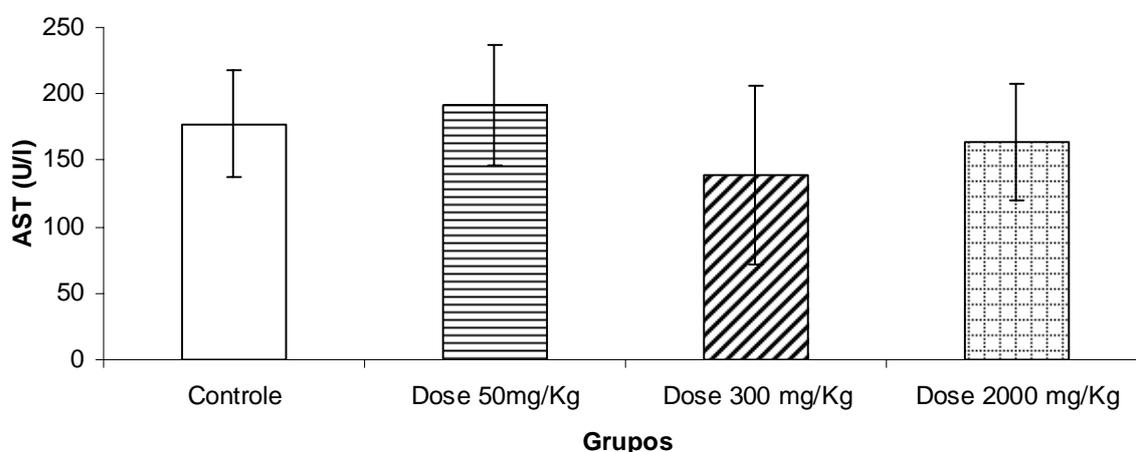


FIGURA 54: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE *S. microglossa* EM RATOS MACHOS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA ENZIMA ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)

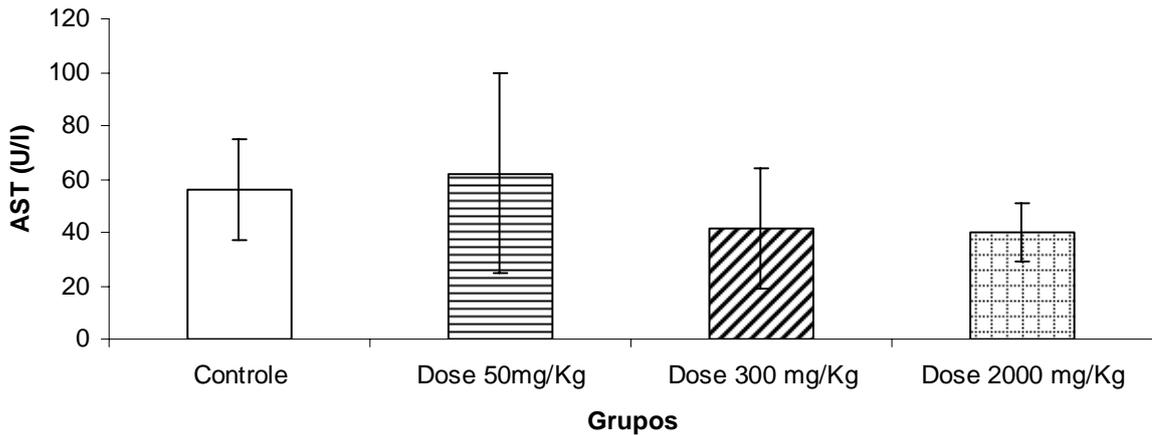


FIGURA 55: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE *S. microglossa* EM RATOS FÊMEAS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA ENZIMA ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)

Os valores de ALT não apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratados com extrato de *S. microglossa* e seus respectivos controles, conforme pode ser visualizado nas Figuras 56 e 57.

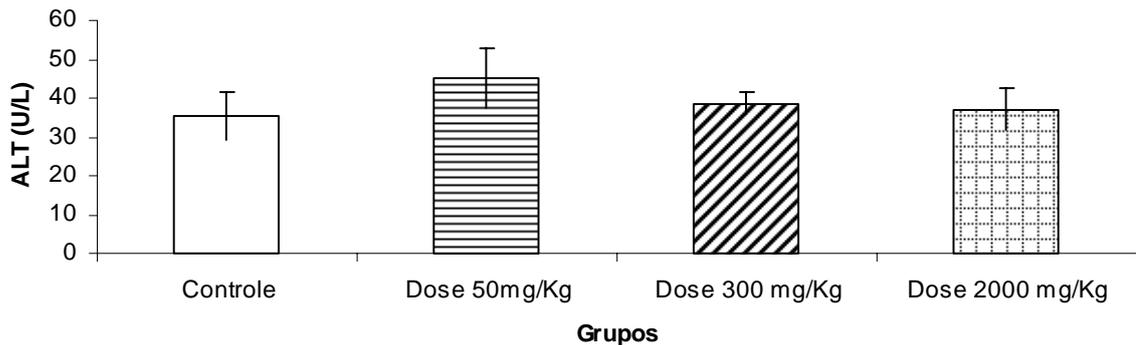


FIGURA 56: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE *S. microglossa* EM RATOS MACHOS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA ENZIMA ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT)

