

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE  
QUANTITATIVA DE CUCURBITACINAS EM  
*Wilbrandia ebracteata* COGN. E *Luffa operculata* (L.) COGN., EMPREGANDO  
CLAE E ESPECTROFOTOMETRIA NO UV**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Farmácia como  
requisito parcial à obtenção do grau de  
Mestre em Farmácia.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marení Rocha Farias**

**PATRÍCIA BAIER KREPSKY**

**FLORIANÓPOLIS  
2003**

Krepsky, Patrícia Baier

Contribuição para o desenvolvimento de método para análise quantitativa de cucurbitacinas em *Wilbrandia ebracteata* Cogn. e *Luffa operculata* (L.) Cogn., empregando CLAE e espectrofotometria no UV/ Patrícia Baier Krepsky. Florianópolis, 2003.

Dissertação (Mestrado - Farmácia).  
Universidade Federal de Santa Catarina

1 *Wilbrandia ebracteata*. 2 *Luffa operculata*.  
3 cucurbitacinas. 4 cromatografia líquida de alta eficiência.  
5 espectrofotometria no UV.

*Dedico esta dissertação à minha mãe, Tânia*

*Baier, pelo amor e apoio absolutos.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que nos deu a capacidade de estudar, criar, compreender, amar...  
Enfim de viver e dar nossa contribuição ao mundo.

À minha mãe Tânia Baier, grande incentivadora da docência e pesquisa,  
que tornou possível a realização deste sonho.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marení Rocha Farias pelos ensinamentos  
e conselhos preciosos, atenção e amizade.

Às bolsistas de iniciação científica Débora Porath e Mariana de Oliveira  
Cervelin pela colaboração na realização da parte prática deste trabalho e  
amizade.

Ao doutorando em Farmacologia Rodrigo Rebelo Peters e sua orientadora  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa Maria Ribeiro-do-Valle pela realização de trabalho em  
colaboração, apresentação de seminários e discussões.

Ao Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel pela participação ativa nos seminários.

Ao meu namorado Francisco dos Santos Gick pela sua ajuda nas questões  
relacionadas à informática, pela companhia nos finais de semana no  
laboratório e principalmente pelo grande amor e compreensão.

Ao amigo Luciano Soares pelo treinamento na utilização do equipamento  
para análise por CLAE e amizade.

Ao Dr. Gil Felício Fernandes pelos ensinamentos a respeito de diversos  
programas utilizados e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Anecleto Poli por me ajudar a compreender o CLAE.

Aos demais amigos dos laboratórios de Farmacognosia, Química  
Farmacêutica, Controle de Qualidade e Farmacotécnica, em especial:  
Bianca, Daniela, Daiane, Giana, Giovana, Irene, Mariliz, Melissa, Micheli,

Ronise, Sylvania e Solange pelos muitos momentos de descontração e conversas.

Em especial a amiga Teca pelo carinho e discussões que muito contribuíram para minha formação.

Aos demais colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia pelas contribuições seja na forma de conhecimento, seja de amizade e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos por fazer despertar em mim o interesse pelas plantas medicinais.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tomoe Nakashima pela orientação durante a iniciação científica.

Aos músicos em geral pela alegria que me proporcionaram em momentos de aflição.

A todas as pessoas que conheci, pois o ser humano que sou hoje recebeu muitas influências que contribuíram para o desenvolvimento como pessoa e profissional.

"Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o címbalo que retine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria. E ainda que distribuísse todos os meus bens para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria...

...Agora, pois, permanecem a fé, a esperança, o amor, estes três; mas o maior destes é o amor".

Carta de Paulo aos Coríntios

Capítulo 13

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>XX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
1.1.1. <i>Wilbrandia ebracteata</i> Cogn. ....	3
1.1.2. <i>Cayaponia tayuya</i> (Vell.) Cogn. ....	6
1.1.3. <i>Luffa operculata</i> (L.) Cogn. ....	7
1.1.4. <b>CUCURBITACINAS</b> .....	9
1.1.4.1. Toxicidade .....	16
1.1.4.2. Atividade farmacológica .....	17
1.1.4.3. Análise quali e quantitativa de cucurbitacinas .....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
3.1. MATERIAIS .....	24
3.1.1. <b>MATERIAL VEGETAL</b> .....	24
3.1.2. <b>EQUIPAMENTOS E SOLVENTES</b> .....	25
3.2. MÉTODOS .....	26
3.2.1. <b>PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS</b> .....	26
3.2.2. <b>OBTENÇÃO DOS PADRÕES</b> .....	27
3.2.2.1. Di-hidrocucurbitacina B .....	28
3.2.2.2. Cucurbitacina B .....	28
3.2.2.3. Determinação do grau de pureza dos padrões .....	28
3.2.2.4. Estabilidade dos padrões .....	29

	2
3.2.3. <i>DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS DE DOSEAMENTO</i> .....	30
3.2.3.1. Determinação dos parâmetros de análise .....	30
3.2.3.1.1. Eluente e fluxo .....	31
3.2.3.1.2. Comprimentos de onda .....	32
3.2.3.1.3. Solvente para a diluição das amostras .....	32
3.2.3.1.4. Pureza dos picos .....	32
3.2.3.2. Determinação do modo de preparo da amostra .....	32
3.2.3.3. Curva de calibração .....	33
3.2.3.3.1. Preparo da solução estoque .....	34
3.2.3.3.2. Preparo das diluições .....	34
3.2.3.3.3. Cálculo da porcentagem de cucurbitacinas .....	36
3.2.3.3.4. Estabilidade das soluções padrão .....	37
3.2.4. <i>VALIDAÇÃO</i> .....	37
3.2.4.1. Linearidade .....	37
3.2.4.2. Exatidão .....	37
3.2.4.3. Precisão .....	38
3.2.5. <i>APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS</i> .....	39
3.2.5.1. Análise de amostras comerciais .....	39
3.2.5.2. Caracterização e doseamento de frações diclorometânicas .....	39
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
4.1. OBTENÇÃO E ESTABILIDADE DOS PADRÕES .....	41
4.2. DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS DE DOSEAMENTO .....	44
4.2.1. <i>DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ANÁLISE</i> .....	44
4.2.1.1. Eluente e fluxo .....	45
4.2.1.2. Comprimento de onda .....	47
4.2.1.3. Escolha do solvente para a dissolução das amostras .....	51
4.2.1.4. Pureza dos picos .....	52
4.2.2. <i>DETERMINAÇÃO DO MODO DE PREPARO DAS AMOSTRAS</i> .....	53
4.2.3. <i>CURVA DE CALIBRAÇÃO</i> .....	58
4.2.3.1. Di-hidrocucurbitacina B .....	58
4.2.3.2. Cucurbitacina B .....	60
4.2.3.3. Fórmulas para cálculo da concentração .....	62
4.2.3.4. Estabilidade das soluções padrão .....	63
4.3. <i>VALIDAÇÃO</i> .....	64
4.3.1. <i>Linearidade</i> .....	65

	3
4.3.2. <i>Exatidão</i> .....	65
4.3.3. <i>Precisão</i> .....	68
4.3.3.1. <i>Precisão intermediária</i> .....	68
4.3.3.2. <i>Precisão intra-ensaio</i> .....	72
4.4. <i>APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS</i> .....	73
4.4.1. <i>Doseamento de amostras comerciais de taiuiá e buchinha</i> .....	73
4.4.2. <i>Caracterização e doseamento de frações diclorometânicas</i> .....	77
4.5. <i>CONSIDERAÇÕES FINAIS</i> .....	81
4.6. <i>PERSPECTIVAS</i> .....	82
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>86</b>



## RESUMO

*W. ebracteata* Cogn. (taiuiá) e *L. operculata* (L.) Cogn. (buchinha-do-norte) são espécies vegetais da família Cucurbitaceae, utilizadas como medicinais, sendo que as raízes de *W. ebracteata* apresentam di-hidrocurbitacina B (DHCB) como constituinte majoritário, e os frutos de *L. operculata*, curbitacina B (CB). O objetivo deste trabalho é desenvolver métodos para doseamento de DHCB e de CB nestas espécies, empregando CLAE e espectrofotometria de absorção no UV. DHCB e CB foram isoladas, e tiveram sua pureza determinada por CLAE. Na otimização dos parâmetros da análise por CLAE (coluna ODS, 5  $\mu$ m, 150 X 4,6 mm) foram testados diferentes eluentes, fluxos e comprimentos de onda, além de eluição por gradiente e isocrática. Em relação ao modo de preparo da amostra foram testadas extrações a partir de raízes de *W. ebracteata*, por maceração com etanol e posterior partição com éter de petróleo (EP) e diclorometano (DC), e extrações diretas por maceração com EP e DC. Foi selecionada a extração por maceração com EP, seguida de extração com DC em refluxo, sendo o extrato diclorometânico seco ressuspenso em acetonitrila e filtrado por membrana (0,45  $\mu$ m). Para a análise por espectrofotometria no UV foi necessária uma diluição 1:10 a partir do extrato utilizado na análise por CLAE. Os parâmetros selecionados para o método por CLAE foram: eluente CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 40:60; fluxo de 1,2 mL/min. Tanto por CLAE quanto por espectrofotometria de absorção no UV a detecção foi realizada em 210 e 230 nm. Foi realizada uma curva de calibração, obtendo-se fórmulas para o cálculo da concentração de DHCB e CB. Foram realizados estudos preliminares de validação determinando-se a linearidade, a exatidão, a precisão intra-ensaio e intermediária, além dos limites de detecção e quantificação. A análise por CLAE se mostrou reprodutível, a precisão intermediária encontrada (em média 8%) foi considerada satisfatória por tratar-se de análise de plantas. A recuperação (em média de 77%), demonstrou o grau de exatidão do método. A detecção em 230 nm foi mais apropriada por apresentar menor interferência de outras substâncias presentes no extrato. Por outro lado tanto a precisão quanto a exatidão obtida na análise por espectrofotometria no UV foram insatisfatórias, portanto, este método precisa ser reformulado. O método desenvolvido foi aplicado na análise de amostras comerciais de taiuiá e de buchinha-do-norte. Os resultados deste ensaio mostraram uma grande variabilidade quali e quantitativa nas amostras de taiuiá, enquanto que as amostras de buchinha diferiram apenas quanto ao teor de curbitacinas. Frações diclorometânicas de *W. ebracteata* e *L. operculata* empregadas em ensaios farmacológicos foram caracterizadas quali e quantitativamente.

## ABSTRACT

*W. ebracteata* Cogn. (taiuiá) and *L. operculata* (L.) Cogn. (buchinha-do-norte) Cucurbitaceae are species used as medicinal plant. *W. ebracteata*'s roots contain dihydrocucurbitacin B (DHCB) as majority constituent. In the fruits of *L. operculata* the major cucurbitacin was cucurbitacin B (CB). The objective is the development of methods for quantitative analysis of DHCB and CB on these species. The used methods were HPLC and spectrophotometry on UV. DHCB and CB were isolated by column chromatography. They had their purity determined by HPLC. During the optimization of the CLAE analysis parameters (column ODS, 5  $\mu$ m, 150 X 4,6 mm) were tested different eluents, flows, wave lengths and elution mode (gradient and isocratic). Some sample preparation methods were tested. The tested methods were: maceration with ethanol and partition with petroleum ether (PE) and dichloromethane (DC), maceration with DC and maceration with EP followed by maceration with DC with and without reflux. The dry dichlorometanic extract was suspended with acetonitrile and filtered throw membrane (0,45  $\mu$ m). The analysis by spectrophotometry on UV requires dilution (1:10) from the extract used in the analysis by HPLC. The HPLC selected parameters were: eluent CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 40:60; flow 1,2 mL/min. Both analysis methods used detection wave lengths 210 and 230 nm. Using calibration curves were obtained formulas for the determination of DHCB and CB concentration. Preliminary validation studies determined linearity, accuracy, intermediate precision, repeatability, detection limit and quantification limit. The analysis by HPLC is reproducible. The intermediate precision (about 8%) was considered satisfactory for plant material analysis. The recovery (about 77%) demonstrated the accuracy of the method. The detection at 230 nm presented smaller interference of other substances in the extract. On the other hand the precision and the accuracy obtained in the analysis by spectrophotometry on UV was unsatisfactory. Therefore, this method needs to be reformulated. The developed method was applied in the analysis of commercial samples of taiuiá and buchinha-do-norte. It was found a great qualitative and quantitative variability on the taiuiá samples, while the buchinha-do-norte samples just differed on the cucurbitacins level. Dichloromethanic fractions of *W. ebracteata* and *L. operculata* used on pharmacological assays were characterized.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Raiz de <i>W. ebracteata</i> (WE01), coletada em Florianópolis, em janeiro de 2001.....	3
<b>Figura 2:</b> Frutos de <i>L. operculata</i> . Disponível em <a href="http://www.gudjons.com/arznei1.htm">www.gudjons.com/arznei1.htm</a> .....	8
<b>Figura 3:</b> Estrutura geral das cucurbitacinas com numeração dos carbonos.....	10
<b>Figura 4:</b> CCD comparativa das frações WE01DC e LO01DC. Eluente EP:AcOEt 1:1, fase estacionária: gel de sílica G F <sub>254</sub> e revelador: vanilina fosfórica.....	27
<b>Figura 5:</b> Soluções preparadas a partir da DHCB isolada (µg/mL).....	29
<b>Figura 6:</b> Soluções preparadas a partir da CB isolada (µg/mL).....	30
<b>Figura 7:</b> Espectro de absorção no UV da DHCB (0,1 mg/mL).....	41
<b>Figura 8:</b> Espectro de absorção no UV da CB (0,1 mg/mL).....	41
<b>Figura 9:</b> Análise das substâncias isoladas e fração WE01DC por CCD (eluente EP:AcOEt:Isopropanol 20:10:0,8; fase estacionária: gel de sílica G F <sub>254</sub> e revelador: vanilina fosfórica). Da esquerda para a direita: DHCB isolada, DHCB padrão, WE01DC, CB isolada, CB padrão.....	42
<b>Figura 10:</b> Cromatogramas, obtidos por CLAE, de DHCB (1 mg/mL) e CB (40 µg/mL) em 200 nm.....	43
<b>Figura 11:</b> Análise preliminar da estabilidade de cucurbitacinas em meio ácido e básico por CCD (eluente EP:AcOEt:Isopropanol 20:10:0,5; fase estacionária: gel de sílica G F <sub>254</sub> e revelador: vanilina fosfórica).....	44
<b>Figura 12:</b> Cromatogramas de WE01DC 2,0 mg/mL, obtidos por CLAE, obtidos nos comprimentos de onda de 200, 210 e 230 nm.....	49
<b>Figura 13:</b> Espectros de absorção no UV de WE01DC (0,1 mg/mL).....	50
<b>Figura 14:</b> Espectros de absorção no UV de LO01DC (0,1 mg/mL).....	50
<b>Figura 15:</b> Espectro do pico correspondente a DHCB em análise por CLAE (CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O 40:60; 1,2 mL/min).....	52
<b>Figura 16:</b> Espectro do pico correspondente a DHCB em análise por CLAE (CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O 40:60; 1,2 mL/min).....	53
<b>Figura 17:</b> Esquema geral do modo de preparo da amostra selecionado.....	57
<b>Figura 18:</b> Gráfico correspondente à curva de calibração da DHCB por CLAE em 230 nm.....	59
<b>Figura 19:</b> Gráfico correspondente à curva de calibração da DHCB por CLAE em 210 nm.....	59

<b>Figura 20:</b> Gráfico correspondente à curva de calibração da DHCB por espectrofotometria no UV em 210 nm.....	60
<b>Figura 21:</b> Gráfico correspondente à curva de calibração da CB por CLAE em 230 nm. ....	61
<b>Figura 22:</b> Gráfico correspondente à curva de calibração da CB por CLAE em 210 nm.	61
<b>Figura 23:</b> Gráfico correspondente à curva de calibração da CB por UV em 230 nm. ....	62
<b>Figura 24:</b> Análise das amostras comerciais analisadas por CCD (eluente EP:AcOEt:Isopropanol 20:10:0,5; fase estacionária: gel de sílica G F <sub>254</sub> e revelador: vanilina fosfórica). ....	73
<b>Figura 25:</b> Comparação entre cromatogramas obtidos por CLAE das amostras comerciais A1 e A2, e WE02. Detecção em 230 nm. ....	74
<b>Figura 26:</b> Cromatogramas resultantes da análise de amostra comercial de buchinha aplicando-se o método desenvolvido. ....	76
<b>Figura 27:</b> Cromatograma da fração WE00DC. ....	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Estrutura das cucurbitacinas isoladas de <i>W. ebracteata</i> e <i>L. operculata</i> .	10
<b>Tabela 2:</b> Cucurbitacinas isoladas de <i>W. verticillata</i> .	14
<b>Tabela 3:</b> Algumas cucurbitacinas isoladas de <i>C. tayuya</i> .	15
<b>Tabela 4:</b> Comparação entre os métodos de análise de cucurbitacinas por CLAE em relação ao modo de preparo da amostra, comprimento de onda de detecção e substância padrão.	21
<b>Tabela 5:</b> Comparação entre os métodos de análise de cucurbitacinas por CLAE em relação ao eluente, fluxo e tipo de coluna.	22
<b>Tabela 6:</b> Relação das espécimes de <i>W. ebracteata</i> e <i>L. operculata</i> e a etapa do trabalho onde as mesmas foram utilizadas.	24
<b>Tabela 7:</b> Relação dos extratos e frações utilizados no decorrer do trabalho.	26
<b>Tabela 8:</b> Rendimento das frações obtidas após a partição dos extratos brutos de WE01 e WE02.	27
<b>Tabela 9:</b> Cálculo da concentração de DHCB nas diluições para a determinação da curva de calibração.	35
<b>Tabela 10:</b> Cálculo da concentração de CB nas diluições para a determinação da curva de calibração.	35
<b>Tabela 11:</b> Fórmulas para cálculo da concentração de DHCB e CB, por CLAE e de cucurbitacinas totais por espectrofotometria no UV, em mg de substância por 100 g de droga vegetal, através de padrão externo.	36
<b>Tabela 12:</b> Fórmulas para cálculo da concentração de DHCB e CB, por CLAE e de cucurbitacinas totais por espectrofotometria no UV, em mg de substância por 100 g de droga vegetal, através da equação obtida pela curva de calibração.	37
<b>Tabela 13:</b> Pureza dos padrões isolados, determinada por CLAE.	42
<b>Tabela 14:</b> Resolução (Rs) e tempo de retenção (Tr) da DHCB, e pressão do sistema, obtidos com diferentes proporções de CH <sub>3</sub> CN em água como eluente, em diferentes fluxos, detecção em 190 nm.	46
<b>Tabela 15:</b> Resolução (Rs) e tempo de retenção (Tr) da DHCB, e pressão do sistema, obtidos com diferentes proporções de CH <sub>3</sub> CN em água como eluente, em diferentes fluxos, detecção em 230 nm.	46
<b>Tabela 16:</b> Resolução (Rs), tempo de retenção (Tr) da DHCB, e pressão do sistema, obtidos em análises com modo de eluição por gradiente, detecção em 190 nm e fluxo de 1,2 mL/min.	47

<b>Tabela 17:</b> Análise de WE01DC por CLAE com detecção nos comprimentos de onda de 200, 210 e 230 nm. ....	48
<b>Tabela 18:</b> ASC de DHCB e CB da fração WE01DC 1,0 mg/mL dissolvida em CH <sub>3</sub> CN e MeOH. ....	51
<b>Tabela 19:</b> Comparação entre o modo de preparo da amostra por maceração em etanol nas temperaturas de 30 e 50°C, seguida de partição (modos 1 e 2) e modo de preparo por extração direta com EP e DC (modo 3). Análise por CLAE. ....	54
<b>Tabela 20:</b> Comparação entre o modo de preparo da amostra por partição com maceração nas temperaturas de 30 e 50°C (modo 1 e 2) e modo de preparo por extração direta com EP e DC (modo 3) pelo método espectrofotométrico. ....	55
<b>Tabela 21:</b> Comparação entre o modo de preparo da amostra por maceração com EP e DC a temperatura de 30°C (modo 3) e por maceração com EP seguida de refluxo com DC (modo 4). ....	55
<b>Tabela 22:</b> Equação, fórmula e coeficiente de correlação para cada curva de calibração realizada por CLAE. ....	62
<b>Tabela 23:</b> Equação, fórmula e coeficiente de correlação para cada curva de calibração realizada por espectrofotometria de absorção no UV. ....	63
<b>Tabela 24:</b> Análise por CLAE, com detecção em 230 e 210 nm, da solução de DHCB. .	63
<b>Tabela 25:</b> Análise por CLAE, com detecção em 230 e 210 nm, da solução de CB. ....	64
<b>Tabela 26:</b> Recuperação (%) da DHCB e CB, por CLAE, em 230 e 210 nm cujas concentrações (mg de CB ou DHCB/ 100 g de raízes) foram calculadas através da curva de calibração. ....	66
<b>Tabela 27:</b> Recuperação (%) de cucurbitacinas pelo método de espectrofotometria no UV com detecção em 230 e 210 nm, cujas concentrações (mg de cucurbitacinas totais expressas em CB e DHCB/ 100 g de planta) foram calculadas através da curva de calibração. ....	67
<b>Tabela 28:</b> Teor de DHCB e CB em raízes de <i>W. ebracteata</i> (mg de DHCB ou CB por 100 g de raízes), por CLAE com detecção em 230 e 210 nm, cálculo pela ASC do padrão externo (n = 3). ....	69
<b>Tabela 29:</b> Teor de DHCB e CB em raízes de <i>W. ebracteata</i> (mg de DHCB e CB por 100 g de raízes), por CLAE com detecção em 230 e 210 nm, cálculo pela curva de calibração (n = 3). ....	70
<b>Tabela 30:</b> Teor de cucurbitacinas totais (mg por 100 g de raiz) determinado através de espectrofotometria de absorção no UV. ....	72

**Tabela 31:** Concentração de DHCB e CB (mg da substância por 100 g de raiz) em amostras comerciais de taiuiá e cabeça-de-negro (A1 a A5), por CLAE com detecção em 230 nm, e cálculos realizados a partir da equação obtida pela curva de calibração... 75

**Tabela 32:** Análise quantitativa de amostras comerciais de *Luffa operculata*. Resultado da análise por CLAE em porcentagem de CB por 100 g de frutos; e por UV, cucurbitacinas totais expressas em CB por 100 g de frutos. Detecção em 230 nm. .... 76

**Tabela 33:** Tempos de retenção (min.) obtidos através de análise por CLAE (CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 40:60, 1,2 mL/min., 230 nm) de substâncias de referência isoladas de *W. ebracteata* visando a caracterização da fração WE00DC utilizada em testes farmacológicos..... 78

**Tabela 34:** Porcentagem relativa das principais cucurbitacinas presentes nas frações WE00DC, WE01DC e WE02MR em relação ao total de substâncias detectadas em 230nm e 200 nm..... 79

**Tabela 35:** Doseamento de DHCB e CB na fração diclorometânica utilizada em ensaios farmacológicos e no extrato preparado conforme metodologia desenvolvida, n = 3, resultado expresso em mg de DHCB ou CB em 100 g de extrato) ± DP (CV%). ... 80

**Tabela 36:** Concentração de CB na fração LO01DC por CLAE e de cucurbitacinas totais expressas em CB, espectrofotometria no UV. Detecção em 230 nm..... 81

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ab<sub>a</sub> = absorvância da amostra  
AcOEt = acetato de etila  
ASC = área sobre a curva  
ASC<sub>a</sub> = área sobre a curva da amostra  
ASC<sub>p</sub> = área sobre a curva do padrão  
CB = cucurbitacina B  
CCD = cromatografia em camada delgada  
CD = cucurbitacina D  
CHCl<sub>3</sub> = clorofórmio  
CH<sub>3</sub>CN = acetonitrila  
Conc. = concentração  
CR = cucurbitacina R  
CV (%) = coeficiente de variação em porcentagem  
DC = diclorometano  
DHCB = di-hidrocucurbitacina B  
DP = desvio padrão  
EP = éter de petróleo  
i.p. = intraperitoneal  
LO01 = *Luffa operculata* adquirida em 2001  
LO01DC = extrato diclorometânico de LO01  
m = massa  
MeOH = metanol  
mg = miligramas  
nm = nanômetros  
p.o. = per os  
R = coeficiente de correlação  
Rs = resolução  
RMN = ressonância magnética nuclear  
Tr = tempo de retenção  
UV = ultravioleta  
WE00 = *Wilbrandia ebracteata* coletada em 1987  
WE01 = *Wilbrandia ebracteata* coletada em 2001  
WE02 = *Wilbrandia ebracteata* coletada em 2002  
WE01DC = extrato diclorometânico de WE01

WE02MR = extrato preparado conforme metodologia desenvolvida

$\gamma$  = comprimento de onda

## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação refere-se ao trabalho de pesquisa desenvolvido durante o mestrado em Farmácia, área de concentração Fármacos e Medicamentos, linha de pesquisa Garantia da Qualidade de Insumos, Produtos e Serviços Farmacêuticos do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina. Os experimentos foram realizados no laboratório de Farmacognosia, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da mesma universidade.