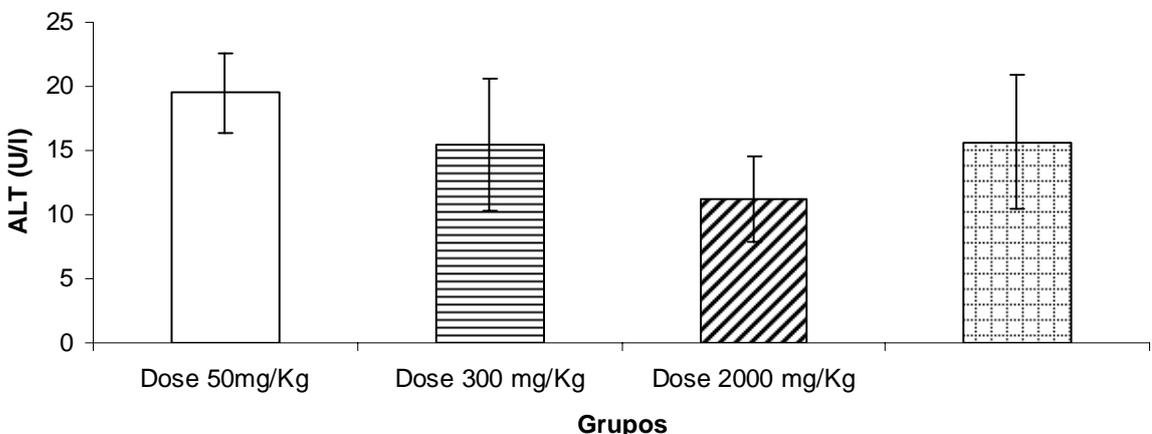


FIGURA 57: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE *S. microglossa* EM RATOS FÊMEAS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA ENZIMA ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT)

Os ratos machos que receberam extrato de *S. microglossa* obtiveram um aumento nos níveis de fosfatase alcalina em relação ao grupo controle de cerca de 39%, 23% e 16% para as doses 50, 300 e 2000 mg.kg⁻¹ respectivamente. Em contrapartida, nas fêmeas houve uma diminuição nos teores de fosfatase alcalina em relação ao grupo controle de cerca de 17% para a dose de 50 mg.kg⁻¹ e de 16% para as doses de 300 e 2000 mg.kg⁻¹. Apesar desta variação encontrada, esses resultados não foram considerados estatisticamente significativos de acordo com a metodologia empregada (Figura 58 e 59).

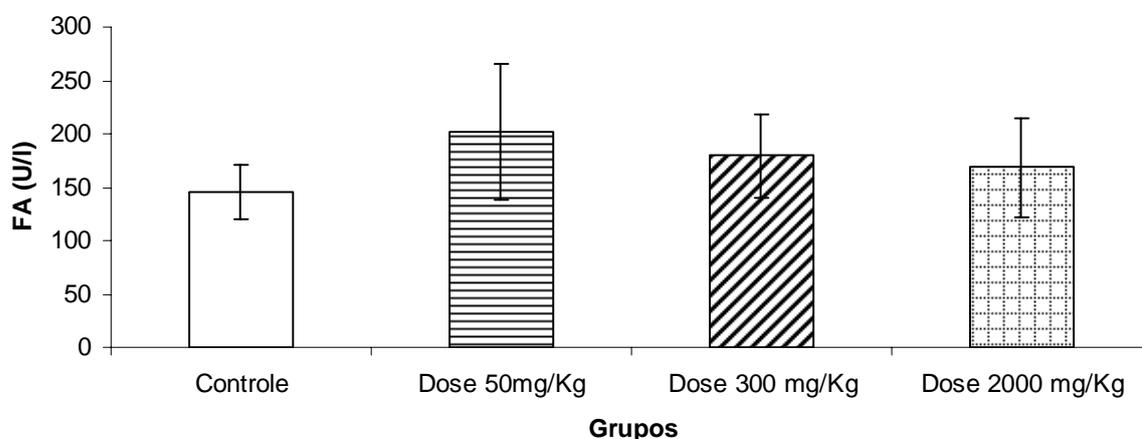


FIGURA 58: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO DE *S. microglossa* EM RATOS MACHOS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA (FA)

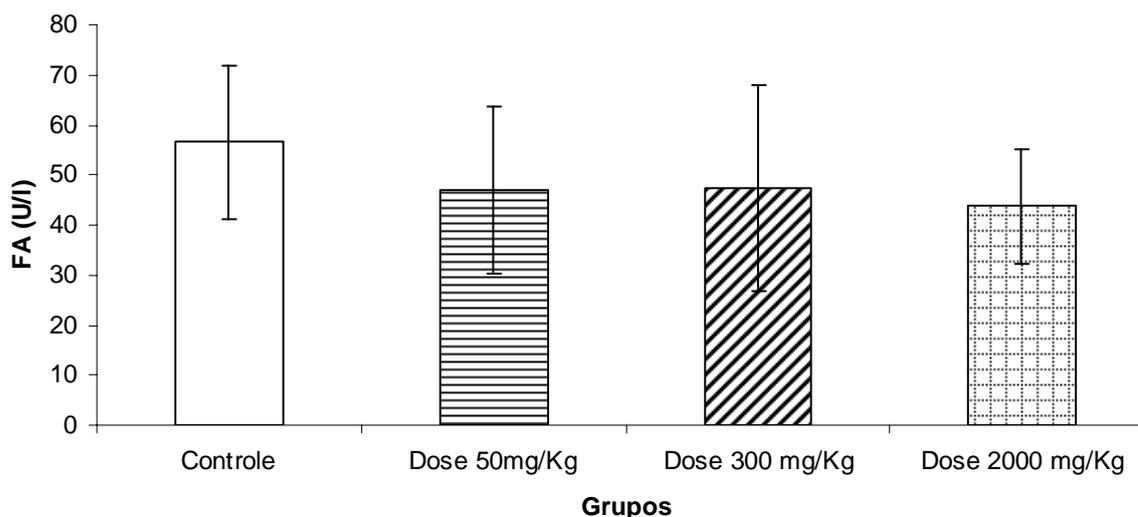


FIGURA 59: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO DE *S. microglossa* EM RATOS FÊMEAS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA (FA)

Os resultados obtidos para as enzimas hepáticas demonstram que não há indícios de alteração da função hepática nos animais (machos e fêmeas) com a utilização oral de *S. microglossa*.

5.8.4 Avaliação da função renal

A avaliação da função renal é realizada frequentemente através da determinação da concentração plasmática de substâncias normalmente excretadas pelos rins. A avaliação dos níveis de uréia é um dos testes mais comumente utilizado pra esta finalidade juntamente com a dosagem de creatinina (LANIS *et al.*, 2008).

A uréia, produto final do catabolismo de aminoácidos e proteínas, é gerada no fígado através do ciclo da uréia e posteriormente é secretada para a corrente sanguínea. Noventa por cento da uréia plasmática é filtrada pelo glomérulo, podendo ser excretada na urina ou reabsorvida pelos túbulos renais (LANIS *et al.*, 2008). Cerca de 40 a 80% da uréia é reabsorvida, fato este dependente do estado de hidratação e do fluxo urinário (HENRY, 2008).

A administração oral do extrato não provocou alterações nos níveis de proteínas totais em ambos os sexos. Nas ratas fêmeas houve uma diminuição da concentração plasmática de uréia (Tabela 29). As doses 50 e 300 mg.kg⁻¹ foram consideradas estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle por meio da análise de ANOVA seguida por teste de Tukey ($p=0,0486$ e $p= 0,0296$), os quais podem ser visualizados na Figura 60.

Níveis diminuídos de uréia podem ser observados nos casos de insuficiência hepática, deficiência no ciclo enzimático da uréia e por desordens que aumentem a excreção da uréia (LANIS *et al.*, 2008). A hipótese de insuficiência hepática pode ser desconsiderada, uma vez que não foi observado neste estudo, alterações nas enzimas hepáticas destes animais. Deficiências no ciclo enzimático da uréia são patologias relativamente raras, sendo uma causa muito pouco provável. Níveis diminuídos de uréia plasmática também podem ser decorrentes de condições de nutrição insuficiente ou devido à alta ingestão de líquidos (HENRY, 2008). As ratas

tratadas com extrato de *S. microglossa* ingeriram uma maior quantidade de água em relação ao grupo controle (Tabela 24). Este fato pode justificar os níveis de uréia diminuídos nestes grupos (Figura 60). Os ratos machos, os quais consumiram quantidades de água semelhantes ao grupo controle, apresentaram níveis de uréia equivalentes ao grupo controle.