Este trabalho foi realizado em cooperação com a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosa Maria Ribeiro-do-Vale Nicolau, orientadora da tese de doutorado de Rodrigo Rebelo Peters junto ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, onde foram realizados os estudos farmacológicos. Os resultados parciais desta etapa são apresentados na publicação conjunta aceita pela revista *Life Sciences* (Anexo 1).

As espécies vegetais selecionadas como objeto de estudo foram *Wilbrandia ebracteata* Cogn. e *Luffa operculata* (L.) Cogn. A primeira é denominada popularmente taiuiá e a segunda, buchinha-do-norte, cabacinha, buchinha, abobrinha-do-norte, bucha-dos-paulistas (CORRÊA, 1984; MATOS, 2000). Também será discutida a espécie *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. oficializada pela Farmacopéia Brasileira I como taiuiá. Estas espécies pertencem à família Cucurbitaceae, sendo as cucurbitacinas seus constituintes químicos principais (CORRÊA, 1984; PORTO, 1974, HEGNAUER, 1989).

# 1. INTRODUÇÃO

*W. ebracteata* é encontrada predominantemente na região sul do Brasil, enquanto *L. operculata* é uma espécie nativa do norte e nordeste brasileiro, mas muito comercializada na região sul, sendo associada a casos de intoxicação, muitas vezes pelo uso por via oral como abortivo (CORRÊA, 1984; Centro de Informações Toxicológicas de Santa Catarina, 2001). Em levantamento realizado entre gestantes de diversos estados brasileiros, o uso de *L. operculata* como emenagogo foi apontado, sendo esta prática associada com a tentativa de aborto (MENGUE et al., 1997).

No sul do Brasil, o nome taiuiá é utilizado para designar muitas espécies dos gêneros *Wilbrandia* e *Cayaponia*, por exemplo, *C. martiana* (Cogn.) Cogn., *C. hirsuta* Cogn. e *C. tayuya* (Vell.) Cogn. Este fato, muitas vezes, gera confusão em relação à identificação das espécies utilizadas comercialmente. Estas espécies são comercializadas no Brasil e no exterior na forma de fitoterápicos, sendo que, aqueles cuja composição indica raízes de *C. tayuya* (Sin. *Trianosperma tayuya* (Vell.) Cogn.), droga oficializada pela Farmacopéia Brasileira I (1926), podem conter na verdade raízes de *W. ebracteata*. No sul do Brasil isto tem sido explicado pelo fato de *C. tayuya*, ao contrário de *W. ebracteata*, raramente ocorrer no Rio Grande do Sul, um dos principais fornecedores da matéria-prima (FARIAS et al., 1986; FARIAS e SCHENKEL, 1987; SANTOS, SANTOS e SCHENKEL; 1996).

As raízes dessecadas de *W. ebracteata* são empregadas na medicina popular no tratamento de prisão de ventre, dermatoses, amenorréia, úlcera gástrica aguda e doenças reumáticas (FARIAS et al., 1993; SANTOS, SANTOS e SCHENKEL, 1996; FARIAS e SCHENKEL, 1987). Quando seca, a raiz torna-se menos drástica (CORRÊA, 1984). Diversos trabalhos apontam para a existência de importante atividade antiinflamatória desta espécie o que será detalhado na revisão bibliográfica.

Os frutos secos de *L. operculata* são amplamente utilizados no tratamento de sinusite, na forma de infuso ou decocto, por meio de lavagem da rinofaringe, às vezes referida de forma equivocada como inalação. São também citados como purgativo drástico, vermífida e emético (CORRÊA, 1984; MATOS, 2000).

Tanto as raízes de *W. ebracteata* quanto os frutos de *L. operculata* apresentam sabor amargo devido à presença de cucurbitacinas, metabólitos secundários comuns na família Cucurbitaceae. Cucurbitacinas são triterpenos tetracíclicos poli-hidroxilados. Alguns destes compostos apresentam elevada toxicidade, mas são responsáveis por parte das atividades biológicas destas plantas medicinais.

Portanto, a fim de se garantir a segurança e eficácia do tratamento com fitoterápicos que possuam raízes de *W. ebracteata* ou frutos de *L. operculata* em sua composição, faz-se necessário o estabelecimento das doses adequadas. Para tanto, há necessidade do desenvolvimento de métodos sensíveis e específicos para determinação do teor de cucurbitacinas tanto em matérias-primas quanto em produtos intermediários, ou seja, extratos, em especial daquelas sabidamente tóxicas. O desenvolvimento de métodos de análise de cucurbitacinas nas espécies apresentadas permite também o controle de qualidade, no caso o doseamento, de matérias-primas vegetais e a caracterização de frações utilizadas em testes farmacológicos.

Além de plantas medicinais, a família Cucurbitaceae apresenta plantas alimentícias de importância na agricultura de vários países. Como exemplos destas, cultivadas no Brasil, podemos citar: abóbora moranga (*Cucurbita pepo*), melancia (*Citrullus vulgaris*), pepino (*Cucumis sativus*) e chuchu (*Echium edule*) (PAGOTO, KAPLAN e GOTTLIEB, 1996). Algumas variedades das espécies alimentícias também podem apresentar cucurbitacinas, ampliando-se o leque de aplicação das metodologias de análise destes compostos em materiais vegetais.

## 1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item, são apresentados os dados a respeito de composição química, farmacologia, toxicidade e análise, encontrados na revisão da literatura sobre as espécies *Wilbrandia ebracteata* Cogn., *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. e *Luffa operculata* Cogn. Também foi realizada pesquisa bibliográfica sobre as cucurbitacinas isoladas das espécies descritas, incluindo os estudos sobre toxicidade e atividade farmacológica. Em relação a trabalhos sobre análise quali e quantitativa foram procurados artigos relacionados a este grupo de compostos.

### 1.1.1. *Wilbrandia ebracteata* Cogn.

Classificação botânica:

Ordem: Cucurbitales

Família: Cucurbitaceae

Subtribo: Melothriinae

Gênero: *Wilbrandia* Manso

Seção: Euwilbrandia

Espécie: *Wilbrandia ebracteata* Cogn.

Variedades: *pedunculata*, *ebracteata*, *bracteata*



Figura 1: Raiz de *W. ebracteata* (WE01), coletada em Florianópolis, em janeiro de 2001.

Da raiz da espécie *W. ebracteata* (Figura 1) foram isoladas as seguintes cucurbitacinas (Tabela 1): cucurbitacina B, D, E, P, R, G/H, J/K, di-hidrocurcurbitacina B e seu 2- $\beta$ -D-glicosídeo, di-hidroisocucurbitacina B e seu 3- $\beta$ -D-glicosídeo, di-hidrocurcurbitacina E e seu 2- $\beta$ -D-glicosídeo, 22-deoxo-cucurbitacina D, 22-deoxo-cucurbitacina L, bem como: (20R) 24-oxi-3- $\beta$ , 16- $\alpha$ -20, 24, 25-penta-hidroxi-10- $\alpha$ -cucurbit-5-eno-2, 11, 22-triona (3-epi-isocucurbitacina G); (20R) 22-oxi-2- $\beta$ , 16- $\alpha$ , 20, 22, 25-penta-hidroxi-10- $\alpha$ -cucurbita-5, 23t-dieno-3, 11-diona; (20R) 25-acetoxi-3, 16- $\alpha$ , 20-tri-hidroxi-30 nor-2-( $\beta$ -D-glu-copirano-siloxi)-1, 2, 3, 4, 5, 10-di-hidrocurcurbit-6-eno-11, 22-diona (FARIAS et al., 1993). Foram isoladas também as cucurbitacinas: 16- $\alpha$ , 23- $\alpha$ -epoxi-2- $\beta$ , 3- $\beta$ , 20- $\beta$ -tri-hidroxi-10- $\alpha$ , 23- $\beta$ -cucurbit-5, 24-dien-11-ona; 16- $\alpha$ , 23- $\alpha$ -epoxi-2- $\beta$ , 3- $\beta$ , 20- $\beta$ -tri-hidroxi-10- $\alpha$ , 23- $\alpha$ -cucurbit-5, 24-dien-11-ona e 2- $\beta$ , 3- $\beta$ , 16- $\alpha$ , 20, 25-penta-hidroxi-10- $\alpha$ , 5, 23-dien-11-ona (SCHENKEL et al., 1992).

Das raízes de *W. ebracteata* foram isolados também C-glicoflavonóides: spinosina, swertisina, isoswertisina, vitexina, isovitexina, vicenina-2, orientina, iso-orientina (SANTOS, SANTOS e SCHENKEL, 1996).

No que diz respeito à investigação farmacológica, foi estudado o efeito antiedematogênico do extrato aquoso de *W. ebracteata* a 10% (planta seca) na dose de 1 g/kg v.o. frente ao veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*), o qual resultou em inibição significativa do edema. Portanto, o uso de *W. ebracteata* no caso de mordeduras de cobras, preconizado popularmente, pode ser devido à atividade antiinflamatória do extrato (PEREIRA, GONÇALVES e PEREIRA, 1992).

A fração diclorometânica de *W. ebracteata*, rico em cucurbitacinas, foi testado em ratos e camundongos com edema induzido por carragenina, assim como as cucurbitacinas B e E. A fração e as substâncias isoladas foram diluídas em solução de DMSO a 1,0%. Foram testadas doses de 1 a 10 mg/kg i.p., sendo que a dose inibitória 50 (ID50) por esta via foi 5 mg/kg; e doses de 3 a 30 mg/kg p.o., cuja ID50 foi 15 mg/kg. A inibição do edema foi dose dependente. As cucurbitacinas B e E isoladas desta espécie também apresentaram atividade. Quando foi testada a ação analgésica frente à dor induzida por ácido acético, o resultado também foi positivo. Através do teste de indução de dor com formalina, nas doses de 0,3 a 10 mg/kg i.p. e 3 a 30 mg/kg p.o., foi observada inibição das fases neurogênicas e inflamatórias (PETERS, FARIAS e RIBEIRO-DO-VALLE, 1997).

Nos estudos a respeito dos possíveis mecanismos da ação antiinflamatória da fração diclorometânica de *W. ebracteata* e cucurbitacina B, as doses de 0,3 a 10 mg/kg i.p. e 3 a 30 mg/kg p.o. foram utilizadas no ensaio de inibição de indução do influxo de

células para a cavidade pleural induzida por carragenina. O resultado foi positivo, mas não dose-dependente. Houve inibição do influxo de células e do exsudato pleural. Para a cucurbitacina B foi também observada a inibição da produção de prostaglandina PGE<sub>2</sub>. Como neste modelo há aumento do nível da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), mas não de ciclooxigenase 1 (COX-1), a inibição da PGE<sub>2</sub> pode ser devido à inibição da COX-2. Além disso, uma das frações estudadas não foi capaz de induzir úlcera gástrica em ratos, o que acontece com substâncias antiinflamatórias que inibem tanto a COX-1 quanto a COX-2 (PETERS et al., 1999).

Estudo *in vitro*, utilizando células de *Salmonella*, a respeito da mutagenicidade de diversas frações de *W. ebracteata*, demonstrou que a fração diclorometânica - onde se encontram as cucurbitacinas, e as frações acetato de etila e n-butanólica - ricas em flavonóides C-glicosídicos - não apresentam esta característica. Tais frações foram obtidas por partição a partir do extrato metanólico, seco e ressuspenso em água. Os autores discutem a possível ausência de risco à saúde humana. Um efeito mutagênico de baixa intensidade foi observado apenas em tratamento por longo prazo com altas doses do extrato metanólico e hidrometanólico (1:1), onde foram detectadas saponinas e flavonóides (PEREIRA, FARIAS e VARGAS, 1996).

Todos os estudos levantados foram realizados com extratos obtidos de raízes de *W. ebracteata*, com exceção de um trabalho a respeito do efeito antiulcerogênico de extrato hidrometanólico das folhas. Neste verificou-se redução das lesões produzidas por etanol, mas não houve atividade sobre lesões induzidas por indometacina. Também não foi observada atividade analgésica. Testes qualitativos revelaram ausência de cucurbitacinas e presença de esteróides, flavonóis e flavanonas (GONZALEZ e DISTASI, 2002).

O gênero *Wilbrandia* possui cinco espécies (CROVETTO, 1960). No entanto, na literatura foram encontrados dados apenas sobre *W. ebracteata* Cogn. e sobre a planta medicinal conhecida popularmente no Nordeste brasileiro como cabeça-de-negro, a qual foi caracterizada como *W. (cf.) verticillata* Cogn. Estes estudos relataram a presença de heterosídeos de nor-cucurbitacinas: 29-nor-1, 2, 3, 4, 5, 10-di-hidro-25-O-acetil-2-O-β-D-glucopiranosil-3, 16α, 20(R)-tri-hidroxi-11, 22-dioxocucurbita-6, 23-dieno e 29-nor-1, 2, 3, 4, 5, 10-di-hidro-2-O-β-D-glucopiranosil-3, 16α, 20 (R)-tetra-hidroxi-11, 22-dioxocucurbita-6-dieno, apresentados na Tabela 2 (MATOS et al., 1991). A fração contendo estas cucurbitacinas apresentou inibição significativa da artrite causada por formaldeído e aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos (ALMEIDA, RAO e MATOS, 1989). Em outros estudos, foi demonstrada para a mesma fração citotoxicidade para células KB (CC50 = 12 ug/ml) assim como uma importante inibição do crescimento de sarcoma de Walker 256 de aproximadamente 75% (RAO et

al., 1991). Outro estudo demonstrou que esta fração inibiu edema e granuloma induzido por carragenina, assim como o aumento na permeabilidade vascular induzida por ácido acético. A atividade antifertilidade também foi avaliada, sendo constatada inibição da fase estrogênica do ciclo reprodutivo e supressão da implantação de forma reversível (ALMEIDA, RAO e MATOS, 1992). Rao, Silva e Medeiros (1995) verificaram atividade inibidora da implantação do ovo (zigoto) também para o extrato bruto etanólico relacionando-o com sua atividade antiinflamatória visto que neste período acontecem alterações fisiológicas no útero, semelhantes a uma inflamação.

Esta fração purificada também demonstrou proteger o fígado das lesões induzidas por tetracloreto de carbono. Aparentemente, por inibir a metabolização do mesmo pelas enzimas microssomais hepáticas, pois teve capacidade de aumentar o tempo de meia-vida do pentobarbital (FIGUEIREDO et al., 1992).

Existem mais estudos a respeito do isolamento de glicosídeos de norcucurbitacinas a partir da espécie conhecida popularmente como cabeça-de-negro. No entanto, não é apresentada identificação botânica da espécie, sendo ela designada pelos autores como “caput nigri”. No total, 12, cucurbitacinas foram isoladas. Algumas delas são bastante semelhantes às cucurbitacinas isoladas de *W. (c.f.) verticillata*, outras se assemelham mais a cucurbitacinas isoladas de *Wilbrandia ebracteata*. As cucurbitacinas foram denominadas: cabenosídeos A – L (NAKANO et al, 1994; NAKANO et al, 1995a; NAKANO et al, 1995b).

Em estudos para avaliação preliminar da atividade anticâncer foi utilizado o extrato hidroalcoólico das folhas de *W. verticillata*. A espécie mostrou 84% de inibição na dose diária de 115 mg/kg, i.p. (MORAES et al., 1997).

### **1.1.2. *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn.**

Classificação botânica:

Ordem: Cucurbitales

Família: Cucurbitaceae

Gênero: *Cayaponia*

Espécie: *Cayaponia tayuya* (L.) Cogn.

Conforme comentado na introdução, frequentemente ocorre confusão em relação à diferenciação entre *W. ebracteata* e *C. tayuya*, esta última descrita na Farmacopéia Brasileira I (1926) como taiuiá.

Bauer e colaboradores (1985) descreveram para o extrato diclorometânico de uma amostra comercial de *C. tayuya* o isolamento das cucurbitacinas: R e seu glicosídeo, 23,

24-di-hidrocurbitacina B e seu glicosídeo, cucurbitacina B e seu 2-O-glicosídeo. Assim como os C-glicoflavonóides swertisina, iso-orientina, spinosina, vicenina-2, vitexina, isovitexina, orientina. Como neste estudo foram utilizadas amostras comerciais de taiuiá e a composição química foi bastante semelhante àquela descrita para *W. ebracteata*, trata-se, provavelmente, desta espécie e não de *C. tayuya* (FARIAS e SCHENKEL, 1987; FARIAS, 1991).

Como resultado de outras pesquisas foram identificadas cucurbitacinas mais polares, isoladas de extrato metanólico previamente extraído com diclorometano. Estas substâncias foram denominadas cayaponosídeos, algumas das estruturas estão representadas na Tabela 3, as demais isoladas diferem destas pela cadeia lateral (HIMENO et al., 1992; HIMENO et al., 1993; HIMENO et al., 1994a; HIMENO et al. 1994b; HIMENO et al., 1994c). Cabe ressaltar que, em nenhum destes estudos a espécie utilizada foi identificada botanicamente.

Estes cayaponosídeos foram investigados também quanto à capacidade de inibir a ativação de um antígeno específico do Epstein-Barr vírus, induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato. Muitas substâncias que apresentam esta capacidade *in vitro* funcionam como inibidores da promoção de tumores *in vivo*. Os cayaponosídeos A<sub>6</sub>, A, D<sub>1</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub>, D<sub>2</sub>, B<sub>6a</sub>, D<sub>3a</sub>, B, B<sub>3</sub>, D, D<sub>3b</sub> e C<sub>2</sub> apresentaram atividade quimioprotetora. Sendo que, os cinco últimos apresentaram atividade superior ao controle. Três destes foram selecionados para um estudo *in vivo*, sendo capazes de diminuir significativamente a formação de papilomas em camundongos (KONOSHIMA et al., 1995).

Estudo a respeito da ação antiinflamatória avaliou esta atividade em diferentes extratos de planta coletada no Brasil como *C. tayuya* e cujo modo de identificação não foi comentado. Por CLAE foram identificadas as seguintes cucurbitacinas: cucurbitacina R e seu glicosídeo, cucurbitacina B e seu glicosídeo, di-hidrocurbitacina B e seu glicosídeo. O extrato clorofórmico desta planta apresentou atividade inibidora do edema induzido por carragenina, sendo a DE50 = 27 mg/kg e DL50 = 67 mg/kg i.p. e DE50 = 125 mg/kg e DL50 = 375 mg/kg p.o. (RÍOS et al., 1990).

### **1.1.3. *Luffa operculata* (L.) Cogn.**

Classificação botânica:

Ordem: Cucurbitales

Família: Cucurbitaceae

Gênero: *Luffa*

Espécie: *Luffa operculata* (L.) Cogn.



Figura 2: Frutos de *L. operculata*. Disponível em [www.gudjons.com/arznei1.htm](http://www.gudjons.com/arznei1.htm).

Em livro a respeito do uso de plantas medicinais empregadas na região nordeste do Brasil, Matos (2000) cita a espécie *L. operculata* como responsável por intoxicações graves, cujos sintomas incluem diarreia, vômitos, prostração, bradicardia, hipotensão, no caso de uso oral, e hemorragia nasal nos casos de tratamento local. O autor relaciona a toxicidade com a presença de saponinas e cucurbitacinas, referindo-se a estas substâncias como inflamatórias.

A publicação de artigos a respeito da composição química dos frutos de *L. operculata* se iniciou com Matos e Gottlieb (1960) com o isolamento de isocucurbitacina B (Tabela 1) do extrato clorofórmico destes frutos.

Posteriormente, também dos frutos de *L. operculata*, foram isolados glicosídeos de triterpenos do tipo damarano. Estes foram denominados luperosídeos A – H (KUSUMOTO et al., 1989). Foram isoladas ainda saponinas do tipo oleanano, denominadas luperosídeos I – L (OKABE et al, 1989). Em relação às cucurbitacinas, cucurbitacina B e seu 3-O-glicosídeo assim como cucurbitacina D (Tabela 1) foram identificadas por CLAE em *L. operculata* (BAUER, 1984). Foram isoladas também as neocucurbitacinas A e B, muito semelhantes às cucurbitacinas B e D respectivamente, diferenciando-se destas por apresentarem lactona no anel A (KAWAHARA et al., 2001).

Neocucurbitacina A e neocucurbitacina B, isoladas de *L. operculata* mostraram ter atividade no controle da formação óssea. Estas cucurbitacinas diminuem nível de proteína envolvida na diferenciação de osteoblastos – o que inibe formação óssea – e de outra proteína envolvida com atividade inibitória na diferenciação de osteoclastos – o que leva a aumento da reabsorção óssea. Elas atuam por aumentar a expressão dos genes que codificam tais proteínas (KAWAHARA et al., 2001).