TABELA 29 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE *Solidago microglossa* EM RATOS MACHOS E FÊMEAS SOBRE A FUNÇÃO RENAL

Avaliação da Função Renal (Média ± DP)				
GRUPO	Machos		Fêmeas	
	Proteínas totais (g/dl)	Uréia (mg/dL)	Proteínas totais (g/dl)	Uréia (mg/dL)
Controle	6,16 ± 0,60	45,75 ± 5,44	4,54 ± 0,79	42,25 ± 8,54
50 mg.Kg ⁻¹	6,59 ± 0,41	56,60 ± 4,93	3,93 ± 1,40	29,27 ± 6,22*
300mg.Kg ⁻¹	6,43 ± 0,43	54,17 ± 9,99	3,24 ± 0,85	28,22 ± 7,31*
2000mg.Kg ⁻¹	6,25 ± 0,33	51,43 ± 4,03	3,33 ± 0,73	30,33 ± 5,67

NOTA: Os valores expressam média ± DP. N=10 por sexo e dose. *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey)

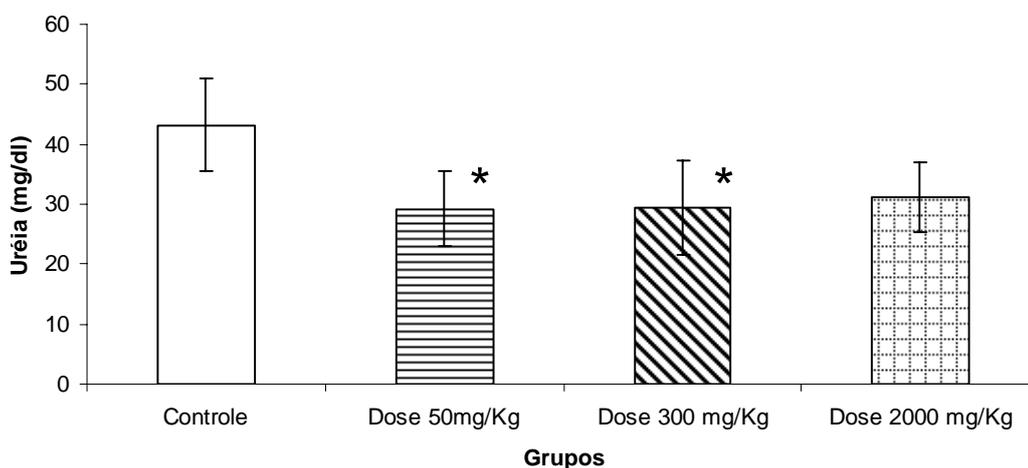


FIGURA 60 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO DE *S. microglossa* EM RATOS FÊMEAS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA URÉIA

NOTA: N=10. *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey)

5.8.5 Provas bioquímicas

O tratamento com as diferentes doses de *S. microglossa* demonstraram algumas alterações bioquímicas apenas para o sexo feminino (Tabela 31). Para os animais machos não houve diferenças na avaliação dos parâmetros colesterol, triglicerídeos, HDL e glicose entre os animais controles e os que receberam dose do extrato de arnica (Tabela 30).

Nos parâmetros avaliados, destaca-se a capacidade do extrato em promover a diminuição do colesterol no sexo feminino na dose de 2000 mg.kg⁻¹ ($p=0,0210$), conforme pode ser visualizado na Figura 61.

TABELA 30 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE *Solidago microglossa* EM RATOS MACHOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Parâmetros Bioquímicos				
GRUPO	Colesterol (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Glicose (mg/dL)
Controle	67,6 ± 7,40	39,0 ± 12,47	41,0 ± 3,37	54,5 ± 15,81
50 mg.Kg ⁻¹	62,6 ± 13,14	40,44 ± 4,39	41,8 ± 5,65	68,9 ± 43,2
300mg.Kg ⁻¹	60,11 ± 17,08	46,11 ± 9,01	38,87 ± 4,01	65,94 ± 32,05
2000mg.Kg ⁻¹	66,2 ± 7,93	39,33 ± 8,35	38,8 ± 5,43	50,5 ± 30,02

NOTA: Os valores expressam média ± DP. N=10 por dose.

TABELA 31 -EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE *Solidago microglossa* EM RATOS FÊMEAS SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Parâmetros Bioquímicos				
GRUPO	Colesterol (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Glicose (mg/dL)
Controle	39,6 ± 5,94	19,2 ± 3,11	19,2 ± 3,11	81,2 ± 20,64
50 mg.Kg ⁻¹	29,83 ± 9,89	18,67 ± 6,56	18,67 ± 6,56	75,38 ± 29,31
300mg.Kg ⁻¹	33,44 ± 6,95	17,0 ± 5,48	17,0 ± 5,48	63,5 ± 9,33
2000mg.Kg ⁻¹	25,89 ± 4,67*	15,4 ± 3,66	15,4 ± 3,66	65,67 ± 16,69

NOTA: Os valores expressam média ± DP. N=10 por dose. * $p<0,05$ (ANOVA seguido de Tukey)