Champney, Ferguson e Ferguson (1974) relataram alguns estudos farmacológicos realizados em camundongos com extrato aquoso de *L. operculata*. O extrato foi preparado por decocção sendo a concentração final 4% (1 g da droga para 25 mL de água). Este extrato foi administrado i.p. nas quantidades de 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 mL. Foi observado: aumento da defecação, diminuição da atividade motora. Testes para analgesia, influência no tempo de ação do hexobarbital, alteração na pressão arterial e atividade anti-histamínica não apresentaram diferença significativa em relação

ao controle. Não se pode chegar a alguma conclusão a respeito do mecanismo da ação sobre a congestão nasal, já que aparentemente não acontece por estimulação adrenérgica ou inibição da histamina.

Em revisão sobre a utilização da *L. operculata* em casos de congestão nasal, Salviano (1992a) discute o possível mecanismo de ação dos constituintes desta planta. De acordo com dissertação de mestrado em farmacologia (SILVA, 1983), citada pelo autor, os frutos de buchinha teriam propriedades colinérgicas e histaminérgicas, provocando vasodilatação dos capilares da mucosa nasal e aumento do movimento ciliar que provoca a expulsão do muco. O autor discute também a ausência de risco à saúde humana pela utilização desta planta (SALVIANO, 1992a). As propriedades acima descritas sugerem mecanismo de ação diferenciado daquele dos descongestionantes nasais e anti-histamínicos. As conclusões do autor são questionáveis, especialmente considerando que o estudo foi realizado com um produto comercial, patrocinado pelo produtor e que dados sobre a toxicidade disponíveis na literatura são menosprezados no artigo.

Um estudo clínico (SALVIANO, 1992b), o qual não envolveu grupo controle, com aplicação apenas de soro fisiológico, é freqüentemente citado como comprovação da eficácia de extrato de *L. operculata* disponível comercialmente em pacientes com sinusite. Estes dados carecem de uma análise crítica e aprovação por Comitê de Ética. Constata-se que são necessários mais estudos a respeito do mecanismo de ação das substâncias ativas desta planta e, principalmente estudos a respeito da segurança na sua utilização. Para tanto se faz necessário conhecer as substâncias responsáveis pelo efeito farmacológico e toxicidade.

#### **1.1.4. CUCURBITACINAS**

Os principais constituintes de plantas da família Cucurbitaceae são cucurbitacinas, óleos fixos contendo ácidos triênicos conjugados, aminoácidos não-proteinogênicos e esteróides (HEGNAUER, 1989). Algumas espécies apresentam a enzima elastase ( $\beta$ -glucosidase) que hidrolisa a ligação heterosídica de cucurbitacinas que se encontram na forma de glicosídeo (LAVIE e GLOTTER, 1971; GUHA e SEM, 1975; NEUWINGER, 1994; MIRÓ, 1995).

Cucurbitacinas são triterpenos tetracíclicos altamente oxigenados, que freqüentemente são referidos como princípios amargos de Cucurbitaceae (Figura 3) e Tabelas 1, 2 e 3). Elas têm sido isoladas de várias espécies desta família, as quais são conhecidas desde a antigüidade por suas propriedades tóxicas e terapêuticas. Foram

isoladas também de espécies de outras famílias de Angiospermas, porém com menor representatividade: Begoniaceae, Cruciferae, Datisceae, Desfontainiaceae, Elaeocarpaceae, Euphorbiaceae, Polemoniaceae, Primulaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae e Sterculiaceae. As cucurbitacinas mais frequentemente isoladas são B e E (NEUWINGER, 1994; MIRÓ, 1995; PAGOTO, KAPLAN e GOTTLIEB, 1996).

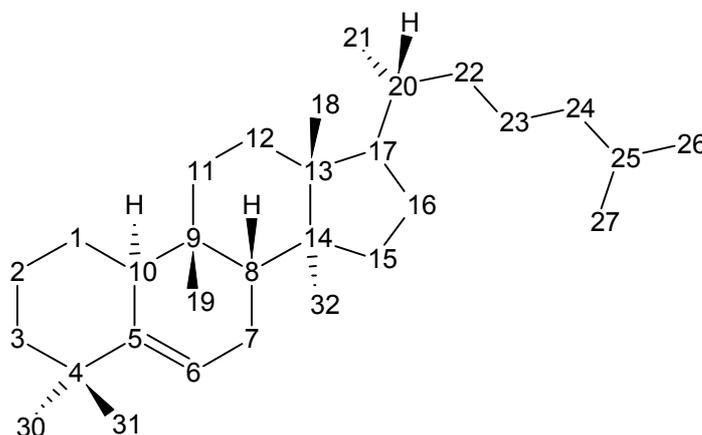
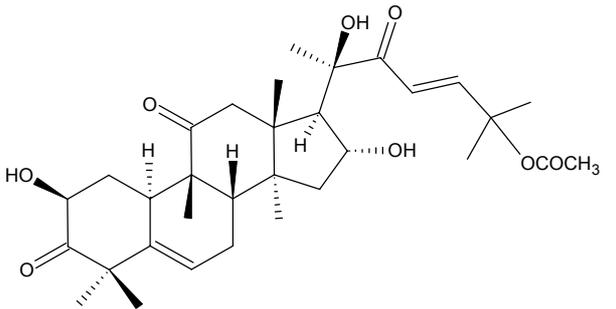
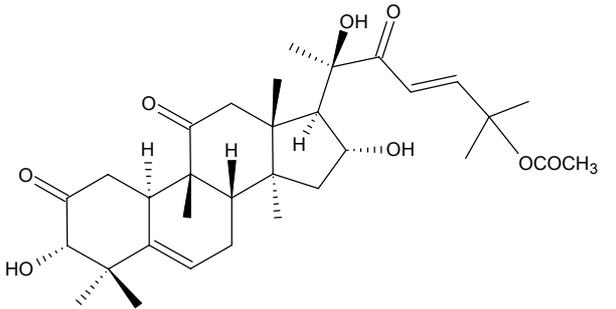
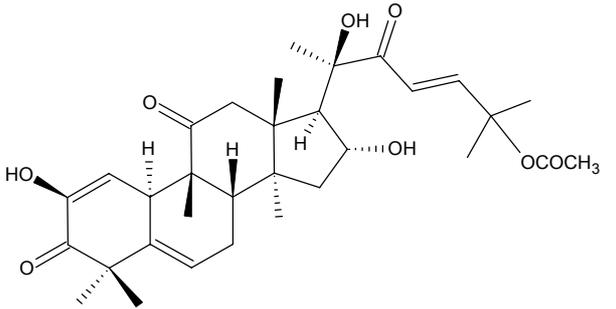
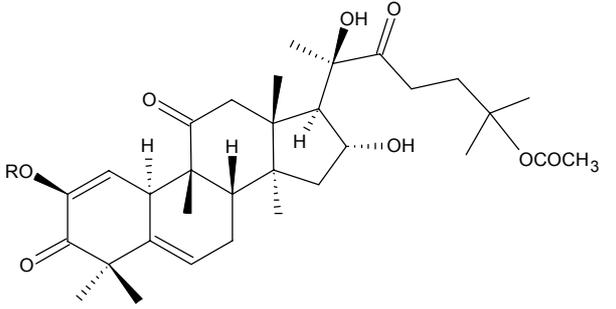
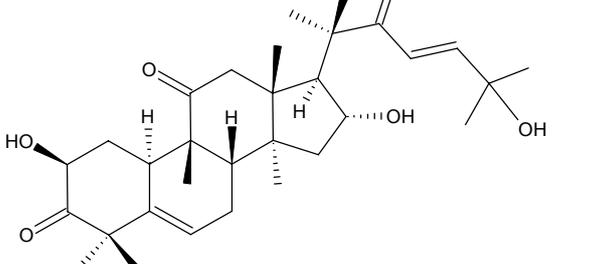
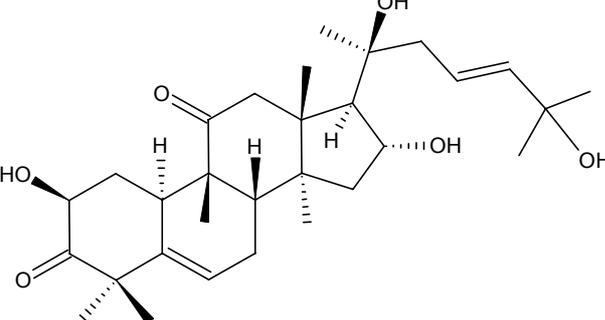
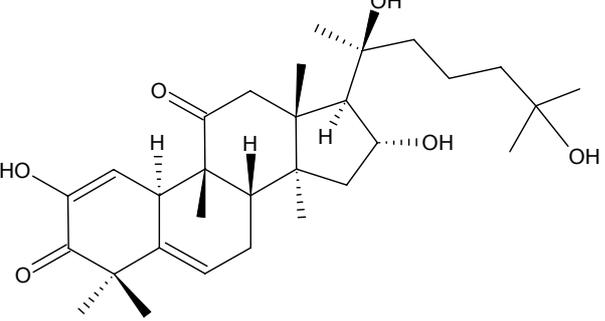
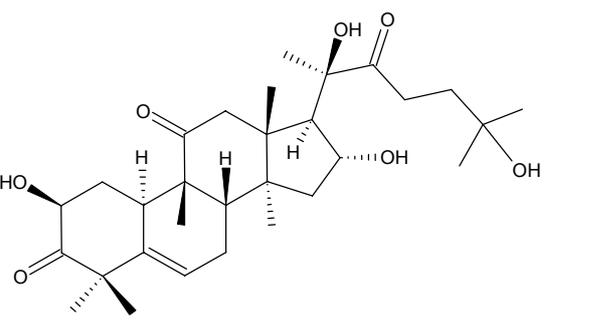
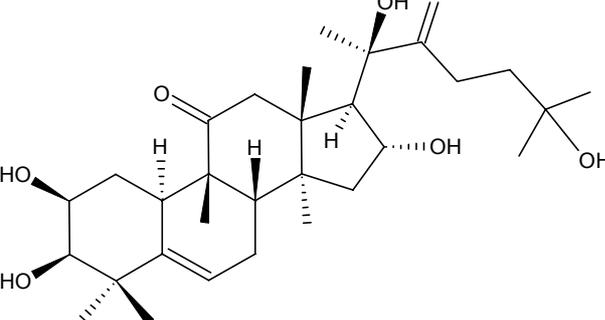
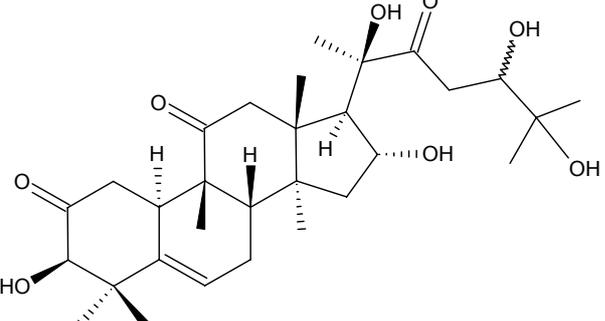


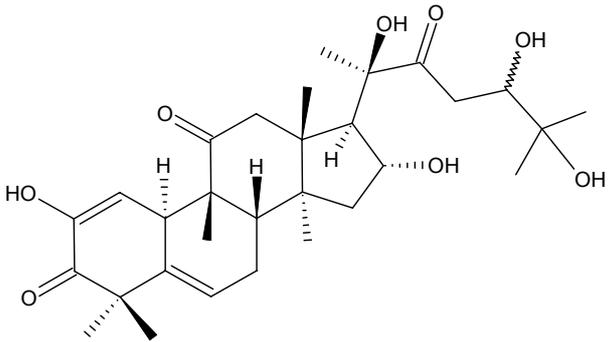
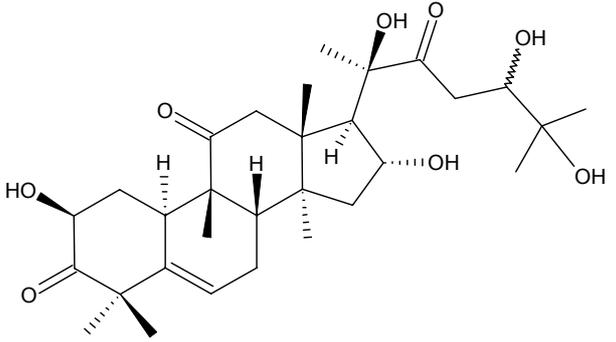
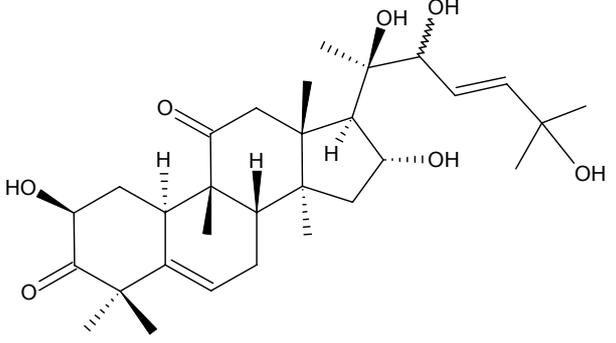
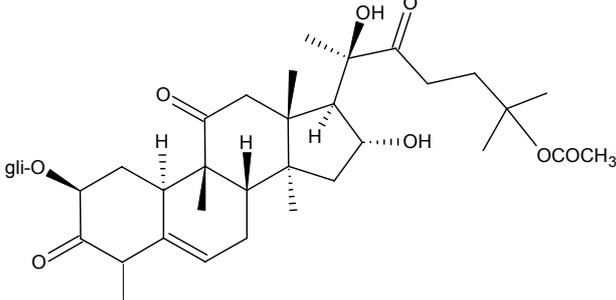
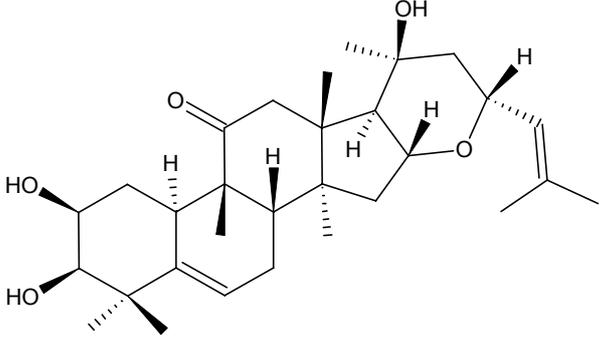
Figura 3: Estrutura geral das cucurbitacinas com numeração dos carbonos.

Tabela 1: Estrutura das cucurbitacinas isoladas de *W. ebracteata* e *L. operculata*.

NOME	FÓRMULA ESTRUTURAL	OCORRÊNCIA
R = H Di-hidrocucurbitacina B R = gli 2-O-β-D-Glicosídeo da Di-hidrocucurbitacina B		<i>W. ebracteata</i>
R = H Di-hidroisocucurbitacina B R = gli 3-O-β-D-Glicosídeo da Di-hidroisocucurbitacina B		<i>W. ebracteata</i>

NOME	FÓRMULA ESTRUTURAL	OCORRÊNCIA
Cucurbitacina B		<i>W. ebracteata</i> <i>L. operculata</i>
Isocucurbitacina B		<i>L. operculata</i>
Cucurbitacina E		<i>W. ebracteata</i> <i>L. operculata</i>
R = H Di-hidrocucurbitacina E R = gli 2-O-β-D-Glicosídeo da Di-hidrocucurbitacina E		<i>W. ebracteata</i>
Cucurbitacina D		<i>W. ebracteata</i> <i>L. operculata</i>

NOME	FÓRMULA ESTRUTURAL	OCORRÊNCIA
22-Deoxo-cucurbitacina D		<i>W. ebracteata</i>
22-Deoxo-cucurbitacina L		<i>W. ebracteata</i>
Cucurbitacina R		<i>W. ebracteata</i>
Cucurbitacina P		<i>W. ebracteata</i>
3-epi-isocucurbitacina G/H		<i>W. ebracteata</i>

NOME	FÓRMULA ESTRUTURAL	OCORRÊNCIA
Cucurbitacinas J e K		<i>W. ebracteata</i>
Cucurbitacina G e H		<i>W. ebracteata</i>
(20R) 22-oxi-2-β, 16-α, 20, 22, 25-penta-hidroxi-10-α-cucurbita-5, 23-dieno-3, 11-diona		<i>W. ebracteata</i>
(20R) 25-acetoxi-3, 16-α, 20-tri-hidroxi-30-nor-2-(β-D-glu-copirano-siloxi)-1,2,3,4,5,10-di-hidrocucurbit-6-eno-11, 22-diona		<i>W. ebracteata</i>
16-α, 23-α-epoxi-2-β, 3-β, 20-β-tri-hidroxi-10-α, 23-α-cucurbit-5, 24-dien-11-ona		<i>W. ebracteata</i>

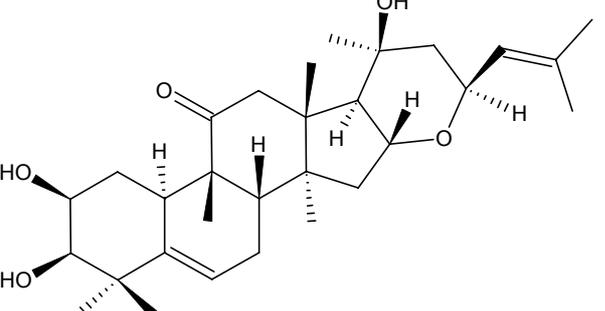
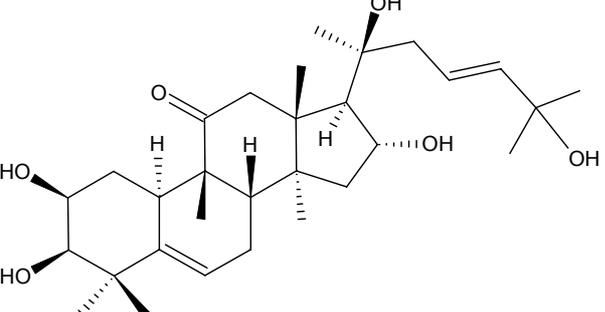
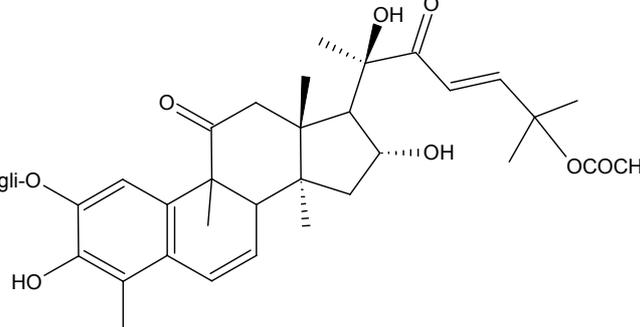
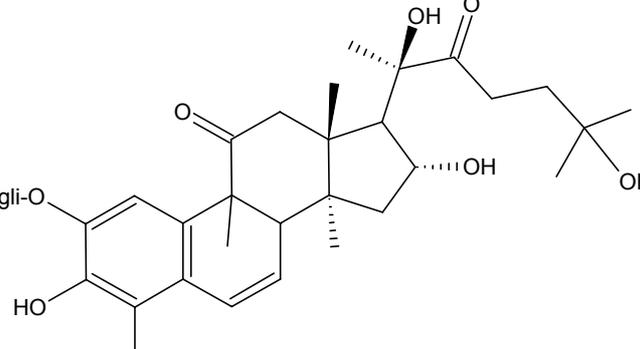
NOME	FÓRMULA ESTRUTURAL	OCORRÊNCIA
16- $\alpha$ , 23- $\alpha$ -epoxi-2- $\beta$ , 3- $\beta$ , 20- $\beta$ -tri-hidroxi-10- $\alpha$ , 23- $\beta$ -cucurbit-5, 24-dien-11-ona		<i>W. ebracteata</i>
2- $\beta$ , 3- $\beta$ , 16- $\alpha$ , 20, 25-penta-hidroxi-10- $\alpha$ , 5, 23-dien-11-ona		<i>W. ebracteata</i>

Tabela 2: Cucurbitacinas isoladas de *W. verticillata*.

NOME	FÓRMULA ESTRUTURAL
29-nor-1, 2, 3, 4, 5, 10-di-hidro-25-O-acetil-2-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-3,16 $\alpha$ ,20(R) tri-hidroxi-11, 22-dioxocucurbita-6, 23-dieno	
29-nor-1, 2, 3, 4, 5, 10-di-hidro-2-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-3, 16 $\alpha$ , 20 (R) tetra-hidroxi-11, 22-dioxocucurbita-6-dieno	

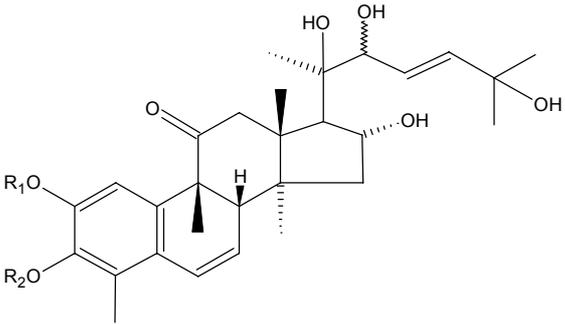
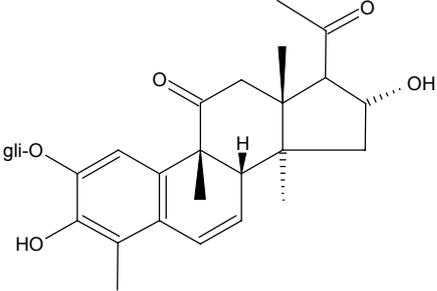
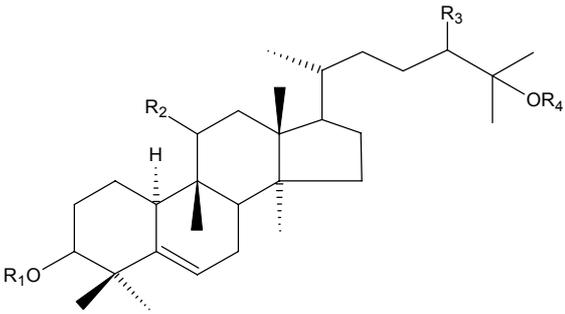
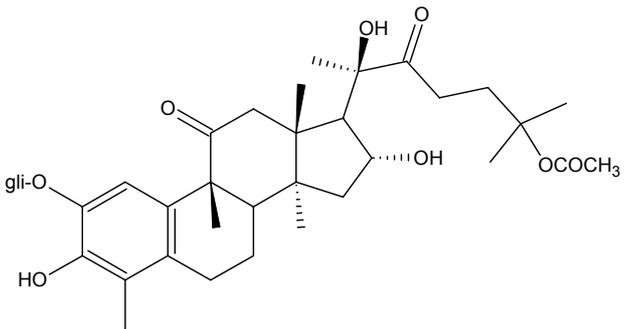
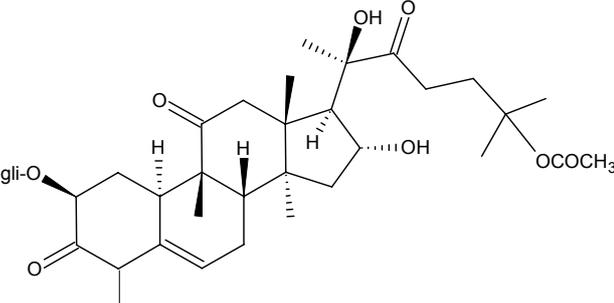
NOME	FÓRMULA ESTRUTURAL																														
<p>Cabenoídeos A: R1 = Gli e R2 = H</p> <p>Cabenoídeos B: R1 = Gli - Gli</p>																															
<p>Cabenoídeo C</p>																															
<p>Cabenoídeos:</p> <table border="1" data-bbox="209 981 699 1227"> <thead> <tr> <th></th> <th>R1</th> <th>R2</th> <th>R3</th> <th>R4</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>D</td> <td>gli</td> <td>O</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>E</td> <td>gli</td> <td><math>\alpha</math>OH</td> <td>O</td> <td>gli</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td>gli (1→2) gli</td> <td><math>\alpha</math>OH</td> <td>O</td> <td>gli</td> </tr> <tr> <td>G</td> <td>gli (1→6) gli</td> <td><math>\alpha</math>OH</td> <td>O</td> <td>gli</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>gli (1→6) gli</td> <td>O</td> <td>O</td> <td>gli</td> </tr> </tbody> </table>		R1	R2	R3	R4	D	gli	O	OH	H	E	gli	$\alpha$ OH	O	gli	F	gli (1→2) gli	$\alpha$ OH	O	gli	G	gli (1→6) gli	$\alpha$ OH	O	gli	H	gli (1→6) gli	O	O	gli	
	R1	R2	R3	R4																											
D	gli	O	OH	H																											
E	gli	$\alpha$ OH	O	gli																											
F	gli (1→2) gli	$\alpha$ OH	O	gli																											
G	gli (1→6) gli	$\alpha$ OH	O	gli																											
H	gli (1→6) gli	O	O	gli																											

Tabela 3: Algumas cucurbitacinas isoladas de *C. tayuya*.

NOME	FÓRMULA ESTRUTURAL
<p>Cayaonosídeo A</p>	

NOME	FÓRMULA ESTRUTURAL
Cayaponosídeo A1	

Muitas cucurbitacinas são solúveis em éter de petróleo, clorofórmio, benzeno, acetato de etila, metanol, etanol; insolúveis em éter e levemente solúveis em água. O sabor amargo de plantas com cucurbitacinas pode ser atribuído a estas substâncias ou a saponinas, apesar de alguns heterosídeos de cucurbitacinas, especialmente do gênero *Momordica*, apresentarem sabor doce (GUHA e SEM, 1975; HEGNAUER, 1989).

#### 1.1.4.1. Toxicidade

Algumas cucurbitacinas são citotóxicas, apresentando, portanto, estreita margem de segurança. Por exemplo, a cucurbitacina B (ARISAWA et al., 1997), a isocucurbitacina B, a 3-epi-isocucurbitacina B (ARISAWA et al., 1984), cucurbitacina F (FANG et al., 1984) e cucurbitacina D (TESSIER e PARIS, 1978; DANG et al., 1994), são citadas como de elevada toxicidade.

O glicosídeo da cucurbitacina E causou diminuição da força de contração e da frequência cardíaca, e aumento do fluxo sanguíneo nas coronárias, em estudo com coração isolado de cobaias fêmeas (MÜLLER e WICHTI, 1979).

Em Israel, foram relatados casos de intoxicação por suco do fruto de *Ecbalium elaterium* (pepino-de-São-Gregório), uma planta cujo componente principal é a cucurbitacina B e cujo uso popular é semelhante ao de *Luffa operculata*, sendo muito utilizada em países mediterrâneos para tratamento de sinusite e doenças hepáticas. Concluiu-se que a exposição ao suco, especialmente se concentrado, pode causar irritação de membranas mucosas, supostamente de origem inflamatória. Deve-se manter os pacientes em observação, pois pode haver obstrução das vias aéreas no caso de administração via oral ou intranasal. No caso do suco ter atingido os olhos, estes devem ser lavados prontamente a fim de se evitar dano na córnea e conjuntiva. Os sintomas de intoxicação são: irritação nas mucosas, edema, dispnéia, disfagia, vômitos, conjuntivite, edema de córnea, erosão de membranas, conforme a via de exposição. O contato com a pele não apresentou desenvolvimento de sintomas (RAIKHLIN-EISENKRAFT e BENTUR,

2000). Vlachos e Kanitsakis (1994) relatam caso de morte por insuficiência cardíaca e renal de usuária do suco de *E. elaterium* em aspirações nasais no tratamento de sinusite crônica. Os sintomas observados incluem: edema de mucosa nasal e face, dispnéia, taquicardia, falência renal e insuficiência cardíaca.

Intoxicações por plantas podem ocorrer tanto por falta de qualidade da planta utilizada como medicinal ou por uso indevido, causado pelo desconhecimento a respeito da possibilidade de intoxicação. O diagnóstico preciso e, conseqüentemente, a utilização da terapia mais adequada, são decisivos na prevenção de danos maiores à saúde de pessoas intoxicadas. Neste sentido, o desenvolvimento de métodos de análise quantitativa de substâncias ativas de plantas tanto na própria planta ou extrato, como parte da garantia de sua qualidade, quanto a partir de material biológico (sangue e urina) – para diagnóstico preciso de intoxicações, é desejável (STEWART, STEENKAMP e ZUCKERMAN, 1998).

#### **1.1.4.2. Atividade farmacológica**

Plantas da família Cucurbitaceae têm sido usadas desde a antigüidade como vermífugos e eméticos (LAVIE e GLOTTER, 1971; GUHA e SEM, 1975; NEUWINGER, 1994; MIRÓ, 1995).

Cucurbitacinas são também conhecidas por suas atividades citotóxicas e anticancerígenas (DUNCAN et al., 1996; DUNCAN e DUNCAN; 1997; GUHA e SEN, 1975; KONOSHIMA et al., 1995; LAZARIS et al, 1998; MIRÓ, 1995; RAO et al., 1991; RYU et al., 1995).

Em relação ao mecanismo de ação, foi testada a possibilidade das cucurbitacinas se ligarem a receptores para esteróides de células HeLa. O experimento verificou que há competição entre as cucurbitacinas B, I e J, e a tetra-hidrocucurbitacina I (=cucurbitacina R), e o cortisol, sendo que a ligação com o receptor é reversível e dose-dependente (WITKOWSKI e KONOPA, 1981).

As cucurbitacinas B, D e I, e a tetra-hidrocucurbitacina I (=cucurbitacina R) têm a capacidade de inibir a biossíntese de DNA, RNA e proteínas em células HeLa S3, levando à inibição da proliferação celular. Foi observada inibição da incorporação de timidina no DNA, de uridina no RNA e leucina em proteínas, sendo excluída a possibilidade destes efeitos serem resultantes de lise celular. Estudos iniciais indicaram uma ação mediada por receptores para glicocorticóides. No entanto, posteriormente, foi constatado que esteróides não alteram a taxa de inibição da biossíntese de macromoléculas pelas cucurbitacinas estudadas. Estudo com inibidores da transcrição e

tradução demonstraram que a ação das cucurbitacinas não depende destes processos (WITKOWSKI, WOYANAROWSKA e KONOPA, 1984).

Foi observada inibição significativa da adesão de leucócitos ao endotélio mediada por integrinas por parte da cucurbitacina E, isolada das sementes e folhas de *Conoclema scoparioides* (Scrophulariaceae). A atividade desta substância foi comparada com a de outras cinco cucurbitacinas: B, I, D, L, e R, sendo que a maior potência foi encontrada para as cucurbitacinas B e E. Esta atividade indica o potencial das cucurbitacinas testadas como agentes antiinflamatórios (MUSZA et al., 1994).

Foi observada inibição do crescimento de células de carcinoma de próstata pela cucurbitacina E. Estudando-se o mecanismo desta ação constatou-se que esta substância é capaz de desestabilizar o citoesqueleto e desagregar filamentos de actina (DUNCAN et al., 1996).

A cucurbitacina E também mostrou atividade inibitória sobre o endotélio em fase de proliferação. Sendo que, doses mais elevadas e maior tempo de exposição são necessários para atingir o endotélio normal. Este efeito parece estar relacionado com o fato da cucurbitacina E agir no citoesqueleto (DUNCAN e DUNCAN, 1997).

*E. elaterium* foi investigada em relação à sua composição química e propriedades farmacológicas. O isolamento da substância ativa (cucurbitacina B) foi monitorado através da diminuição da permeabilidade vascular, cujo aumento foi induzido com ácido acético. Cucurbitacina B isolada mostrou atividade inibidora de edemas induzidos por serotonina e bradicinina em camundongos. Em *E. elaterium* foi encontrada concentração de cucurbitacina B igual a 2,48% por CLAE. Foi observado que o suco desta planta, após aplicação nas fossas nasais provoca severa congestão no trato respiratório superior (AGIL et al., 1999; SEZIK, 1998; YESILADA et al., 1988).

Foram encontrados dados a respeito de efeito tanto curativo quanto preventivo de hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) por parte da cucurbitacina B, isolada de *E. elaterium*. Foi observada redução significativa da necrose, esteatose e inflamação por exame histopatológico (AGIL et al., 1999).

Diglicosídeo (posições 2 e 25) da cucurbitacina R, isolado das raízes de *Bryonia alba* L., induz elevação dos níveis plasmáticos de PGE<sub>2</sub> de ratos submetidos a estresse por imobilização. Também foi constatada inibição da liberação de ácido araquidônico, o que diminui a biossíntese de eicosanóides (mediadores da inflamação), e aumento na biossíntese e secreção de corticoesteróides. Portanto, este glicosídeo tem a capacidade de prevenir alterações características de uma situação de estresse. Estes estudos foram realizados objetivando a caracterização de plantas adaptógenas, considerando que o estresse aumenta nível plasmático de eicosanóides e diminui os de PGE<sub>2</sub>. Estes achados podem explicar por que plantas que contém cucurbitacinas são utilizadas em doenças

que podem ser tratadas estimulando-se o córtex da adrenal como inflamação e alergia (PANOSSIAN, GABRIELIAN e WAGNER, 1997 e 1999; WAGNER, NORR e WINTERHFF, 1994).

Di-hidrocurbitacina D, obtida a partir da cucurbitacina D, apresentou efeito contraceptivo em estudo com camundongos. Sendo que não foi observado efeito antagônico ou sinérgico com estrogênio. Em úteros maduros constatou-se a inibição da ovulação, o aumento de tamanho e a hiperplasia das glândulas, não tendo sido observadas malformações congênitas. Segundo o autor, provavelmente, a substância estudada interfere no mecanismo de controle endócrino do sistema reprodutivo (SHOHAT et al, 1972).

Edery, Schatzber-Porath e Gitter (1961) realizaram diversos testes farmacológicos com a cucurbitacina D isolada de *E. elaterium*. Foram registrados o aumento da permeabilidade capilar, edema pulmonar, queda na pressão arterial, ausência de liberação de histamina e aumento na motilidade gastrointestinal.

#### **1.1.4.3. Análise quali e quantitativa de cucurbitacinas**

Os principais métodos utilizados para a análise quantitativa de cucurbitacinas são: cromatografia em camada delgada com quantificação por densitometria óptica e cromatografia líquida de alta eficiência (KEULEN, 1981; BAUER, 1984; HUTT e HERRINGTON, 1985; GORSKI et al., 1986; STUPPNER e WAGNER, 1992; HALAWEISH e TALLAMY, 1993; MATSUO et al., 1999; STURM e STUPPNER, 2000). A CCD é empregada tanto como método qualitativo quanto quantitativo, sendo que para ser utilizada como método quantitativo é necessário que a intensidade das manchas seja medida e que juntamente com a amostra seja realizada corrida cromatográfica com um padrão de concentração conhecida. A detecção cromatográfica com vanilina fosfórica permite distinguir determinadas características químicas das cucurbitacinas. Aquelas que possuem carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada na cadeia lateral resultam no desenvolvimento de coloração violeta, enquanto que aquelas com carbonila  $\alpha,\beta$ -saturada fornecem manchas amarelas (LAVIE e GLOTTER, 1971; SCHENKEL et al., 1992; FARIAS, 1991).

Como algumas cucurbitacinas apresentam grupamentos cromóforos, por exemplo, cadeia lateral com carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada (cucurbitacina B) ou anel A com função diosfenol (cucurbitacina E), portanto, podem ser dosadas por espectrofotometria no UV.

Quanto à análise por CLAE, a maioria dos artigos publicados até o momento trata da análise de cucurbitacinas em alimentos, ou seja, são utilizadas outras espécies vegetais como pepino, abóbora, melancia (BAUER, 1984; HUTT e HERRINGTON, 1985;

GORSKI et al., 1986; STUPPNER e WAGNER, 1992; HALAWEISH e TALLAMY, 1993; MATSUO et al., 1999; STURM e STUPPNER, 2000). As Tabelas 4 e 5 reúnem os parâmetros utilizados nestes estudos.

Keulen (1981) utilizou CCD com quantificação por densitometria na quantificação de cucurbitacina C em *Cucumis sativus* (pepino), visando determinar quais eram impróprios para consumo. Para a mesma espécie foi desenvolvido um método por CLAE, cujo preparo da amostra envolveu extração com clorofórmio com agitação e posterior passagem por coluna com sulfato de sódio anidro. Para a determinação da quantidade de glicosídeo da cucurbitacina C, este foi utilizado como padrão externo (HUTT e HERRINGTON, 1985).

Bauer (1984) em sua tese de doutorado apresenta dados preliminares a respeito da análise de cucurbitacinas em extratos vegetais por cromatografia líquida de alta eficiência. O comprimento de onda utilizado foi 230 nm por contemplar a maior parte das cucurbitacinas. Foi discutido o fato de existirem cucurbitacinas apenas com absorção terminal, pois não apresentam grupamentos cromóforos, por exemplo, a di-hidrocurbitacina B, e cucurbitacinas cujo único cromóforo é o anel A com função diosfenol, por exemplo, a cucurbitacina L, cujo máximo de absorção no UV encontra-se em 270 nm. De acordo com o trabalho foram encontradas nas raízes de *C. tayuya* as seguintes cucurbitacinas, em ordem decrescente de tempo de retenção: di-hidroisocucurbitacina B, di-hidrocurbitacina B (30 min.), cucurbitacina B (28,5 min.), glicosídeo da di-hidrocurbitacina B, glicosídeo da cucurbitacina B (20,2 min.), cucurbitacina R e seu glicosídeo. Ou seja, mesmo as cucurbitacinas que apresentam apenas absorção terminal no UV foram detectadas utilizando detector UV em comprimento de onda igual a 230 nm.

Para o doseamento de cucurbitacina C em cotilédones de pepino, Gorski e colaboradores (1986) utilizaram CLAE e cromatografia em camada delgada (CCD) (GORSKI et al., 1986).

Outro trabalho trata do desenvolvimento de método por CLAE e cromatografia em camada delgada de alta eficiência para determinação de cucurbitacinas B, D, E e I, 3-epi-iso-cucurbitacina D, assim como glicosídeos de cucurbitacina E e I em espécies de abóbora. Neste método ao invés da utilização do extrato bruto metanólico, foi utilizado procedimento de purificação da amostra a fim de se preservar a coluna cromatográfica. As amostras foram extraídas com clorofórmio em tubos de ensaio, homogeneizadas, filtradas e secas; na purificação foram utilizadas colunas C18 (0,2 g), fase móvel metanol: água 8:2. A cromatografia em camada delgada de alta eficiência de fase reversa foi desenvolvida com metanol:água 7:3 e a de fase normal com tolueno:acetato de etila 25:75 (HALAWEISH e TALLAMY, 1993).

Panossian, Gabrielian e Wagner (1997) utilizaram método de quantificação de cucurbitacinas por CLAE na caracterização de comprimidos de *Bryonia alba* utilizados como fitoterápico.

Na determinação de elaterinida ou glicosídeo da cucurbitacina E no suco de melancia o processo de preparo da amostra a ser injetada no CLAE também difere dos demais trabalhos: 1 mL do suco foi misturado com 1 mL de acetofenona 0,01% em metanol, esta mistura foi filtrada (0,2  $\mu$ m) e a análise foi realizada utilizando um padrão interno (acetofenona) ao invés de padrão externo (MATSUO et al., 1999).

O trabalho mais recente trata da análise de diversas cucurbitacinas em diferentes espécies vegetais por CLAE acoplado a espectrofotômetro de massas. As amostras foram preparadas com 2g do material vegetal, extraídas em Soxhlet com metanol. O extrato seco foi dissolvido em metanol e purificado em coluna de Sephadex LH-20. Os picos foram detectados em 210 nm e identificados por espectrometria de massas (STURM e STUPPNER, 2000).

Tabela 4: Comparação entre os métodos de análise de cucurbitacinas por CLAE em relação ao modo de preparo da amostra, comprimento de onda de detecção e substância padrão.

<b>Autor</b>	<b>Modo de preparo</b>	<b>Deteção</b>	<b>Padrão</b>
BAUER, 1984	Soxhlet: EP e CHCl <sub>3</sub>	230 nm	Diversas cucurbitacinas
HUTT e HERRINGTON, 1985	Extrato CHCl <sub>3</sub>	235 nm	Glicosídeo da CE
GORSKI et al., 1986	Extrato metanólico	254 nm	Cucurbitacina C
STUPPNER e WAGNER, 1992	Extrato metanólico Sephadex	210 nm 280 nm	Diversos glicosídeos de cucurbitacinas
HALAWEISH e TALLAMY, 1993	Extrato CHCl <sub>3</sub> Extração fase sólida	229 nm	7 Cucurbitacinas
PANOSSIAN, GABRIELIAN e WAGNER, 1997	Extrato metanólico	229 nm	Metilresorcilato
MATSUO et al., 1999	Suco	237 nm	Acetofenona
STURM e STUPPNER, 2000	Soxhlet metanol Sephadex	210 nm	Diversas cucurbitacinas

Tabela 5: Comparação entre os métodos de análise de cucurbitacinas por CLAE em relação ao eluente, fluxo e tipo de coluna

<b>Autor</b>	<b>Eluente (tempo de eluição)</b>	<b>Fluxo</b>	<b>Coluna</b>
BAUER, 1984	Gradiente: 20% a 50% de CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O (40 min)	2,0 mL/min	C-18 300 X 4 mm (μ-Bondapak)
HUTT e HERRINGTON, 1985	MeOH:H <sub>2</sub> O 70:30	1,5 mL/min	C-18 300 X 4,5 mm (Waters Bondapak)
GORSKI et al., 1986	MeOH:H <sub>2</sub> O 55:45	2,0 mL/min	C-18 150 X 4,6 mm
STUPPNER e WAGNER, 1992	Gradiente: 80% a 60% de H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> CN (30 min)	1,0 mL/min	C-18, 125 mm (LiChrospher-100)
HALAWEISH e TALLAMY, 1993	Gradiente: 20% a 45% de CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O (35 min)	2,0 mL/min	C-18 200 X 4,5 mm (Hewlett Packard)
PANOSSIAN, GABRIELIAN e WAGNER, 1997	Gradiente: 0% a 100% MeOH:H <sub>2</sub> O (30 min)	1,0 mL/min	C-18 125 X 4 mm (LiChrospher)
MATSUO et al., 1999	MeOH:H <sub>2</sub> O 2:1 (10 min)	1,5 mL/min	C-18, 25 cm (Supelco)
STURM e STUPPNER, 2000	Gradiente: 80% a 60% de H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> CN (20 min) e 60% a 20% (22 min) 0,01% ácido trifluoroacético	1,0 mL/min	C-18 150 X 4,6 mm (Zobax)

Não foram encontrados trabalhos sobre a utilização de espectrofotometria no UV no doseamento de cucurbitacinas, mas como algumas destas substâncias apresentam absorção na região do ultravioleta existe a possibilidade de serem dosadas por este método, o qual poderia ser uma alternativa mais econômica para laboratórios de pequeno porte.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver métodos para doseamento de cucurbitacina B e di-hidrocucurbitacina B em *Wilbrandia ebracteata* Cogn. e *Luffa operculata* (L.) Cogn., empregando cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE e espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar di-hidrocucurbitacina B e cucurbitacina B para serem empregadas nos ensaios farmacológicos e utilizadas como padrão;
2. Desenvolver e otimizar os parâmetros da análise em HPLC e espectrofotômetro no UV;
3. Otimizar o modo de preparo das amostras das drogas vegetais a serem empregadas nos doseamentos;
4. Determinar a linearidade, a exatidão e a precisão dos métodos desenvolvidos.
5. Analisar amostras comerciais de taiuiá e buchinha pelos métodos desenvolvidos;
6. Realizar análise qualitativa e quantitativa das frações de *W. ebracteata* e *L. operculata* empregados nos ensaios farmacológicos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAIS

##### 3.1.1. MATERIAL VEGETAL

Foram empregadas raízes de *W. ebracteata* coletadas em três momentos diferentes e frutos de *L. operculata* adquiridos no mercado (Tabela 6).

Tabela 6: Relação das espécimes de *W. ebracteata* e *L. operculata* e a etapa do trabalho onde as mesmas foram utilizadas.

<b>CÓDIGO</b>	<b>ÉPOCA DE COLETA</b>	<b>LOCAL DE COLETA</b>	<b>ETAPA</b>
<b>WE00</b>	Dezembro de 1987	Nova Petrópolis	Isolamento de DHCB Testes farmacológicos
<b>WE01</b>	Janeiro de 2001	Florianópolis	Desenvolvimento dos métodos de doseamento
<b>WE02</b>	Maio de 2002	Florianópolis	Validação
<b>LO01</b>	*	*	Isolamento de CB Testes farmacológicos
<b>LO02 e LO03</b>	*	*	Análise de amostras comerciais

\* Frutos adquiridos no comércio.

*W. ebracteata* foi identificada pelo botânico Sérgio Bordignon (Departamento de Botânica, Universidade de Pelotas, RS) e o material testemunha foi depositado no herbário do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFRGS.

As raízes de WE02 foram moídas e tamisadas (tamis 1 mm). O material obtido apresentou a seguinte granulometria: 38% ficou retido em tamis 0,6 mm; 15% ficou retido entre os tamises 0,6 e 0,42 mm; 18% entre os tamises 0,42 mm e 0,25 mm e 20% passou pelo tamis 0,25 mm.

Os frutos de *L. operculata* foram adquiridos íntegros no comércio local. Por serem muito característicos sua identificação botânica foi realizada por comparação com dados da literatura. Estes foram grosseiramente rasurados com tesoura devido às características do material (fibras e ação irritante do pó).