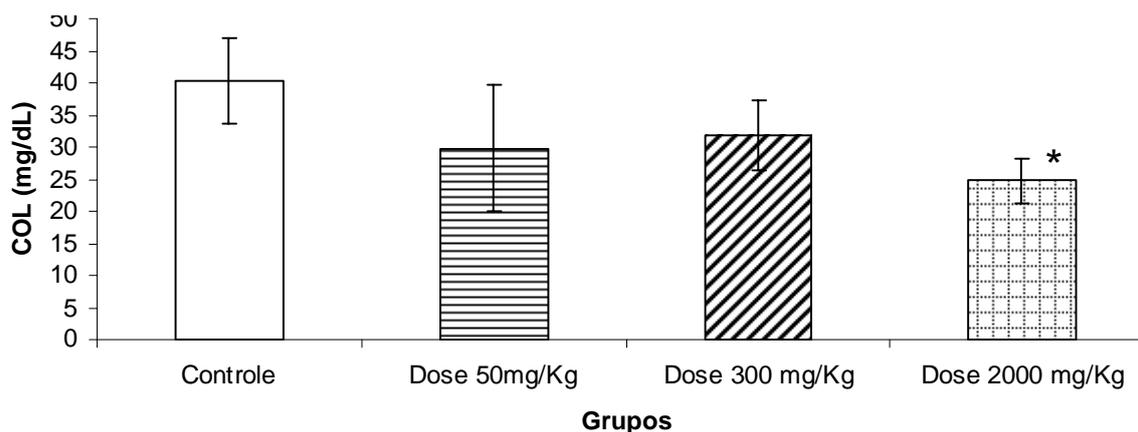


FIGURA 61 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DO EXTRATO BRUTO DE *S. microglossa* EM RATOS FÊMEAS SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE COLESTEROL PLASMÁTICO

NOTA: N=10. * $p < 0,05$ (ANOVA seguido de Tukey)

O ensaio toxicológico demonstrou que as fêmeas possuem uma maior sensibilidade ao extrato testado, pois apresentaram alterações em alguns parâmetros analisados. Estudos anteriores já determinaram que algumas drogas são capazes de induzir efeitos tóxicos e farmacológicos predominantemente em um dos sexos do animal, devido a variações no metabolismo em machos e fêmeas (SMITH, HOOK, 1983; HU *et al*, 1993; ELFARRA *et al*, 1998, BENEDITO, 1999).

Steiner *et al* (1995) estudaram as variações sexo-dependentes de proteínas no fígado de ratos Wistar. Utilizando técnicas de eletroforese de duas dimensões, comprovaram a existência, no fígado, de seis proteínas exclusivas nos machos e uma nas fêmeas, os quais podem estar associados aos efeitos toxicológicos divergentes sexo-dependentes.

Experimentos específicos são necessários para uma melhor compreensão dos resultados obtidos, investigando-se uma possível relação entre os efeitos detectados e o sexo dos animais.

5.8.6 Avaliação histopatológica

A administração oral aguda de *S. microglossa* nas doses de 50, 300 e 2000 mg.Kg⁻¹, não promoveu alterações histológicas compatíveis com sinais de toxicidade nos órgãos analisados (fígado, estômago e rins).

O extrato hidroalcoólico de *Solidago microglossa* demonstrou ser relativamente seguro, com baixo grau de toxicidade pré-clínica, nos casos de exposição aguda ao fitoterápico. Estudos de toxicidade crônica pré-clínica deverão ser realizados para melhor avaliação dos efeitos deste extrato com sua utilização em longo prazo.

6 CONCLUSÃO

A matéria-prima vegetal *Solidago microglossa* DC, pertencente à família Compositae, possui em sua composição química aminogrupos, antraquinonas, saponinas, mucilagem, taninos, flavonóides, triterpenos e cumarinas. Na determinação do *fingerprint* da espécie utilizando CLAE-DAD, visualizou-se a presença do flavonóide quercitrina, bem como de 6 prováveis compostos da classe dos ácidos hidroxicinâmicos e/ou seus derivados.

O método de quantificação da quercitrina, marcador selecionado para droga vegetal, demonstrou-se rápido, seletivo, preciso e exato. O estudo de robustez indicou que pequenas alterações na composição e fluxo da fase móvel, bem como na temperatura do forno não influenciam no desempenho do método.

A espécie apresentou potente atividade antioxidante quando avaliada pelos métodos de redução do complexo de fosfomolibdênio e do radical DDPH. As frações clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica ácida revelaram uma atividade mais expressiva do que a vitamina C no método de DPPH.

O extrato bruto demonstrou capacidade de induzir positivamente a atividade da enzima tirosinase nas concentrações de 100, 300 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando uma possível utilização no tratamento de patologias pigmentares.

A avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* demonstrou que o extrato bruto e a fração hexano não são ativas em relação ao microcrustáceo. Ao passo que, as frações clorofórmio, acetato de etila, hidroalcoólica e hidroalcoólica ácida demonstraram-se bioativas, apresentando valores de LC50 abaixo de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

No ensaio de toxicidade oral aguda em ratos utilizando extrato bruto de *Solidago microglossa*, foi possível visualizar que a administração deste provocou:

- Aumento da ingestão de ração e de água, sem comprometimento da variação do peso nos grupos das ratas fêmeas.

- Presença de hemácias macrocíticas (dose de 300 mg.kg^{-1}) e hemácias com hiperchromia (doses de 50 e 300 mg.kg^{-1}) no grupo das ratas fêmeas.

- Leucopenia nos ratos machos na dose de 2000 mg.kg^{-1} .

- Diminuição do teor de colesterol plasmático (dose 2000 mg.kg^{-1}) nas ratas fêmeas.

- Diminuição do teor de uréia plasmática (doses 50 e 300 mg.kg⁻¹) nas ratas fêmeas, possivelmente causada pela maior ingesta de água.

A espécie demonstrou ser segura no caso de exposição aguda a droga vegetal, uma vez que não foram evidenciadas alterações significativas nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos.

REFERÊNCIAS

- ALVARES, A. A. A. **Influência da adição de extrato de *Yucca schidigera* nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de cães adultos consumindo duas rações comerciais**. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- AMARAL, J. G.; GOUVÊA, D. R.; SAKAMOTO, H. T.; GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Identificação dos metabólitos majoritários das folhas de *Eremanthus glomerulatus* Less. (Asteraceae) por CLAE-DAD- EM e -EM/EM. **31ª Reunião anual da sociedade brasileira de Química**, 2008.
- BAGATINI, M. D.; FACHINETTO, J. M. ; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Citotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. vol.19, p.632-636, 2009.
- BENEDITO, M.A.C. Sex-dependent differences in the activities of acetylsalicylic acid-esterases in mouse kidneys. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. vol.32, p.275-278. 1999.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**. v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BIANCO, E.M. **Química e potencial antioxidante de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., Caesalpiaceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.
- BRANCO, A. C. S. C. **Avaliação da toxicidade crônica pré-clínica de *Foeniculum vulgare* Mill**. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução n 899 de 29 maio de 2003 que determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 11 mai 2009
- BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução nº 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. Acesso em: 11 mai 2009.
- BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Orientações sobre o item 8.3 da RDC 48/04**. Brasília, 2004b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/orientacao_RDC48.pdf>. Acesso em: 11 mai 2009.
- BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução nº 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. Acesso em: 11 abr 2010.
- CÁCERES, A.; LÓPEZ, B.; GONZÁLEZ, S.; BERGER, I.; TADA, I.; MAKI, J. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to

bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 195–202, 1998.

CAVALCANTI, A. M. **Determinação da toxicidade pré-clínica do extrato aquoso bruto das partes aéreas isentas de inflorescência de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) em ratos.** 206 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

CARVALHO, J. L. de C. **Contribuição ao estudo fitoquímica e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae.** 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

CARVALHO, J. L. de C. **Desenvolvimento tecnológico de insumos, isolamento de marcadores e validação analítica dos derivados do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae.** 182f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Braz. J. Pharmacogn.**, Brasil, v.18(2), p. 314-319, 2008.

COMALADA, M.; CAMUESCO, D.; SIERRA, S.; BALLESTER, I.; XAUS J.; GÁLVEZ, J.; ZARZUELO, A. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-κB pathway. **Eur. J. Immunol**, v.35, p. 584-592, 2005.

CAMUESCO, D.; COMALADA, M.; RODRÍGUEZ-CABEZAS, M. E.; NIETO, A. LORENTE, M. D.; CONCHA, A.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. **British Journal of Pharmacology** v.143, p. 908–918, 2004.

COSTA, R. M. S. **Avaliação do potencial antioxidante da folha de *Cydonia oblonga* Miller.** 86f. Monografia (Especialização em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2009.

CHAN-BACAB, M. J.; BALANZA E.; DEHARO E.; MUÑOZ, V.; GARCÍA, R. D.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 243-247, 2003.

CHANG, T. S. An updated review of tyrosinase inhibitors. **Int J Mol Sci**, v.10, n.6, p.2440-2475, 2009.

CHICOUREL, E. L.; PIMENTA, D. S.; JORGE, L. I. F.; FERRO, V. O. Contribuição ao conhecimento analítico de três compostas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 7/8, n. 1/2, p. 59-66, 1997.

CRONQUIST, A. J. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants.** New York: Columbia University, 1981.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolícos de espécies

de coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v.14(1), p. 06-08, 2004.

DUARTE, M. C.; FIGUEIRA G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L.; DELARMELENA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v.97(2), p. 305-11, 2005

ELFARRA, A. A.; KRAUSE R. J., LAST, A. R.; LASH L. H.; PARKER J. C. Species- and sex-related differences in metabolism of trichloroethylene to yield chloral and trichloroethanol in mouse, rat, and human liver microsomes. **Drug metabolism and disposition.** vol. 26, p779-785, 1998.

ETGES, R. N. **Avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico contendo Gossypium herbaceum (Tintura de Algodoeiro Cangeri) em ratos wistar.** 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Área de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4º ed. Parte I, Atheneu, São Paulo, 1988.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira.** v. 43, p. 61-68, 1997.