### **3.1.2. EQUIPAMENTOS E SOLVENTES**

As análises por CLAE foram realizadas em aparelho CLAE Shimadzu, modelo VP, com duas bombas e detector UV – Visível, sendo que o controle do equipamento e o armazenamento dos dados foram realizados através do programa Class-VP. A separação aconteceu em coluna de fase reversa C18 (Supelco), com tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$ , 150 mm de comprimento e 4,6 mm de largura. A pré-coluna foi preenchida também com sílica de fase reversa C-18 (Lichropred<sup>®</sup>). As amostras foram filtradas através de membranas de celulose regenerada (0,45  $\mu\text{m}$ ). Em cada análise foram injetados 20  $\mu\text{L}$  pelo método manual.

Nas análises por espectrofotometria de absorção no ultravioleta (UV), foi utilizado espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 10, cujo comprimento de onda vai do ultravioleta ao visível.

Em todas as análises foi utilizada balança analítica Bel Engineering com precisão 0,1 mg.

As raízes foram moídas em moinho de café, marca Walita.

Os solventes utilizados no preparo do eluente para as análises por CLAE e UV foram acetonitrila grau CLAE/UV (Nuclear) e água MiliQ. Para fins de teste foi utilizado também metanol grau CLAE/UV (Nuclear).

No preparo dos extratos e frações foram utilizados os seguintes solventes e reagentes, grau PA: éter de petróleo, diclorometano, n-hexano, ácido acético, ácido clorídrico e hidróxido de amônio (Nuclear). Sendo que o extrato bruto foi obtido com etanol 96°GL comercial.

As pipetas e balões volumétricos, utilizados no doseamento, tiveram seu volume aferido. Foram descartados os materiais que não preenchem os requisitos das normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT): MB 3119 (07/89), PB 1547 (08/91) e NBR 12617.(08/92).

Para análise de cucurbitacinas por CCD utilizou-se: placas de gel de sílica G em folhas de alumínio (Merck) com detector de fluorescência em 254 nm e o revelador vanilina fosfórica (1g de vanilina em 100 mL de ácido fosfórico 50% em etanol). A visualização foi realizada sob luz visível ou ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 360nm, antes e após aplicação do revelador vanilina fosfórica.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

No decorrer do trabalho foram utilizados extratos e frações de diferentes fontes. A Tabela 7 relaciona os códigos das frações e extratos utilizados neste trabalho, cuja preparação é descrita a seguir.

Tabela 7: Relação dos extratos e frações utilizados no decorrer do trabalho.

<b>Código</b>	<b>Etapa</b>
<b>WE00DC</b>	Isolamento de DHCB Caracterização e utilização em testes farmacológicos
<b>WE01DC</b>	Desenvolvimento dos métodos de doseamento
<b>WE02MR</b>	Validação
<b>A1-A5</b>	Aplicação do método nas análises de amostras comerciais de taiuiá
<b>LO01DC</b>	Isolamento de CB Caracterização e utilização em testes farmacológicos
<b>LO02MR e LO03MR</b>	Aplicação do método nas análises de amostras comerciais de buchinha

**WE00DC** – a amostra WE00 (cerca de 3 kg) foi inicialmente submetida à maceração com éter de petróleo (EP) e, após filtração e prensagem, o resíduo foi remacerado com metanol. O extrato metanólico foi concentrado em evaporador rotatório, resultando em 310 g de extrato seco. O extrato seco (100 g) foi ressuspenso em água e submetido à partição sucessiva com EP (4 vezes 100 mL) e diclorometano (DC) (3 vezes 100 mL). A fração diclorometânica foi concentrada em evaporador rotatório, resultando em cerca de 75 g de pó amarelo, codificado como WE00DC (FARIAS, 1991).

**WE01DC** – a amostra WE01 (cerca de 280 g) foi macerada com etanol 96°GL. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório, ressuspenso em água e submetido à partição com EP (3 vezes 20 mL) e DC (4 vezes 20 mL). A fração diclorometânica foi concentrada e codificada como WE01DC.

**LO01DC** – a amostra comercial LO01 (175 g) foi submetida à maceração em etanol 96°GL. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório, ressuspenso em água e submetido à partição com EP (3 vezes 20 mL) e DC (4 vezes 20 mL). A fração diclorometânica foi concentrada e codificada como LO01DC.

A Tabela 8 relaciona as frações obtidas na partição com os respectivos rendimentos em relação ao extrato bruto e à planta seca.

Tabela 8: Rendimento das frações obtidas após a partição dos extratos brutos de WE01 e WE02.

<i>Fração</i>	<i>Rendimento em relação ao EBWE-1 (%)</i>	<i>Rendimento em relação à droga (%)</i>
<b>WE01EP</b>	6,99	0,085
<b>WE01DC</b>	<b>16,79</b>	<b>0,21</b>
<b>LO01EP</b>	3,16	0,18
<b>LO01DC</b>	<b>47,73</b>	<b>2,75</b>

Na Figura 4 é apresentado o perfil cromatográfico em CCD das frações diclorometânicas WE01DC e LO01DC.

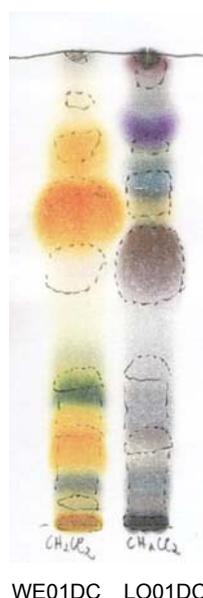


Figura 4: CCD comparativa das frações WE01DC e LO01DC. Eluente EP:AcOEt 1:1, fase estacionária: gel de sílica G F<sub>254</sub> e revelador: vanilina fosfórica.

Os extratos WE02MR, LO02MR, LO03MR, A1 – A5 foram elaborados através do método de preparo da amostra desenvolvido (Figura 17, item 4.2.2).

### **3.2.2. OBTENÇÃO DOS PADRÕES**

Para utilização como padrão externo nos métodos de doseamento, bem como para a realização de ensaios farmacológicos, inicialmente foram isoladas di-hidrocurbitacina B (DHCB) de *W. ebracteata* e curbitacina B (CB) de *L. operculata*.

No desenvolvimento dos métodos de doseamento, os padrões isolados foram utilizados na determinação da curva de calibração, no preparo da solução para o teste de recuperação para determinação da exatidão do método, no preparo das soluções usadas como padrão externo na determinação da precisão do método e para determinação da estabilidade do padrão. As Figuras 5 e 6 indicam estas etapas, bem como as diluições realizadas a partir da solução estoque e empregadas em cada situação.

### **3.2.2.1. Di-hidrocurbitacina B**

A partir da fração WE00DC foi realizada cromatografia em coluna de gel de sílica 60, tendo como eluente EP:AcOEt 1:2. Foi obtida fração purificada de *W. ebracteata*, contendo as cucurbitacinas mais apolares da fração diclorometano, da qual foi isolada di-hidrocurbitacina B (DHCB). O método de separação foi cromatografia em coluna, utilizando-se gel de sílica 60 (tamanho de partícula 0,063 – 0,200 mm) na primeira coluna e gel de sílica 60 (tamanho de partícula 0,04 – 0,063) na purificação final, o eluente foi composto por EP:AcOEt:isopropanol 20:10:0,8; obtendo-se 30 mg de pó branco.

A identificação da DHCB isolada foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD), com a utilização de padrão identificado por RMN (FARIAS, 1991), e pelo espectro de absorbância no UV (solução a 0,1 mg/mL).

### **3.2.2.2. Cucurbitacina B**

A CB foi obtida a partir da fração LO01DC. Inicialmente a separação foi realizada por cromatografia em coluna de gel de sílica 60 com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluente. A seguir foi realizada mais uma separação em coluna de gel de sílica 60, mas como eluente foi utilizada mistura de EP:AcOEt:Isopropanol 20:5:0,5.

A identificação da CB isolada foi realizada por CCD em comparação com padrão, espectrofotometria de absorção no UV (solução a 0,1 mg/mL) e por RMN, sendo os espectros comparados com a literatura disponível (FARIAS, 1991).

### **3.2.2.3. Determinação do grau de pureza dos padrões**

Para determinação do grau de pureza da DHCB, empregou-se solução a 940 µg/mL em análise por CLAE (eluente CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 40:60; fluxo de 1,2 mL/min e detecção em 200 nm). Semelhante análise foi realizada com solução de CB a 37,8 µg/mL. A determinação da porcentagem de pureza foi realizada pelo programa

Class-VP, considerando a área sobre a curva (ASC) do pico correspondente à substância isolada em relação à ASC total dos picos detectados, sendo o resultado expresso em porcentagem. A concentração final das soluções preparadas a partir destas substâncias foi corrigida com base no grau de pureza obtido.

#### 3.2.2.4. Estabilidade dos padrões

DHCB e CB foram analisadas em relação a sua estabilidade em meio ácido e básico. Ambas foram deixadas em solução de HCl (pH = 1,0) e  $\text{NH}_4\text{OH}$  (pH = 12,5) durante um dia. Foi realizada CCD comparando-se a composição com e sem adição do ácido ou da base.

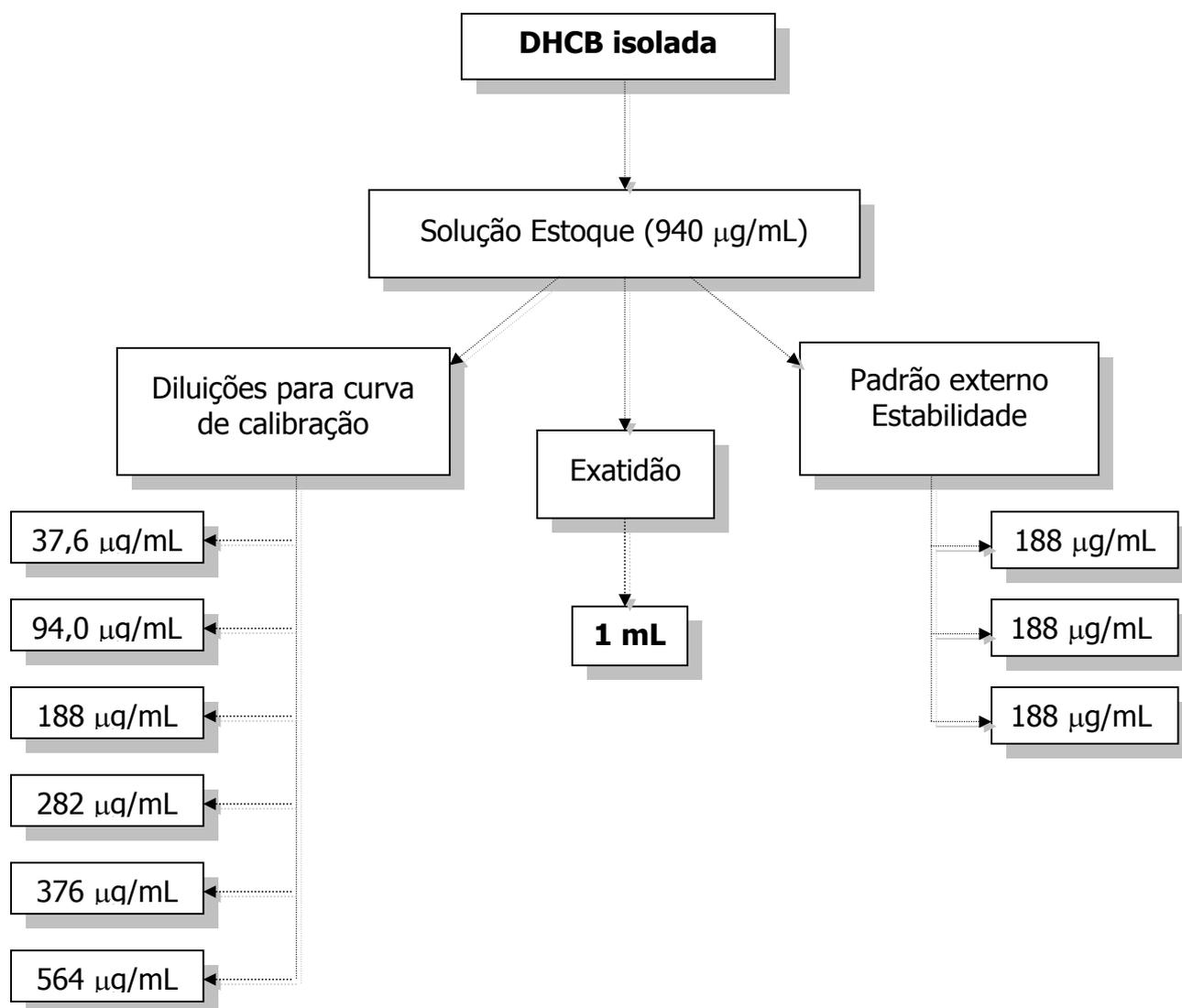


Figura 5: Soluções preparadas a partir da DHCB isolada ( $\mu\text{g/mL}$ ).

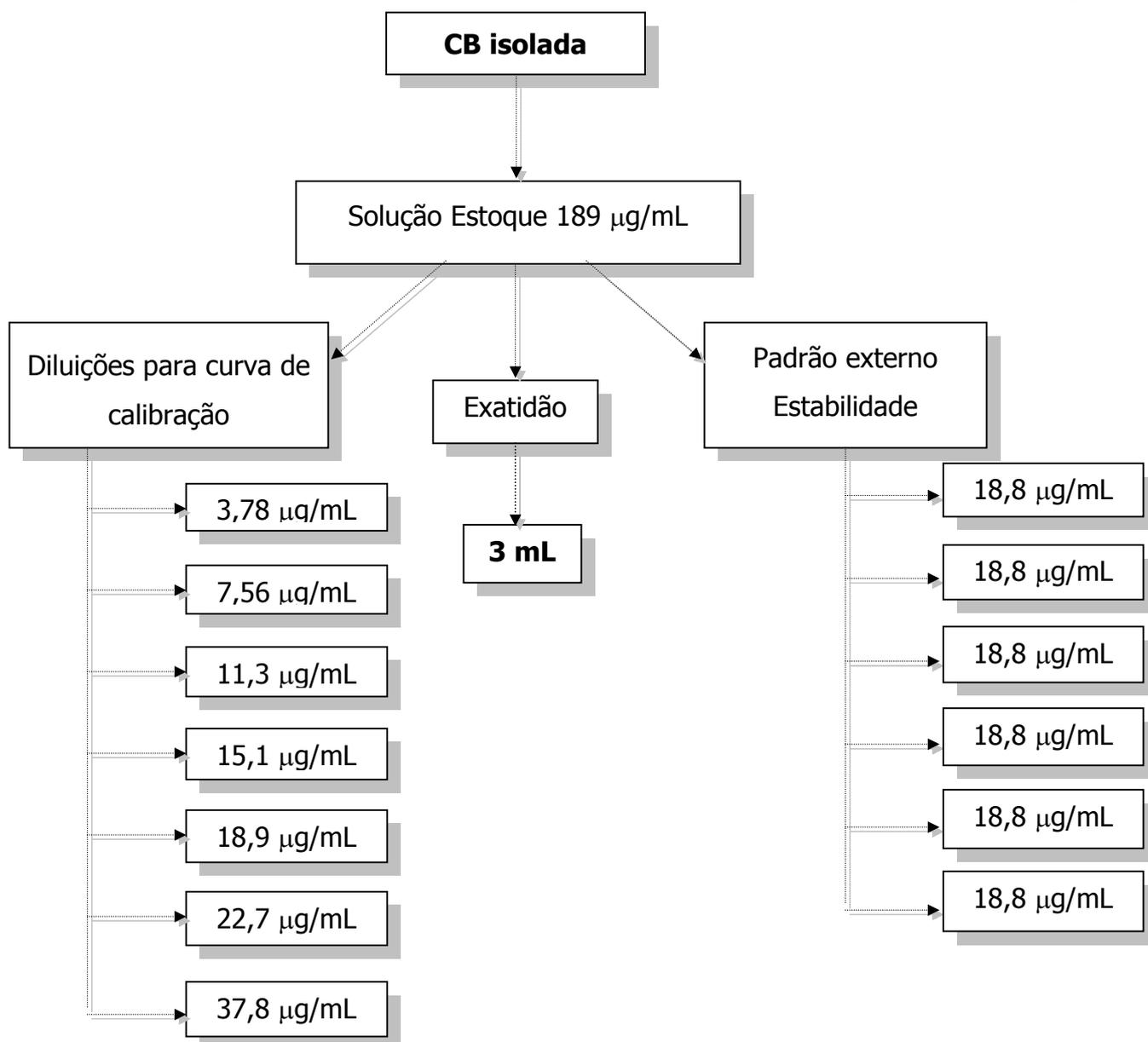


Figura 6: Soluções preparadas a partir da CB isolada ( $\mu\text{g/mL}$ ).

### 3.2.3. DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS DE DOSEAMENTO

#### 3.2.3.1. Determinação dos parâmetros de análise

Foram testadas as variáveis: composição do eluente, fluxo de eluição e comprimento de onda de detecção. Em todas as análises utilizou-se a mesma coluna cromatográfica e o mesmo equipamento. A temperatura da sala onde as análises foram realizadas foi mantida constante, entre 18 e 20°C.

### 3.2.3.1.1. Eluente e fluxo

Inicialmente foram utilizados os solventes puros, ou seja, em uma bomba havia apenas água purificada e na outra acetonitrila. Esta prática não foi possível pela formação de bolhas de ar durante a mistura dos solventes pelo equipamento.

Foram utilizadas, então, duas soluções: uma de CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O na proporção de 30:70 e outra, 70:30 e, conseqüentemente, as duas bombas do equipamento, o que facilitou a alteração do eluente entre as análises, sem a formação de bolhas. Como a proporção final entre os solventes - acetonitrila e água - é estabelecida através da determinação da porcentagem daquele que será retirado com a bomba B, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% B = [(\%CH_3CN - 30) / 40] \times 100$$

Onde: % B = porcentagem do eluente B a ser utilizada

% CH<sub>3</sub>CN = porcentagem de acetonitrila desejada no eluente final

Como teste preliminar, foi calculada a resolução obtida com diferentes eluentes e fluxos. O eluente testado foi CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O nas proporções de 40:60, 44:56 e 48:52 modo isocrático. Para cada eluente foram testados os fluxos de 1,0; 1,2 e 1,4 mL/min.

Na determinação da resolução (Rs) dos picos foram considerados os parâmetros: distância entre os picos (diferença entre os tempos de retenção) e a largura da base dos mesmos (que é determinada traçando uma tangente ao longo da inclinação dos picos). Relacionando estes parâmetros obtém-se a resolução. O número de pratos teóricos não foi considerado, pois, este fator somente é alterado com a mudança da coluna, o que aumentaria o tempo de análise, apesar de exercer grande influência sobre a resolução. A resolução é expressa na mesma unidade do tempo de retenção e da largura da base (SCHOENMAKERS, 1986; UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION, 2000).

$$R_s = 2 \cdot \Delta t_r / (w_1 + w_2)$$

Onde:  $\Delta t_r$  = diferença de tempo de retenção entre um pico e o pico anterior

$w_1$  = largura da base do primeiro pico

$w_2$  = largura da base do segundo pico

A resolução foi calculada através do programa Class-VP, sendo utilizado o modo de cálculo da USP (UNITED STATES PHARMACOPEIA).

Visando melhorar a resolução obtida no teste preliminar, foram realizadas outras alterações nos parâmetros de análise. Foi testada a eluição tipo gradiente, durante a análise a proporção de CH<sub>3</sub>CN do eluente foi gradativamente aumentada, visando uma

melhor resolução dos picos. Além disso, se verificou a influência da adição de ácido acético a 0,01 e 0,2% no eluente.

#### 3.2.3.1.2. Comprimentos de onda

Solução de WE01DC 1,0 mg/mL em acetonitrila foi utilizada para análise em triplicata nos comprimentos de onda de 200, 210 e 230 nm. As análises foram realizadas com eluente CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 40:60 e fluxo de 1,2 mL/min. Foi determinada a área sobre a curva (ASC) e calculado o coeficiente de variação de cada triplicata.

#### 3.2.3.1.3. Solvente para a diluição das amostras

A fim de se verificar a possibilidade de utilizar metanol ao invés de acetonitrila como solvente dos extratos e padrões, realizaram-se análises por CLAE com WE01DC dissolvida em acetonitrila e metanol. Prepararam-se 10 mL de solução de WE01DC 1,0 mg/mL em metanol com 2% de n-hexano. Semelhante procedimento foi utilizado no preparo da solução diluída com acetonitrila. Ambas foram analisadas por CLAE (CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 40:60; 1,2 mL/min; detecção em 210 e 230 nm).

#### 3.2.3.1.4. Pureza dos picos

Durante a análise por CLAE foram realizados espectros de absorção no UV dos picos relativos à DHCB e CB. Nesta técnica as bombas do CLAE são desligadas durante a detecção do pico cuja pureza se deseja determinar por UV. É realizado espectro de absorção no UV.

### 3.2.3.2. **Determinação do modo de preparo da amostra**

O modo de preparo da amostra (raízes de *W. ebracteata*) foi testado, variando-se a técnica de extração: maceração com ou sem aquecimento, seguida de partição e extração direta por maceração ou refluxo, conforme descrito a seguir.

**Modo 1:** 2g de raiz moída e tamisada (tamis com malha 1mm) foi mantida em agitação com etanol comercial (96°GL) por 5 min a 50-55°C (3 vezes 40 mL). O extrato bruto obtido foi evaporado até a ausência de odor de etanol, em evaporador rotatório. O extrato foi ressuspenso em 2 vezes 10 mL de água destilada em ultra-som e transferido

para funil de separação. Onde foi extraído com 3 vezes 10 mL de EP, seguido de 3 vezes 10 mL de DC.

**Modo 2:** Foi realizado exatamente o mesmo procedimento, no entanto, na maceração inicial com etanol foi mantida temperatura de 30-35°C.

**Modo 3:** 2g de raiz moída e tamisada (tamis com malha 1 mm) foi mantida em agitação, sem aquecimento, com 2 vezes 40 mL de EP, por 10 min. cada. O extrato foi filtrado e a fração EP desprezada. O restante da planta foi extraído, sob agitação, duas vezes com 40 mL de DC, por 5 min cada, a temperatura de 30°C.

**Modo 4:** 2g da raiz moída e tamisada (tamis com malha 1 mm) foram pesados em béquer de 100 mL. Adicionaram-se 40 mL de EP à raiz. A extração aconteceu sem aquecimento e com agitação por 5 min. A filtração foi por algodão. O restante da planta foi colocado em balão de fundo redondo de 100 mL, ao qual foram acrescentados 40 mL de DC. A extração se deu a temperatura de 40°C em refluxo por 10 min. O extrato foi filtrado por algodão para béquer de 100 mL. O restante da planta mais o algodão foram novamente deixados em refluxo a 40°C por 10 min. O extrato diclorometânico obtido na primeira extração foi filtrado por papel de filtro para balão de fundo cônico. O béquer que continha o extrato foi lavado com 10 mL de DC e este também filtrado pelo mesmo papel de filtro para o balão de fundo cônico. O extrato obtido com a segunda extração foi filtrado diretamente pelo papel de filtro. O balão de fundo redondo onde aconteceu a extração e os algodões foram lavados com 10 mL de DC (Figura 16).