FREITAS, A. **Estrutura de Mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira.** Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 25 mai 2009.

GASPARETTO, J. C.; **Determinação de metabólitos secundários do guaco nas especialidades farmacêuticas xarope e solução oral via CLAE-DAD e CLAE-EM/EM.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GOULART, S. **Estudo do mecanismo da ação antiinflamatória de extratos de *Solidago chilensis* Meyen no modelo da pleurisia induzidas por diferentes agentes flogísticos, em camundongos.** Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Setor de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

GRIZA, F. T. **Análise do perfil fitoquímico e avaliação de efeitos biológicos de *Solidago chilensis* MEYEN.** 97f. Dissertação (Mestrado em Genética e Toxicologia aplicada), Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2007.

HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais.** 20º ed. São Paulo: Manole, 2008, 234 p.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A H.; PETTIT, J. E. **Fundamentos em Hematologia.** 5 ed Porto Alegre: Artmed, 2008.

HU, J. J.; LEE M. J.; VAPIWAKA M.; REUHL K. THOMAS, P. E.; YANG, C. S. Sex-related differences in mouse renal metabolism and toxicity of acetaminophen. **Toxicology and Applied Pharmacology.** v. 122, p.16-26, 1993.

HUBER, L. Validation of Analytical Methods: Review and Strategy. **LC/GC International**, v.11, n.96, 1998.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**. nov. de 2005.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 10. ed. São Paulo: Nacional, 1991.

JUNQUEIRA, D. R. G. **Sistemas de escore clínico para diagnóstico de trombocitopenia induzida por heparina**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Minas Gérias, Belo Horizonte, 2008.

KALEGARI, M. **Composição fitoquímica e atividades biológicas de *Rourea induta* Planch, Connaraceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas.) – Setor de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

LANIS, A. B.; FONSECA, L. A.; ROESLER, T.; ALVES, A.; LOPES, B. Avaliação laboratorial das doenças renais em pequenos animais. **Pubvet**, v. 2, n.28, ed. 39, 2008.

LARINI, L. **Toxicologia**. 3. Ed. Araraquara: Manole. 1997. 301 p.

LEDA, P. H.; TOMASSINI, T.C.B. *Solidago microglossa* DC: Estudos dos constituintes presentes nas suas flores. **XVII-Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2002

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 20, p. 297-301, 1992.

LIMA, A. P. **Análise bioquímica e histológica da toxicidade do *Symphytum officinale* fitoterápico e homeopático em fígado e rins de ratos**. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Programa de Pós-Graduação em Biopatologia bucal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José dos Campos 2009.

LIMA, C. R. **Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico sanitivo**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

LIMA, F. O. **Estudo fotoquímico da ação anti-radicalar de compostos polifenólicos empregando espectrofotometria e HPLC-UV**. 77f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

LIZ, R. **Estudo do efeito anti-inflamatório da *Solidago chilensis* Meyen em modelo de inflamação induzida pela carragenina, em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Setor de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativa e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2000.

LUCA, G. C.; REIS, B. F. Espectrofotometria de proteínas totais em plasma de sangue bovino por análise em fluxo. **Scientia Agrícola**. v. 59, n. 2, p.251-256, abr/jun 2001.

MACRAE, W.D.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 143-72, 1988.

MARIZ, S. R.; CERQUEIRA, G. S.; ARAÚJO, W. C.; DUARTE J. C; MELO, A. F. M.; SANTOS H. B.; OLIVEIRA, K. DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.372-378, 2006.

MEDINA, F. S.; VERA, B.; GALVEZ, J.; ZARZUELO, A.; VERA, B.; GÁLVEZ, J.; ZARZUELO, A. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. **Life**, v. 70, p. 3097-3108, 2002.

MESSIAS, K. L. S. **Estudo fitoquímico e farmacológico das folhas e caules da *Marlierea tomentosa* Camb.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MACLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31, 1982.

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

MIYAZAWA, M.; OSHIMA, T.; KOSHIO, K.; ITSUZAKI, Y.; ANZAI, J. Tyrosinase Inhibitor from Black Rice Bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6953-6956, 2003.

MOBOT – **Missouri Botanical Garden**. Disponível em < <http://www.mobot.org/>> Acesso em : 10 jun. 2009.

MOLYNEUX, P. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. v.26, n.2, p. 211-219, 2004.

MOREIRA, A. L.; BRUNO, J.; MIGUELOTE, R.; COELHO, T. H. Hemograma Texto de Apoio. Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, 2001.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna farmacêutica**. V. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MOTTA, V. T. Bioquímica Clínica: Métodos e Interpretações. Disponível em: <http://www.laboratoriocentral.com.br/wp/livro-bioquimica-clinica-principios-e-interpretações/> Acesso em 02/01/2011.

NAGATA, H., TAKEKOSHI, S., TAKEYAMA, R., HOMMA, T., YOSHIYUKI OSAMURA, R. Quercetin enhances melanogenesis by increasing the activity and

synthesis of tyrosinase in human melanoma cells and in normal human melanocytes. **Pigment Cell Res**, v.17, n.1, p.66-73. 2004.