A comparação entre a ASC obtida com os diferentes modos de preparo da amostra foi realizada através de análise de variância ( $\alpha = 0,01$ ).

No preparo das amostras comerciais de buchinha, partiu-se de 0,2 g de frutos secos sem sementes. Outra alteração em relação à técnica utilizada com as raízes de *W. ebracteata* foi a transferência dos extratos diclorometânicos para balão volumétrico de 100 mL e tomada de apenas 10 mL para realização das análises e, quando necessário, realização de diluição 1:10 do extrato final dissolvido em acetonitrila.

### 3.2.3.3. Curva de calibração

Com o padrão de DHCB foi preparada a solução estoque a 1,04 mg/mL, cuja concentração foi posteriormente corrigida para 0,94 mg/mL; e com o padrão de CB uma

solução a 0,204 mg/mL, corrigida conforme grau de pureza para 0,189 mg/mL (Tabela 13).

#### 3.2.3.3.1. Preparo da solução estoque

Foram pesados 26,0 mg de DHCB dissolvidos em 1 mL de n-hexano e acetonitrila suficiente para completar o volume de 25,0 mL, resultando em solução estoque a 1,04 mg/mL (não corrigida). O volume da solução foi completado a temperatura de 20°C. Logo em seguida foram preparadas as soluções utilizadas na determinação da curva de calibração, sendo a solução restante armazenada em balões volumétricos, cujo volume não foi completado, em geladeira. Estes, após período de aclimatação tiveram seu conteúdo completado com acetonitrila e foram utilizados como padrão externo.

Foram pesados 10,2 mg de CB que depois de dissolvidos em 1 mL de n-hexano e acetonitrila suficiente para completar o volume de 50,0 mL, resultaram em solução estoque a 0,204 mg/mL (não corrigida). O volume da solução foi completado a temperatura de 20°C. Logo em seguida foram preparadas as soluções utilizadas na determinação da curva de calibração. A solução restante foi armazenada em balões volumétricos de 10,0 mL em geladeira para posterior utilização como padrão externo.

#### 3.2.3.3.2. Preparo das diluições

A partir das soluções estoque foram realizadas diluições para obtenção das curvas de calibração e para utilização como padrão externo.

A solução estoque de DHCB foi diluída em acetonitrila. Considerando a concentração desta solução (1,04 mg/mL), foram obtidas as concentrações em mg/mL apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9: Cálculo da concentração de DHCB nas diluições para a determinação da curva de calibração.

<b>Solução estoque (mL)</b>	<b>Volume final (mL)</b>	<b>Conc. final (mg/mL)</b>	<b>Conc. final corrigida (mg/mL)</b>
2,00	50,00	0,0416	0,0376
1,00	10,00	0,104	0,0940
1,00	5,00	0,208	0,188
3,00	10,00	0,312	0,282
2,00	5,00	0,416	0,376
3,00	5,00	0,624	0,564
-	-	1,04	0,940

A solução estoque de CB foi diluída em acetonitrila. Considerando a concentração desta solução (0,204 mg/mL), foram obtidas concentrações em mg/mL apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10: Cálculo da concentração de CB nas diluições para a determinação da curva de calibração.

<b>Solução estoque (mL)</b>	<b>Volume final (mL)</b>	<b>Conc. final (mg/mL)</b>	<b>Conc. final corrigida (mg/mL)</b>
1,00	50,0	0,00408	0,00378
1,00	25,0	0,00816	0,00756
3,00	50,0	0,0122	0,0113
2,00	25,0	0,0163	0,0151
1,00	10,0	0,0204	0,0189
3,00	25,0	0,0245	0,0227
1,00	5,0	0,0408	0,0378

A DHCB foi utilizada como padrão na concentração de 0,188 mg/mL e a CB, 0,0189 mg/mL. A quantidade exata de cada solução estoque, para preparo destas diluições, foi adicionada em balões volumétricos e armazenados em geladeira até o momento do uso. No caso da CB, cada dia um dos balões teve seu volume completado com acetonitrila. A mesma solução de DHCB foi utilizada em dois dias seguidos, ou seja, uma diluição nova era preparada a cada dois dias.

Os gráficos representativos das curvas de calibração foram construídos tendo como abscissa a concentração da cucurbitacina em questão – CB ou DHCB – e como ordenada a área sobre a curva (ASC) no caso do método por CLAE e a absorbância obtida com o espectrofotômetro de absorção no UV. A ASC é calculada por integral, automaticamente pelo equipamento.

A partir dos gráficos obtidos foi calculada a melhor reta por regressão linear, sendo obtido o coeficiente de correlação e, conseqüentemente, a equação da reta. O programa Origin 5.0 foi utilizado na plotagem dos gráficos, escolha da melhor reta (linearização), cálculo do coeficiente de correlação e determinação da equação da reta. A partir da equação – substituindo x por concentração de substância e y por ASC – foram obtidas as fórmulas para cálculo da concentração de DHCB ou CB, a partir da ASC (CLAE) ou absorvância (espectrofotometria de absorção no UV).

Quando se prepara uma curva de calibração é recomendada análise em triplicata, ou seja, devem ser analisadas três soluções preparadas de forma independente, sendo que cada ponto da curva corresponda à média destas três soluções. Neste trabalho dois fatos impediram que a análise fosse realizada desta forma. Primeiro, havia quantidade suficiente de substância isolada apenas para o preparo de uma solução estoque. Segundo, como a análise foi realizada em dois comprimentos de onda seria necessário realizar 42 aplicações, o que tornaria inviável a realização da análise em apenas uma dia. Sendo assim, optou-se pela determinação única para cada ponto, mantendo-se as mesmas condições do dia.

### 3.2.3.3.3. Cálculo da porcentagem de cucurbitacinas

O resultado do doseamento por CLAE foi expresso em mg da substância por 100 g de raiz de *W. ebracteata*. O resultado do doseamento por espectrofotometria de absorção no UV foi dado em mg de cucurbitacinas totais expressas em DHCB ou CB, em 100 g de raiz seca. As fórmulas empregadas nos cálculos são apresentadas nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11: Fórmulas para cálculo da concentração de DHCB e CB, por CLAE e de cucurbitacinas totais por espectrofotometria no UV, em mg de substância por 100 g de droga vegetal, através de padrão externo.

<b>Método</b>	<b>Fórmulas</b>
CLAE	Conc. DHCB = $ASC_a \cdot Cp \cdot 500 / ASC_p \cdot m$
UV	Conc. DHCB = $Ab_a \cdot Cp \cdot 5000 / ASC_p \cdot m$

Tabela 12: Fórmulas para cálculo da concentração de DHCB e CB, por CLAE e de cucurbitacinas totais por espectrofotometria no UV, em mg de substância por 100 g de droga vegetal, através da equação obtida pela curva de calibração.

<b>Método</b>	<b>DHCB</b>	<b>CB</b>
CLAE 230	Conc. = $(ASC_a - 2531) \cdot 500 / 1765980 \cdot m$	Conc. = $(ASC_a + 2426) \cdot 500 / 19194300 \cdot m$
CLAE 210	Conc. = $(ASC_a - 7237) \cdot 500 / 6259580 \cdot m$	Conc. = $(ASC_a - 1511) \cdot 500 / 11928900 \cdot m$
UV 230	Conc. = $(Ab_a - 0,0239) \cdot 5000 / 1,85 \cdot m$	Conc. = $(Ab_a + 0,0171) \cdot 5000 / 19,7 \cdot m$
UV 210	Conc. = $(Ab_a - 0,186) \cdot 5000 / 7,03 \cdot m$	Conc. = $(Ab_a - 0,0288) \cdot 5000 / 13,4 \cdot m$

#### 3.2.3.3.4. Estabilidade das soluções padrão

As soluções estoque (DHCB a 0,940 mg/mL e CB a 0,189 mg/mL em acetonitrila com 2% de n-hexano) foram mantidas em geladeira (temperatura de cerca de 7°C) e diluídas meia hora após a retirada da geladeira, tempo necessário para aclimação à temperatura em que as análises por CLAE foram realizadas. Cada solução foi aplicada três vezes por dia em cada comprimento de onda (210 e 230 nm) durante seis dias consecutivos, sendo calculado o coeficiente de variação para cada substância e comprimento de onda. Para cada comprimento de onda, os resultados obtidos nos seis dias foram comparados por análise de variância ( $\alpha = 0,01$ ).

### 3.2.4. VALIDAÇÃO

A validação foi realizada utilizando-se raízes de *W. ebracteata* (WE02) moídas em moedor de café e tamisadas (tamis 1 mm). Os ensaios foram realizados conforme "United States Pharmacopeia (USP)" e "International Conference on Harmonisation (ICH)."

#### 3.2.4.1. Linearidade

Determinada a partir das sete concentrações diferentes de cada padrão empregadas na obtenção da curva de calibração.

#### 3.2.4.2. Exatidão

A exatidão foi avaliada através da porcentagem de recuperação. O ensaio foi realizado adicionando-se à droga vegetal moída, quantidade conhecida dos padrões de CB e DHCB separadamente. Esta quantidade dos padrões foi obtida a partir das

soluções preparadas para determinação da curva de calibração. Foi tomada quantidade conhecida (Figuras 5 e 6). O ensaio foi realizado em triplicata.

Foram analisadas três amostras preparadas conforme método selecionado, que serviram de branco. Em três outras amostras foram adicionados 941  $\mu\text{g}$  de DHCB (1 mL de solução a 940  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), e num terceiro grupo de três amostras foram adicionados 56,7  $\mu\text{g}$  de CB (3 mL de solução a 18,9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) à raiz tamisada já pesada. A seguir todas as amostras também foram preparadas conforme método selecionado. Foram determinadas as concentrações de DHCB e CB por CLAE (230 e 210 nm) e UV (230 e 210 nm) pela curva de calibração.

O resultado foi expresso em porcentagem de cucurbitacinas recuperadas. As amostras preparadas foram analisadas em dois comprimentos de onda: 230 e 210 nm. Os cálculos foram realizados através da fórmula obtida com a curva de calibração.

### 3.2.4.3. Precisão

Foi testada a precisão intermediária e a precisão intraensaio.

Avaliou-se a diferença entre as concentrações de CB e DHCB obtidas em diferentes dias. Ou seja, nesta parte da validação analisou-se uma mesma amostra de raízes moídas de *W. ebracteata* em seis dias consecutivos, em triplicata. Sendo que, em cada dia a amostra foi homogeneizada, preparada e analisada de acordo com o método desenvolvido. As condições experimentais – temperatura ambiente, analista, equipamentos, reagentes e parâmetros de análise – foram mantidas constantes. Todas as análises por CLAE foram realizadas utilizando-se os seguintes parâmetros: eluente  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  40:60; fluxo 1,2 mL/min; comprimento de onda de detecção 230 e 210 nm.

As análises em espectrofotômetro de absorção no UV também foram realizadas nos comprimentos de onda de 230 e 210 nm. Foram analisadas as mesmas amostras utilizadas na análise por CLAE, mas foi realizada uma diluição 1:10.

Foi utilizada padronização externa, injetando-se todos os dias soluções dos padrões de CB e DHCB. O cálculo foi realizado também através da curva de calibração, comparando-se os resultados por análise de variância ( $\alpha = 0,01$ ).

A precisão intraensaio foi obtida através da amplitude do valor dos coeficientes de variação das análises em triplicata para determinação da precisão intermediária.

### **3.2.5. APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS**

#### **3.2.5.1. Análise de amostras comerciais**

Sete amostras comerciais foram analisadas quali e quantitativamente, utilizando-se o método desenvolvido. Adquiriram-se frutos de buchinha, e raízes de taiuiá e cabeça-de-negro. Inicialmente fez-se uma análise do perfil cromatográfico e a seguir foi realizada análise por CLAE e calculada a concentração de DHCB e CB.

Duas amostras comerciais de frutos de *L. operculata* foram analisadas empregando-se os parâmetros dos métodos desenvolvidos com detecção em 230 nm.

As amostras comerciais de taiuiá e cabeça-de-negro foram denominadas A1 a A5.

A1: Adquirida no mercado municipal de Curitiba; raízes moídas de forma grosseira, indicada principalmente como "depurativo do sangue".

A2: Adquirida no mesmo local da amostra A1, mas seis meses depois; raízes cortadas em fatias com largura média de 5 cm.

A3: Adquirida em Florianópolis como taiuiá para diabetes; raízes cortadas em fatias com largura média de 8 cm.

A4: Adquirida em Manaus como cabeça-de-negro; raízes cortadas em fatias com largura média de 5 cm.

A5: Doadada por indústria como *C. tayuya*; raízes cortadas em fatias com largura média de 5 cm. Em folheto informativo é indicada como diurética, "depurativa" e para tratamento de reumatismos, artrite e úlcera.

#### **3.2.5.2. Caracterização e doseamento de frações diclorometânicas**

Os métodos desenvolvidos no presente trabalho foram utilizados na caracterização de fração (WE00DC) utilizada nos ensaios farmacológicos desenvolvidos junto ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC, como tese de doutorado de Rodrigo Rebelo Peters, orientado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa Maria Ribeiro-do-Valle Nicolau. O método por CLAE foi utilizado tanto para análise quantitativa quanto para análise qualitativa de extratos de *W. ebracteata* e *L. operculata*.

As frações WE01DC e WE02MR, empregadas no desenvolvimento do método, e a fração LO01DC, também foram caracterizadas e quantificadas em relação ao conteúdo de DHCB e/ou CB (eluente CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 40:60; fluxo 1,2 mL/min).

A caracterização foi realizada inicialmente por CLAE, através de comparação com padrões de cucurbitacinas isoladas de *W. ebracteata* pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maren Rocha

Farias (FARIAS, 1991). Outra etapa da caracterização envolveu a comparação entre a porcentagem relativa (ASC de cada pico em relação ao total de picos detectados em porcentagem) dos principais picos. A detecção aconteceu em 230 e 200 nm.

As soluções de WE00DC, WE01DC e WE02MR foram preparadas de forma quantitativa, na concentração de 0,05 mg/mL em acetonitrila com 2% de n-hexano.

Foi realizada quantificação de DHCB e CB por CLAE em 230 nm, a partir da fórmula obtida com a curva de calibração.

Foram preparadas três soluções da fração LO01DC de *L. operculata* a 50 µg/mL. A fração foi analisada por CLAE e espectrofotômetro de absorção no UV, ambos com a utilização do comprimento de onda de 230 nm.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. OBTENÇÃO E ESTABILIDADE DOS PADRÕES

Os padrões de DHCB e CB isolados de *W. ebracteata* e *L. operculata*, respectivamente, foram analisados por espectrofotometria de absorção no UV e CCD comparativamente com substâncias de referência (Figuras 7, 8 e 9), confirmando-se a identidade das mesmas.

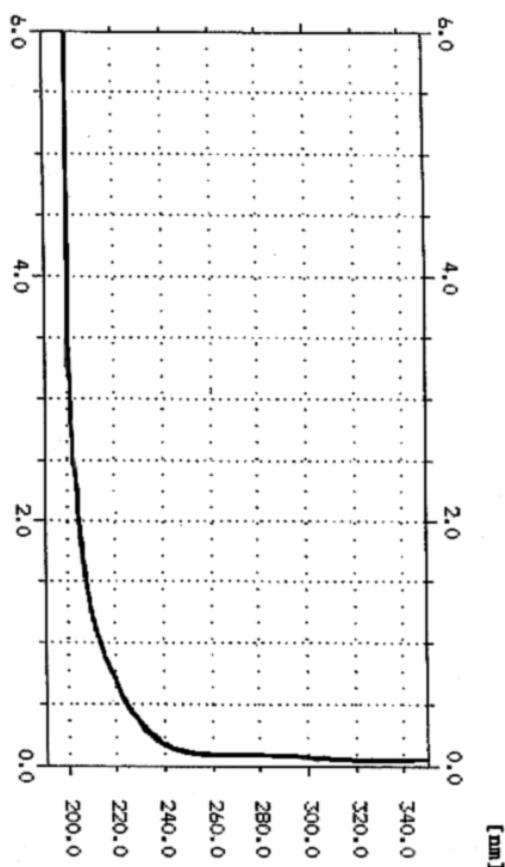


Figura 7: Espectro de absorção no UV da DHCB (0,1 mg/mL).

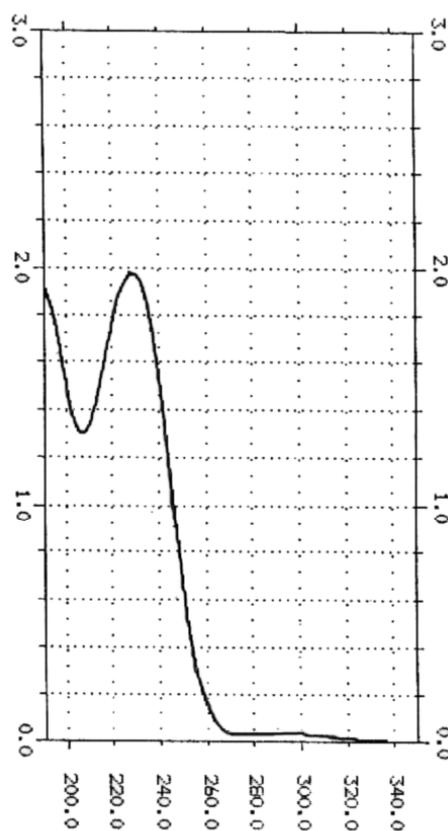


Figura 8: Espectro de absorção no UV da CB (0,1 mg/mL).

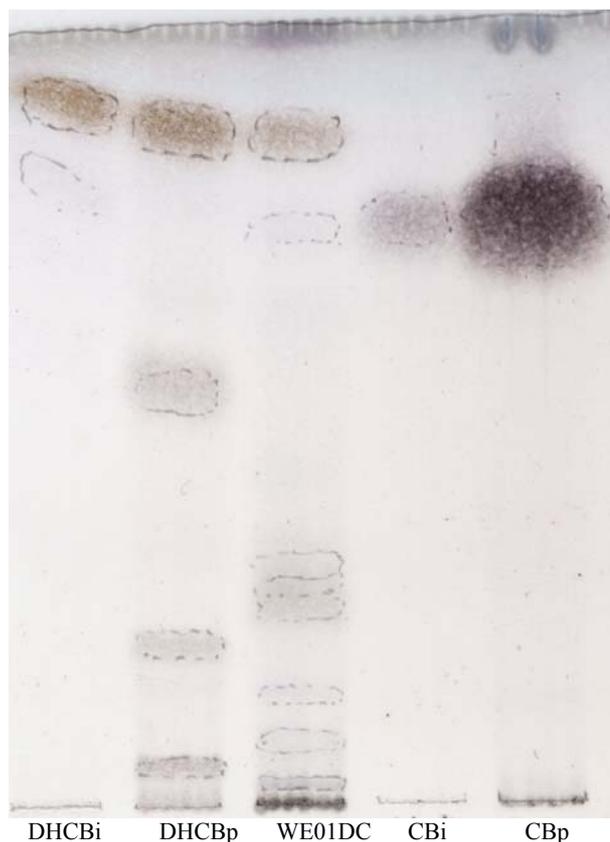


Figura 9: Análise das substâncias isoladas e fração WE01DC por CCD (eluente EP:AcOEt:Isopropanol 20:10:0,8; fase estacionária: gel de sílica G F<sub>254</sub> e revelador: vanilina fosfórica). Da esquerda para a direita: DHCB isolada, DHCB padrão, WE01DC, CB isolada, CB padrão.

A DHCB isolada apresentou apenas absorção terminal ao UV (Figura 7), coloração amarelada após revelação com vanilina fosfórica e Rf equivalente àquele obtido com o padrão (Figura 9). A CB isolada teve sua absorção máxima em 230 nm (Figura 8) e corou-se de violeta após revelação com vanilina fosfórica confirmando a presença de carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada na cadeia lateral (Figura 9).

A pureza foi verificada através de análise por CLAE da solução a 0,94 mg/mL para DHCB e a 0,040 mg/mL para CB, obtendo-se 90,4% e 92,6% respectivamente (Figura 10 e Tabela 13). Os parâmetros utilizados foram: modo isocrático; CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 40:60; 1,2 mL/min; detecção em UV a 200 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 13: Pureza dos padrões isolados, determinada por CLAE.

<b>Padrão</b>	<b>Análise 1</b>	<b>Análise 2</b>	<b>Análise 3</b>	<b>Média (n = 3)</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)</b>
<b>DHCB (%)</b>	89,91	90,76	90,42	90,36	± 0,43	0,47
<b>CB (%)</b>	92,47	92,63	92,65	92,58	± 0,10	0,11

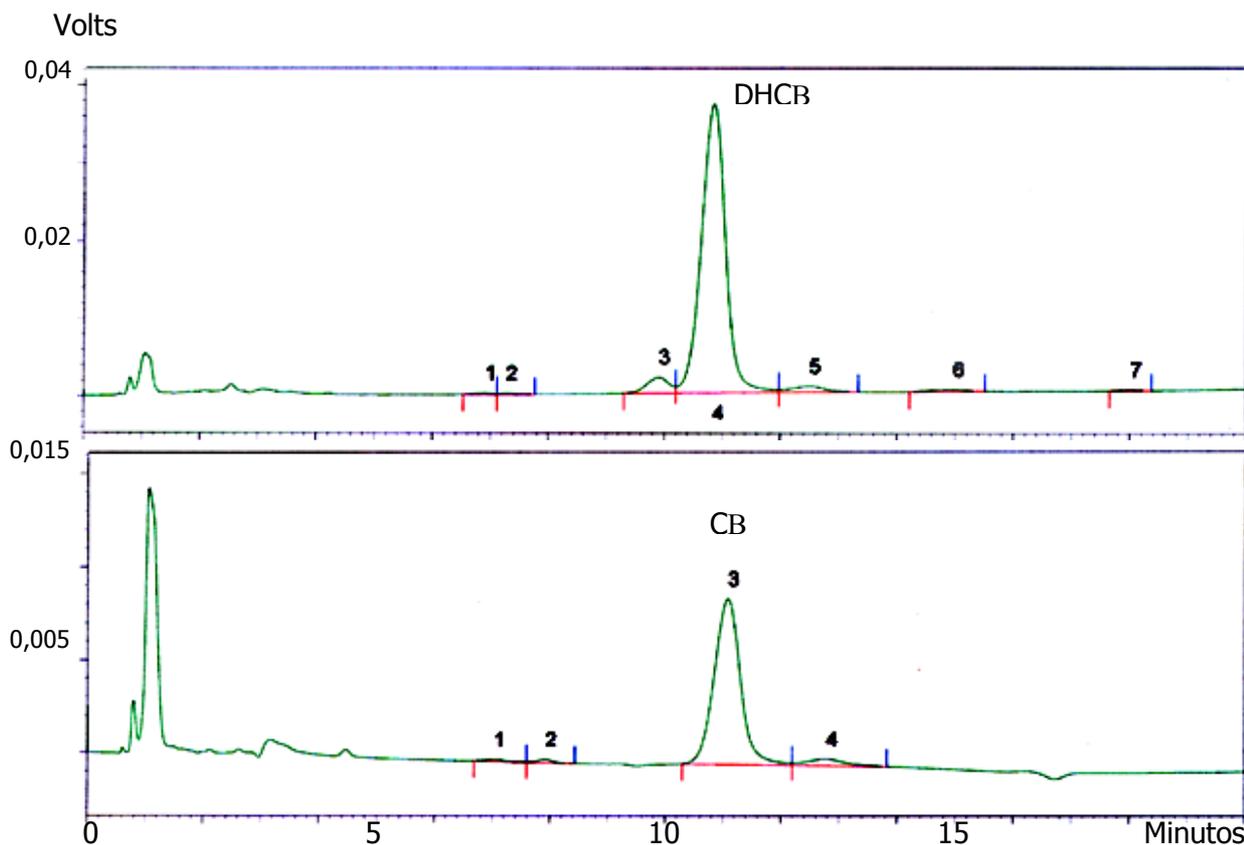


Figura 10: Cromatogramas, obtidos por CLAE, de DHCB (1 mg/mL) e CB (40 µg/mL) em 200 nm.