FACURY NETO, M. A.; FAGUNDES, D. J.; BELETTI, M. E.; NOVO, N. F.; JULIANO, Y.; PENHA-SILVA; N. Systemic use of *Solidago microglossa* DC in the cicatrization of open cutaneous wounds in rats. **Braz J. Morphol Sci**, v.21, p.207-210, 2004.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for testing of chemicals**, section 4 – health effects, part 423 acute oral toxicity – acute toxic class method, revised draft guideline, november 1999

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu 1991.

OLIVEIRA, K. B.; **Determinação do ácido rosmarínico em *Salvia officinalis* L., Lamiaceae, e avaliação de sua toxicidade e influência na melanogênese**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

POMPEU, D. R. **Adsorção de três famílias de compostos fenólicos em resinas sintéticas macroporosas**. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal do Pará, Belém, 2007.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

ROCHA, A. A. **Obtenção e avaliação das atividades analgésicas e antiinflamatória do extrato hidroalcoólico bruto da Arnica brasileira (*Solidago microglossa*, DC)**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde. Universidade de Franca. Franca, 2006.

ROQUE, N. F.; VILEGAS, W.; GIANELLA, T. L.; KNUDSEN, F. S.; RONDELLA, G. P.; TORRE, L. M. B; FERRO, V. O.; OLIVEIRA, F. Compostas Medicinais do Brasil: Estudo químico de *Solidago microglossa*, *Mikania triangularis*, *M. diversifolia*, *M. smilacina*, *M. microleptis* e *Wedelia paludosa*. **Supl. Acta Amazônica**, v.18, p.473-476, 1988.

RUPPRECHT, J.K.; HUI, Y.H.; MCLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: a review. **Journal of Natural Products**,v. 53, p. 237-278, 1990.

SILVA. F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação e da capacidade antioxidante. **Química Nova**. v.22, n.1, p.94-103, 1999.

SILVEIRA, J. E. P. S. **Avaliação dos efeitos *in vitro* de espécies vegetais como potenciais ativos despigmentantes**. Dissertação (Mestrado em Biologia geral e Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

SIQUEIRA, J. M.; ZIMINIANI, M. G. ; RESENDE, U. M. ; BOAVENTURA, M. D. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 24, p. 185-187, 2001.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica Médica Básica. Uma abordagem clínica**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

SMITH, J. H; HOOK J. B. Mechanism of chloroform nephrotoxicity: II. *In vitro* evidence for renal metabolism of chloroform in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.70, p.480-485, 1983.

STEINER, S. WAHL, D. VARELA, M. C.; AIRCHER L.; PRIETO P. Protein variability in male and female Wistar rat liver proteins. **Electrophoresis**. vol. 16, p.1969-1976, 1995.

TAMURA, E .K; JIMENEZ, R. S.; WAISMAM K.; GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. MALPEZZI-MARINHO E. A.; FARSKY S. H. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. **J Ethnopharmacol**. v.122, p.478-485, 2009

TIBERTE, L. A.; YARIWAKE, J. H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-Line LC/UV/MS analysis of flavonols in three apple varieties most widely cultivated in Brazil. **J. Braz. Chem.Soc**. v. 18 (1), p. 100-105, 2007.

TORRES, L. M. B; AKISUE, M. K.; ROQUE, N. F. Quercitrin from *Solidago microglossa* DC, the Arnica of Brasil. **Rev. De farmácia e bioquímica da USP**, São Paulo, 23 (1): 33-40, 1987.

USP. **The United States Pharmacopeia**. 31. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

UTYAMA, I.K.A. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do vinagre e ácido acético: perspectiva na terapêutica de feridas**. 148 ff. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

VALKO M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry Cell Biology**. v. 39, p. 44-84, 2007.

VASCONCELOS, T. H. C.; MODESTO-FILHO, J.; DINIZ M. F. F. M.; SANTOS H. B.; AGUIAR F. B.; MOREIRA, P. V. L. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17(4), p.583-591, 2007

VIRADOR, V.M., KOBAYASHI, N., MATSUNAGA, J., HEARING, V.J. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. **Analytical Biochemistry**, v. 270, p. 207 – 219, 1999.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Fundamentos de bioquímica. A vida em nível molecular. 2ª e. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WEBER E.; JAKOBS, G. Biogical flora of central Europe: Solidago gigantea Alton. Flora, v. 200, p. 109-118, 2005.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármacos segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 18-44.

XIE, L. P., CHEN, Q. Y., HUANG, H., WANG, H. Z.,ZHANG, R. Q. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. **Biochemistry-Moscow**, v.68, n.4, p.487-491. 2003.

ZIPCODE ZOO. Disponível em <<http://zipcodezoo.com>> acesso em : 17 ago. 2008.