As porcentagens expressas na Tabela 13, correspondem à ASC dos picos correspondentes aos padrões em relação ao total de substâncias detectadas. Esta determinação quantitativa da pureza dos padrões, não apenas qualitativa como é o caso da análise por CCD, é essencial para a sua utilização como padrão no doseamento. Através dos cromatogramas dos padrões (Figura 10), pode-se constatar um grau de pureza aceitável.

Com frações impuras obtidas durante o isolamento da DHCB e CB foram realizados testes preliminares quanto à estabilidade dos padrões em meio ácido e básico (Figura 11).

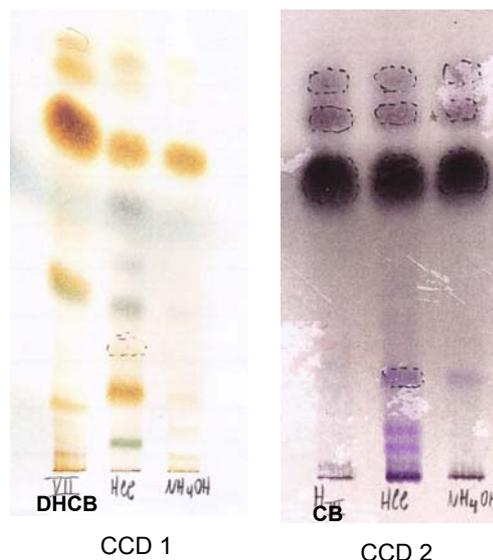


Figura 11: Análise preliminar da estabilidade de cucurbitacinas em meio ácido e básico por CCD (eluente EP:AcOEt:Isopropanol 20:10:0,5; fase estacionária: gel de sílica G F<sub>254</sub> e revelador: vanilina fosfórica).

Como pode ser observado na Figura 11, as cucurbitacinas sofreram alteração após a permanência em ácido clorídrico. A CCD 1 se refere à análise de DHCB e a CCD 2, de CB. Aparentemente as alterações ocorridas em pH básico são muito mais discretas. Seria interessante realizar este tipo de análise com cucurbitacinas puras a fim de se definir a estabilidade de cada uma delas, assim como identificar as substâncias formadas. A degradação em pH ácido é especialmente importante, pois se houver degradação no suco gástrico devem ser estudados os efeitos do produto formado. Por limitações de tempo, esta análise não foi realizada, ficando como uma proposição de continuidade do estudo.

## 4.2. DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS DE DOSEAMENTO

### 4.2.1. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ANÁLISE

A escolha dos primeiros parâmetros e condições a serem utilizados na análise por CLAE foi baseada nos artigos descritos na revisão bibliográfica (BAUER, 1984; HUTT e HERRINGTON, 1985; GORSKI et al., 1986; STUPPNER e WAGNER, 1992; HALAWEISH e TALLAMY, 1993; MATSUO et al., 1999; STURM e STUPPNER, 2000) e livros sobre desenvolvimento de métodos de análise quantitativa (SCHOENMAKERS, 1986; SNYDER, 1988).

#### 4.2.1.1. Eluente e fluxo

Nos ensaios para a definição do sistema cromatográfico para a análise por CLAE foram testadas diferentes proporções de acetonitrila e água, nos modos isocrático e gradiente, bem como diferentes valores de fluxo de eluição. As análises foram realizadas empregando-se os comprimentos de onda 190 nm e 230 nm na detecção. Nestas análises, foram comparados os valores da pressão, tempo de retenção e a resolução dos picos referentes à DHCB. Os dados das análises são apresentados nas Tabelas 14, 15 e 16.

A amostra utilizada nas análises foi WE01DC 2,0 mg/mL, dissolvida em acetonitrila com 2% de n-hexano. Como o volume injetado foi 20  $\mu$ L, a quantidade de extrato seco injetado foi 40  $\mu$ g.

O primeiro cromatograma foi realizado em condições constantes e a partir deste cromatograma foram realizadas alterações controladas a fim de otimizar a separação entre os picos, conforme preconizado por Schoenmakers (1986).

Snyder (1988) sugere como eluente inicial a mistura acetonitrila:água. Muitos pesquisadores são resistentes quanto ao uso de acetonitrila pela toxicidade e custo. No entanto, este solvente resulta em menor pressão no sistema, tem maior polaridade e pode ser aplicado em análises com baixo comprimento de onda de detecção (SNYDER, 1988). Bauer (1984), Halaweish e Tallamy (1993), Stuppner e Wagner (1992) utilizaram eluentes a base de acetonitrila em análise de cucurbitacinas por CLAE. Como um dos objetivos do presente trabalho é a comparação entre a detecção em 230 nm e um comprimento de onda mais baixo, o eluente que apresenta menor interferência é a acetonitrila por sua transparência em regiões de comprimento de onda mais baixos.

Nas Tabelas 14 e 15 são apresentados os dados de resolução do pico correspondente à DHCB, calculado segundo a Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION, 2000), o tempo de retenção ( $T_r$ ) e os valores de pressão no sistema, para os diferentes eluentes e fluxos de eluição testados.

Tabela 14: Resolução (Rs) e tempo de retenção (Tr) da DHCB, e pressão do sistema, obtidos com diferentes proporções de CH<sub>3</sub>CN em água como eluente, em diferentes fluxos, detecção em 190 nm.

<i>Fluxo</i>	<i>Rs</i>			<i>Tr (min)</i>			<i>Pressão (kgf)</i>		
	<i>1,0</i>	<i>1,2</i>	<i>1,4</i>	<i>1,0</i>	<i>1,2</i>	<i>1,4</i>	<i>1,0</i>	<i>1,2</i>	<i>1,4</i>
<b>CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 40:60</b>	0,77	<b>0,77</b>	0,77	13,83	<b>11,59</b>	10,05	85	<b>103</b>	123
<b>CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 44:56</b>	0,71	0,71	0,72	9,18	7,72	6,68	84	102	117
<b>CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 48:52</b>	-	-	-	6,62	5,58	4,46	82	98	114

Através destes dados observa-se que a melhor resolução foi obtida com o eluente CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 40:60, como era esperado já que quanto maior a proporção de água mais polar é o eluente e maior o tempo de retenção das substâncias. No entanto, se esta proporção for ainda maior o tempo de análise torna-se muito longo, além disso, a medida que o tempo de retenção aumenta, a base dos picos torna-se mais larga. A resolução do eluente CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 48:52 não foi calculada, pois a separação entre os picos de interesse foi insuficiente.

Através da análise em diferentes fluxos podemos observar que o aumento do fluxo é uma forma de se diminuir o tempo de eluição sem alterar significativa da resolução. No entanto, ao se aumentar o fluxo aumenta-se a pressão no sistema o que pode danificar a coluna. A fim de se preservar a coluna optou-se pelo fluxo de 1,2 mL/min.

Tabela 15: Resolução (Rs) e tempo de retenção (Tr) da DHCB, e pressão do sistema, obtidos com diferentes proporções de CH<sub>3</sub>CN em água como eluente, em diferentes fluxos, detecção em 230 nm.

<i>Fluxo</i>	<i>Rs</i>			<i>Tr (min)</i>			<i>Pressão (kgf)</i>		
	<i>1,0</i>	<i>1,2</i>	<i>1,4</i>	<i>1,0</i>	<i>1,2</i>	<i>1,4</i>	<i>1,0</i>	<i>1,2</i>	<i>1,4</i>
<b>CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 40:60</b>	1,24	<b>1,18</b>	1,15	13,84	<b>11,61</b>	10,03	86	<b>102</b>	123
<b>CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 44:56</b>	1,03	0,98	0,96	9,23	7,79	6,7	85	102	117
<b>CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 48:52</b>	-	-	-	6,62	5,58	4,46	82	98	114

A análise quando realizada em 230 nm apresenta menor quantidade de picos interferentes (Figura 12). Portanto, foi possível uma melhor resolução. Como o tempo de retenção e a pressão não são afetados pelo comprimento de onda de detecção, seus valores permaneceram semelhantes.

Também foram testadas análises com gradiente de eluição e detecção em 190 nm, bem como a adição de ácido acético no eluente conforme descrito por Sturm e Stuppner (2000). Estes testes tiveram como objetivo diminuir o tempo de retenção de DHCB e CB (Tabela 16).

Tabela 16: Resolução ( $R_s$ ), tempo de retenção ( $T_r$ ) da DHCB, e pressão do sistema, obtidos em análises com modo de eluição por gradiente, detecção em 190 nm e fluxo de 1,2 mL/min.

<b>Eluente (<math>CH_3CN:H_2O</math>)</b>	<b><math>R_s</math></b>	<b><math>T_r</math> (min)</b>	<b><math>P</math> (kgf)</b>
20:80 → 50:50	0,91	29,32	161
35:65 → 45:55	0,82	14,17	114
0,02 % ácido acético	0,8	14,54	113
0,1 % ácido acético	0,86	20,41	126
37,5:62,5 → 47,5:52,5	0,8	11,42	112
0,02 % ácido acético	0,78	15,66	113
0,1 % ácido acético	0,77	12,05	124

Apesar de terem sido obtidas melhores resoluções com a análise por gradiente que de forma isocrática para o comprimento de onda de 190 nm, foi escolhida esta última pela maior facilidade e rapidez no preparo do eluente, menor tempo de retenção e menor tempo de estabilização entre as aplicações, ou seja, menor tempo necessário para lavar a coluna entre uma análise e outra (dado não mostrado).

Com base nestas primeiras análises foram selecionados os seguintes parâmetros, que forneceram tempo de análise de 20 min:

**Eluente  $CH_3CN:H_2O$  40:60**

**Fluxo 1,2 ML/MIN**

#### 4.2.1.2. Comprimento de onda

Uma das formas mais utilizadas de detecção é aquela que mede a absorbância do analito em determinado comprimento de onda no UV ou visível. Neste caso há necessidade de se determinar o melhor comprimento de onda, que será aquele em que as substâncias de interesse apresentem maior intensidade de absorção de radiação ultravioleta, sendo que a interferência do solvente e de outras substâncias deve ser

mínima. Os detectores fotométricos têm a vantagem de serem robustos (SNYDER, 1988).

Nos experimentos do item anterior foram utilizados os comprimentos de 190 e 230 nm que corresponderam aos máximos de absorção das DHCB e CB, respectivamente. No entanto, como 190 nm foi considerado muito baixo para análise quantitativa, foram testados 200 e 210 nm além da detecção em 230 nm.

Neste ensaio, empregou-se nas análises por CLAE o eluente  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  40:60 e o fluxo de 1,2 mL/min, realizando-se a detecção nos comprimentos de onda 200, 210 e 230 nm. Analisou-se a ASC, bem como o coeficiente de variação (Tabela 17 e Figura 12). O teste foi realizado com WE01DC 1,0 mg/mL dissolvido em acetonitrila com 2% de n-hexano, aplicado em triplicata.

Tabela 17: Análise de WE01DC por CLAE com detecção nos comprimentos de onda de 200, 210 e 230 nm.

$\lambda$ (nm)	ASC da DHCB			ASC da CB		
	200	210	230	200	210	230
<b>Média (n = 3)</b>	3.683.292	1.965.645	537.877	1950 5.565	199.960	284.890
<b>DP</b>	38259	25346	3448	1414	3322	1829
<b>CV (%)</b>	1,04	1,31	0,65	0,7	1,70	0,65

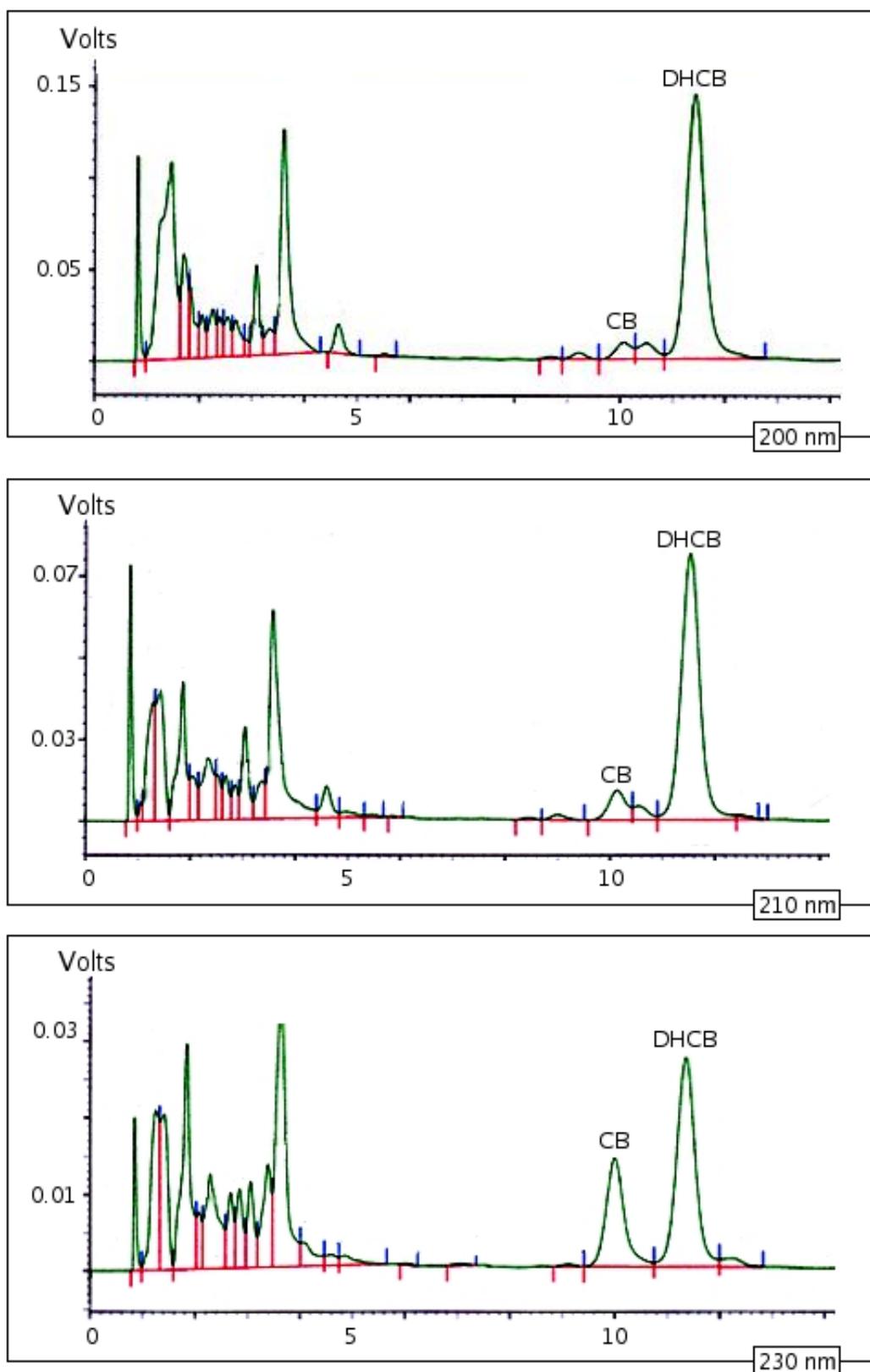


Figura 12: Cromatogramas de WE01DC 2,0 mg/mL, obtidos por CLAE, obtidos nos comprimentos de onda de 200, 210 e 230 nm.

Através da análise dos cromatogramas podemos comprovar também que o problema de se realizar a análise em comprimentos de onda mais baixos (200 ou

210 nm) é a presença de interferentes. Neste caso, podemos perceber a presença de um pico justamente entre a DHCB e a CB. Como a intensidade do sinal desta foi menor em relação a CB no comprimento de onda de 210 nm este foi selecionado. Todos os coeficientes de variação foram considerados satisfatórios.

A partir destas análises foram selecionados como parâmetros de detecção:

**230 e 210 nm**

Em relação à análise por espectrofotometria no UV, as Figuras 13 e 14 apresentam o perfil obtido de 200 a 350 nm dos extratos de *W. ebracteata* e *L. operculata*.

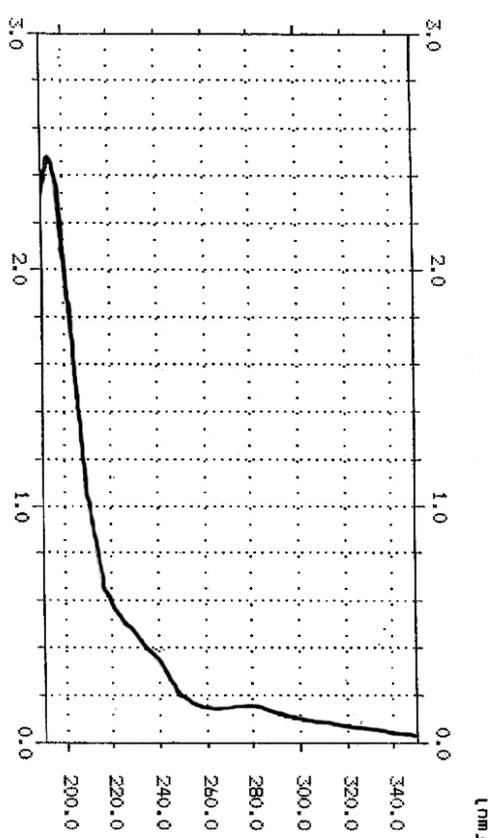


Figura 13: Espectros de absorção no UV de WE01DC (0,1 mg/mL).

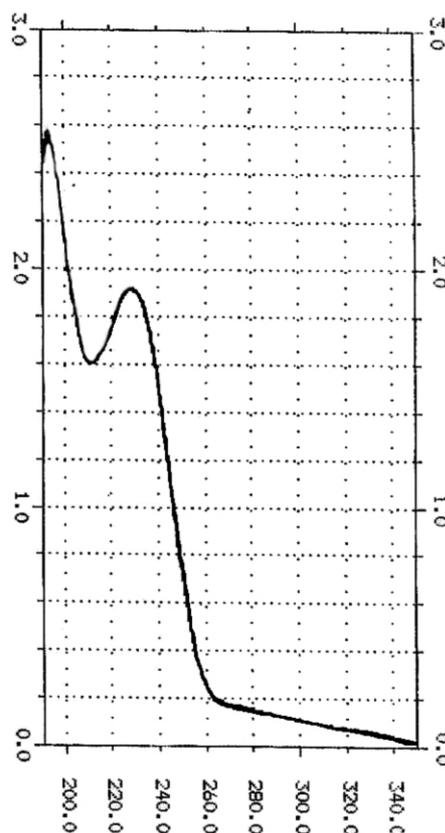


Figura 14: Espectros de absorção no UV de LO01DC (0,1 mg/mL).

A partir deste cromatograma e do fato da cucurbitacina B apresentar máxima absorção no UV em 230 nm, este foi um dos comprimentos de onda testados. Foi testada

também análise no comprimento de onda de 210 nm, como acontece por CLAE. Um problema observado é a presença de ombro, não aparecendo de forma clara o pico correspondente às cucurbitacinas de cadeia lateral insaturada, com máximo em 230 nm. Isto pode ser explicado pelo fato de que as cucurbitacinas de cadeia lateral saturada são majoritárias no extrato diclorometânico, interferindo na análise em 230 nm mesmo que possuam somente absorção terminal.

Foi selecionado o comprimento de onda de 210 nm para o doseamento de cucurbitacinas totais expressas em DHCB e 230 nm para doseamento de cucurbitacinas totais expressas em CB.

#### 4.2.1.3. Escolha do solvente para a dissolução das amostras

Considerando a toxicidade e o custo da acetonitrila, conforme já mencionado, verificou-se a possibilidade da utilização de metanol no preparo das amostras ao invés de acetonitrila.

Nas análises por CLAE do extrato WE01DC 1,0 mg/mL com 2% de n-hexano, dissolvido em acetonitrila e metanol, comparou-se a ASC, empregando-se na detecção os comprimentos de onda 210 e 230 nm (Tabela 18).

Tabela 18: ASC de DHCB e CB da fração WE01DC 1,0 mg/mL dissolvida em CH<sub>3</sub>CN e MeOH.

	<i>ASC da DHCB</i>		<i>ASC da CB</i>	
	<i>Acetonitrila</i>	<i>Metanol</i>	<i>Acetonitrila</i>	<i>Metanol</i>
<b>210</b>	2114112	1831968	250431	194743
<b>230</b>	611605	523816	375366	326331

Observa-se que a leitura foi maior com a utilização de acetonitrila. Além disso, na análise dos cromatogramas obtidos observou-se a presença de pico com intensidade maior que os picos da amostra, presente apenas quando o metanol era utilizado como solvente.

Como já era esperado, a acetonitrila interferiu menos na leitura que o metanol, já que não apresenta absorção na região onde aconteceram as análises. A acetonitrila é transparente na região do espectro acima de 200 nm. Com base nestes dados, a acetonitrila foi mantida como solvente.

#### 4.2.1.4. Pureza dos picos

Foram realizados espectros de absorção no UV dos picos correspondentes a DHCB e CB na análise por CLAE, com o objetivo de se verificar a presença ou não de substâncias interferentes.

Muitas vezes pode acontecer da amostra conter outra substância que possua o mesmo tempo de retenção do analito, portanto, faz-se necessária a determinação da pureza do pico referente ao mesmo, o que pode ser realizado através de detecção dupla e acoplamento do CLAE com um espectrofotômetro de massas (HONG & SHAH, 2000).

O equipamento disponível para a realização deste trabalho apresenta como único recurso para a determinação da pureza dos picos a realização de espectro de absorção no UV da substância no momento em que ela chega ao detector.

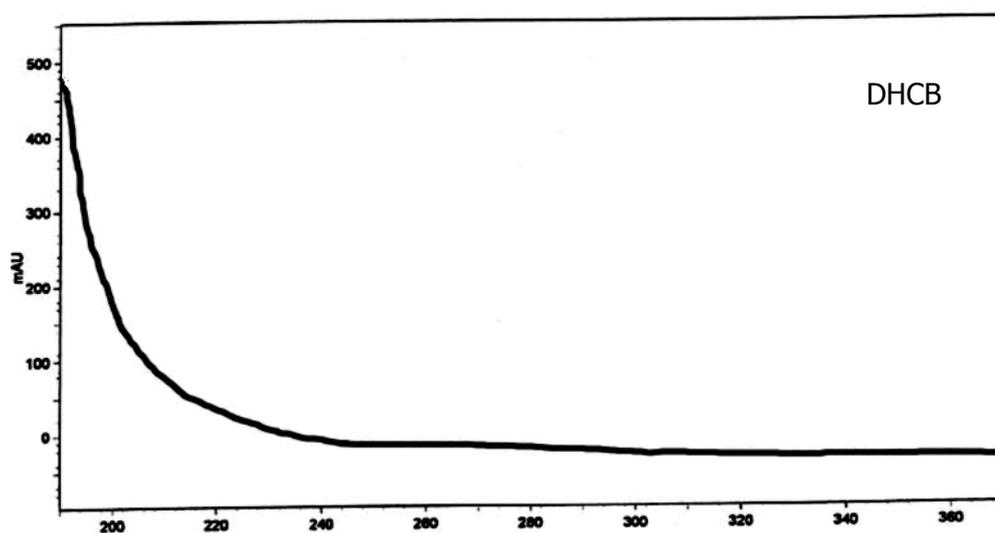


Figura 15: Espectro do pico correspondente a DHCB em análise por CLAE ( $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  40:60; 1,2 mL/min).

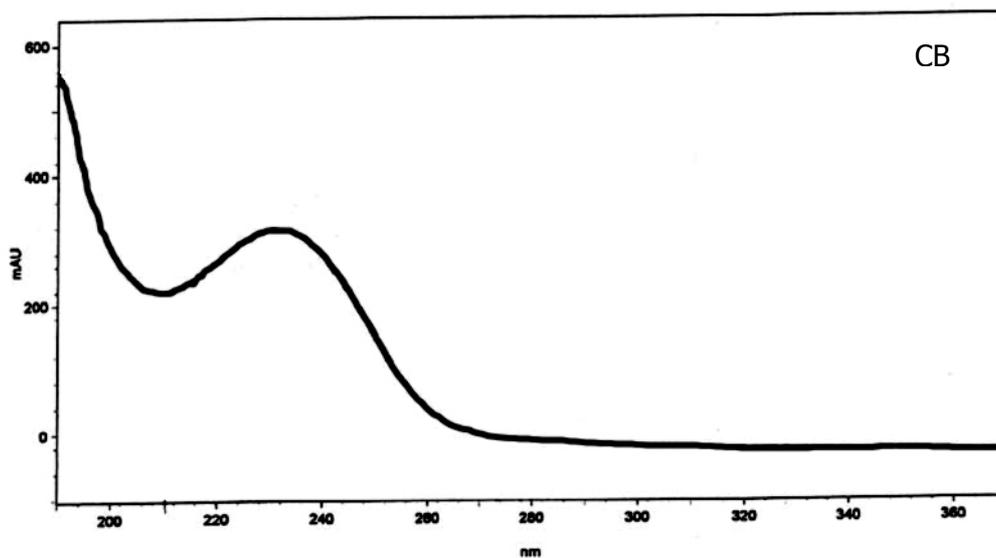


Figura 16: Espectro do pico correspondente a DHCB em análise por CLAE ( $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  40:60; 1,2 mL/min).

Através da análise dos espectros das Figuras 15 e 16, podemos ter um indicativo da pureza dos picos correspondentes a DHCB e CB. Deve-se ressaltar, entretanto que pode haver interferência de outras cucurbitacinas com igual comportamento em relação a absorção no UV.

#### **4.2.2. DETERMINAÇÃO DO MODO DE PREPARO DAS AMOSTRAS**

Outra parte importante do desenvolvimento de um método de análise é o preparo da amostra. No caso de plantas medicinais este passo é fundamental pelo elevado número de constituintes presentes em uma droga vegetal que podem interferir na seletividade do método e, no caso do CLAE, diminuir o tempo de vida útil da coluna cromatográfica. Além disso, deve-se garantir a total dissolução da amostra no solvente no qual a mesma será injetada no equipamento. A dissolução incompleta ou utilização de solvente muito polar pode resultar em distorção dos picos na análise por CLAE ou em bloqueio na passagem da luz em análises em espectrofotômetro ao UV (HONG & SHAH, 2000).

Considerando que a forma de preparo por maceração seguida de partição, utilizada no desenvolvimento do método, depende muito tempo, e um método de análise quantitativa para ser realmente útil tanto em pesquisa como em rotina deve ser rápido, foram testadas alternativas de preparo.

A partir desta fase do desenvolvimento foi utilizada raiz obtida da mesma planta, mas de outra coleta (WE02). A detecção foi realizada em 230 e 210 nm. Na análise dos resultados foi considerada a ASC e o coeficiente de variação da análise em triplicata.

Inicialmente foram testados três modos de preparo da amostra (Tabelas 19 e 20):

Modo 1: maceração com etanol a 50°C, seguida de partição com EP e DC.

Modo 2: maceração com etanol a 30°C, seguida de partição com EP e DC.

Modo 3: maceração direta com EP, seguida de maceração direta com DC a 30°C.

Além de avaliar a diferença entre os modos de preparo por partição a partir do extrato etanólico e extração direta por maceração com EP e DC, este experimento visa verificar a diferença entre a maceração com etanol realizada a 30 e 50°C. Como foi utilizada a mesma temperatura tanto na extração por maceração com etanol quanto por diclorometano, fica mais fácil a comparação entre os modos 2 e 3.

Tabela 19: Comparação entre o modo de preparo da amostra por maceração em etanol nas temperaturas de 30 e 50°C, seguida de partição (modos 1 e 2) e modo de preparo por extração direta com EP e DC (modo 3). Análise por CLAE.

	<b>Modo 1</b>	<b>Modo 2</b>	<b>Modo 3</b>	<b>Modo 1</b>	<b>Modo 2</b>	<b>Modo 3</b>
	<b>ASC da DHCB em 230 nm</b>			<b>ASC da CB em 230 nm</b>		
<b>Média (n = 3)</b>	502.208	317.297	288.584	368.700	228.699	192.443
<b>DP</b>	68.247	59.227	14.924	49.670	62.787	12.957
<b>CV (%)</b>	13,59	18,67	<b>5,17</b>	13,47	27,45	<b>6,73</b>
	<b>ASC da DHCB em 210 nm</b>			<b>ASC da CB em 210 nm</b>		
<b>Média (n = 3)</b>	1.867.529	990.027	1.061.545	298.376	194.087	152.958
<b>DP</b>	326.514	196.499	65.654	83.979	143.120	7.201
<b>CV (%)</b>	17,48	19,85	<b>6,18</b>	28,15	73,74	<b>4,71</b>

Tabela 20: Comparação entre o modo de preparo da amostra por partição com maceração nas temperaturas de 30 e 50°C (modo 1 e 2) e modo de preparo por extração direta com EP e DC (modo 3) pelo método espectrofotométrico.

	<b>Modo 1</b>	<b>Modo 2</b>	<b>Modo 3</b>
<b>Absorbância em 230 nm</b>			
<b>Média (n = 3)</b>	1,342	0,613	0,434
<b>DP</b>	0,9461	0,2661	0,0318
<b>CV (%)</b>	70,50	43,39	<b>7,33</b>

Os dados acima, tanto da análise por CLAE quanto por UV, nos permitem perceber que o modo de preparo por partição (modo 1) é o mais eficiente, resultando em áreas e absorbâncias maiores. No entanto, este apresentou muitas desvantagens. O tempo de preparo é muito maior, pela técnica ser mais complexa e pela necessidade de se evaporar etanol, que em relação ao diclorometano apresenta alto ponto de ebulição. Além disso, o coeficiente de variação foi muito maior indicando a baixa reprodutibilidade da técnica.

Como o modo 3 mostrou uma maior reprodutibilidade, mas uma aparente menor capacidade de extração que os anteriores, foi realizado experimento visando à comparação entre este modo de preparo e maceração com EP seguida de extração com DC em refluxo (modo 4). A extração com DC acontece em refluxo por 10 min. a fim de se aumentar a quantidade de cucurbitacinas extraídas. Desta vez as análises foram realizadas apenas no comprimento de onda de 230 nm (Tabela 21).

Tabela 21: Comparação entre o modo de preparo da amostra por maceração com EP e DC a temperatura de 30°C (modo 3) e por maceração com EP seguida de refluxo com DC (modo 4).

	<b>Modo 3</b>	<b>Modo 4</b>	<b>Modo 3</b>	<b>Modo 4</b>	
		<b>ASC da DHCB em 230</b>		<b>ASC da CB em 230</b>	
<b>Média (n = 3)</b>	251.737	355.128	168.136	243.620	
<b>DP</b>	12.086	29.922	10.280	10.846	
<b>CV (%)</b>	4,80	8,43	6,11	4,45	

A análise de variância (ANOVA) dos dados da Tabela 21 resultou em  $F_{\text{calculado}}$  maior que  $F_{\text{crítico}}$  [ $F_{0,01}(1, 4) = 21,20$ ] tanto para as análises de DHCB ( $F_{\text{calculado}} = 30,79$ ) quanto para análise de CB ( $F_{\text{calculado}} = 76,54$ ). Ou seja, existe diferença significativa [nível de significância ( $\alpha$ ) igual a 0,01] entre as duas formas de preparo da amostra testadas.

Portanto, o modo de preparo com refluxo foi mais eficiente na extração das cucurbitacinas a serem dosadas. Além disso, apresentou CV(%) menores que aqueles obtidos com o preparo da amostra por partição (modos 1 e 2 da Tabela 19). Sendo assim, o modo de preparo selecionado foi:

**Maceração com EP seguida extração com DC em refluxo**

O esquema geral do modo de preparação da amostra selecionado é apresentado na Figura 17.

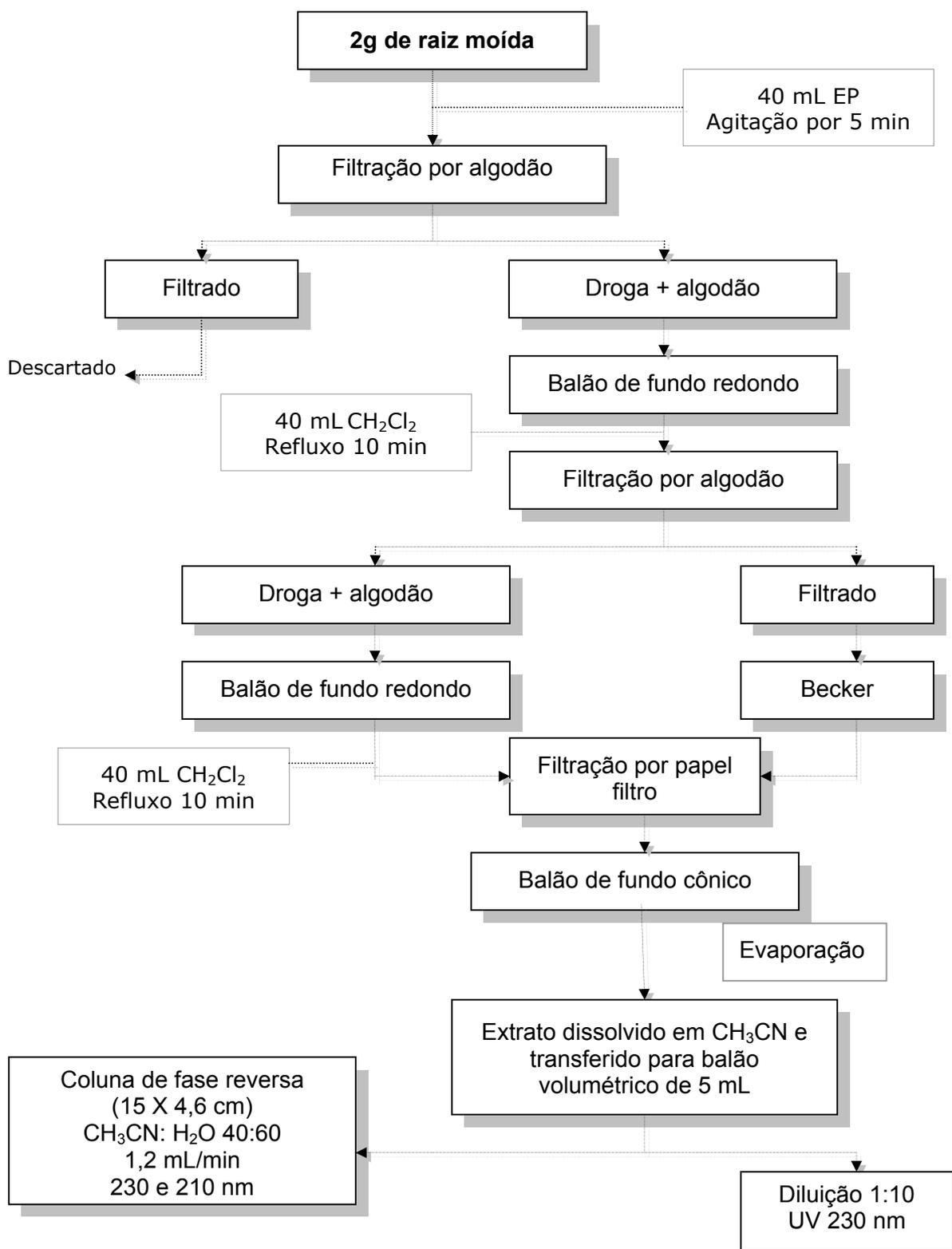


Figura 17: Esquema geral do modo de preparo da amostra selecionado.

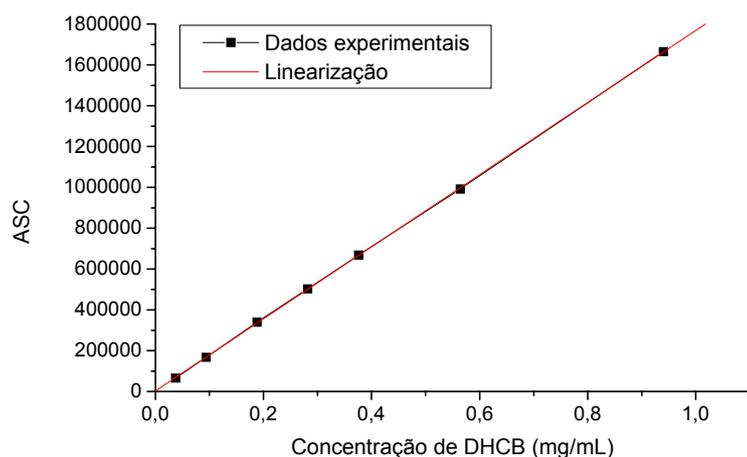
### **4.2.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO**

A quantidade da substância a ser analisada presente na amostra pode ser obtida por comparação do sinal obtido com aquele de um padrão interno ou externo. No caso da utilização de padrão externo, este é a própria substância a ser analisada, na forma pura, com a qual é elaborada uma curva de calibração, essencial para se determinar a linearidade tanto de métodos que utilizem CLAE quanto espectrofotômetro ao UV. No caso de análise por CLAE existe a opção de se utilizar um padrão interno, uma quantidade conhecida de uma substância é adicionada na própria amostra. Trata-se de uma substância não presente na amostra, que forneça um pico completamente separado dos demais e que seja adicionado em quantidade tal que forneça um pico de área ou altura semelhante ao fornecido pelo analito permitindo a comparação quantitativa entre eles (CIOLA, 1998). Neste trabalho a análise quantitativa foi realizada através da comparação com padrão externo. As cucurbitacinas DHCB e CB foram isoladas com este objetivo. Os resultados obtidos com a curva de calibração foram utilizados de duas maneiras: primeiro na verificação da linearidade e segundo na determinação da equação a ser utilizada no cálculo da porcentagem de cucurbitacinas. Este cálculo foi realizado também por comparação direta com o padrão.

#### **4.2.3.1. Di-hidrocucurbitacina B**

##### Análise por CLAE:

Todas as diluições assim como a solução estoque foram aplicadas a fim de se determinar a curva de calibração empregando-se como comprimento de onda de detecção 230 nm (Figura 18) e 210 nm (Figura 19).

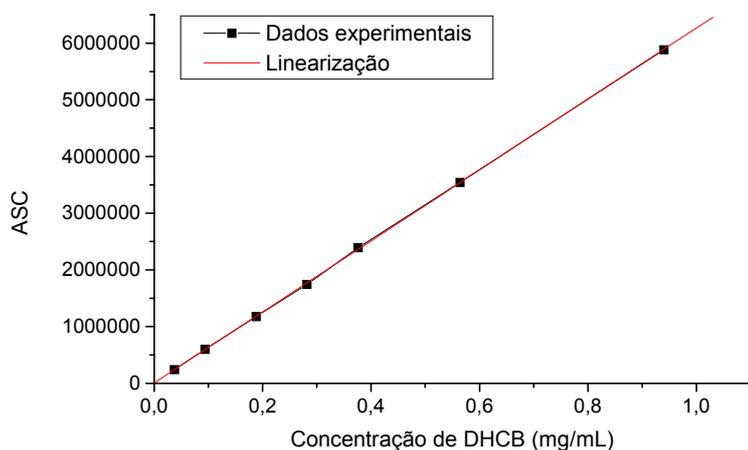


Conc. DHCB (mg/mL)	ASC
0,0376	65904
0,0940	167701
0,188	339462
0,282	502338
0,376	668412
0,564	991858
0,940	1664487

$$f(x) = 2531 + (1765980 \cdot x)$$

$$R = 0,99998$$

Figura 18: Gráfico correspondente à curva de calibração da DHCB por CLAE em 230 nm.



Conc. DHCB (mg/mL)	ASC
0,0376	240580
0,0940	602508
0,188	1177699
0,282	1742976
0,376	2391831
0,564	3544772
0,940	5884064

$$f(x) = 7237 + (6259580 \cdot x)$$

$$R = 0,99996$$

Figura 19: Gráfico correspondente à curva de calibração da DHCB por CLAE em 210 nm.

#### Análise em espectrofotômetro no UV:

As soluções utilizadas na análise por CLAE foram analisadas em espectrofotômetro no UV em 210 nm (Figura 20).

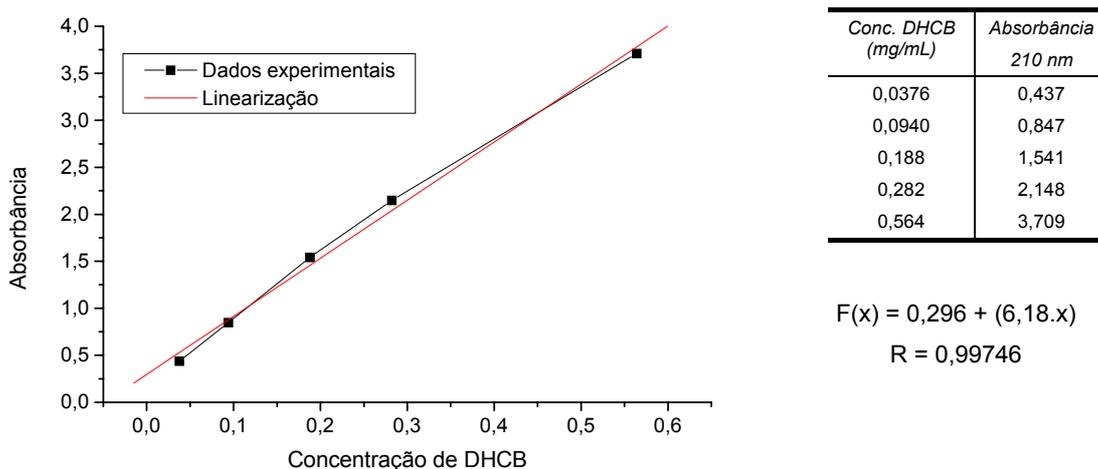


Figura 20: Gráfico correspondente à curva de calibração da DHCB por espectrofotometria no UV em 210 nm.

Foi excluído ponto correspondente à concentração de 0,0376 mg/mL por se encontrar fora da linearidade.

Através dos coeficientes de correlação podemos observar que as análises realizadas por CLAE forneceram excelente resultado ( $R > 0,9999$ ). Por outro lado, na análise por espectrofotometria de absorção no UV, com leitura em 210 nm, o coeficiente de correlação foi bem menor ( $R = 0,99746$ ) em virtude da absorbância da maior parte dos pontos estar acima de 2, gerando leitura instável e perda da linearidade. Uma alternativa seria diluir ainda mais a solução. Excluindo-se o ponto correspondente a concentração de 0,564 mg/mL, o coeficiente de correção é igual a 0,9995 e a função passa a ser:  $F(x) = 0,186 + (70,3 \cdot x)$ .

#### 4.2.3.2. Cucurbitacina B

##### Análise de CB por CLAE:

As diluições de CB mencionadas (Tabela 10) também foram analisadas por CLAE empregando-se os comprimentos de onda de 230 e 210 nm na detecção, a fim de se determinar as curvas de calibração para esta substância (Figuras 21 e 22).

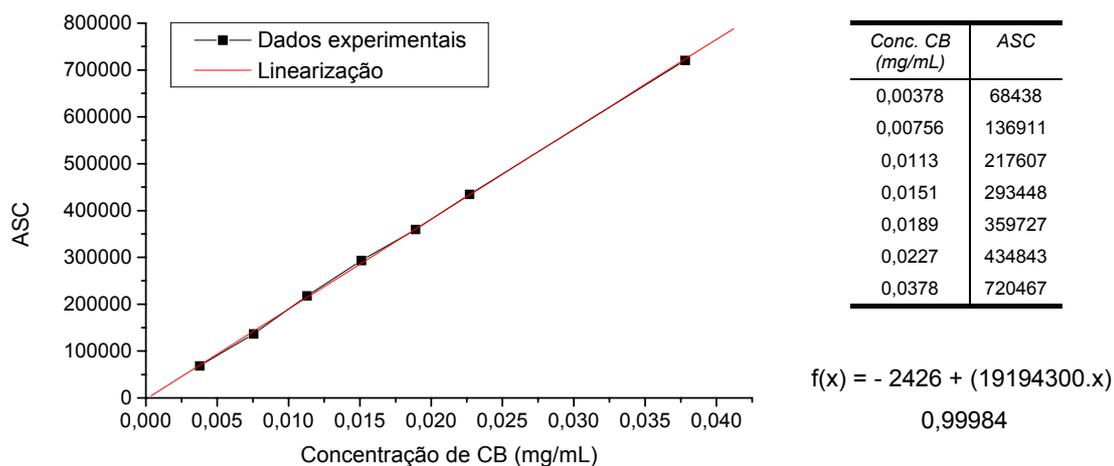


Figura 21: Gráfico correspondente à curva de calibração da CB por CLAE em 230 nm.

As mesmas soluções foram analisadas em 210 nm (Figura 22).

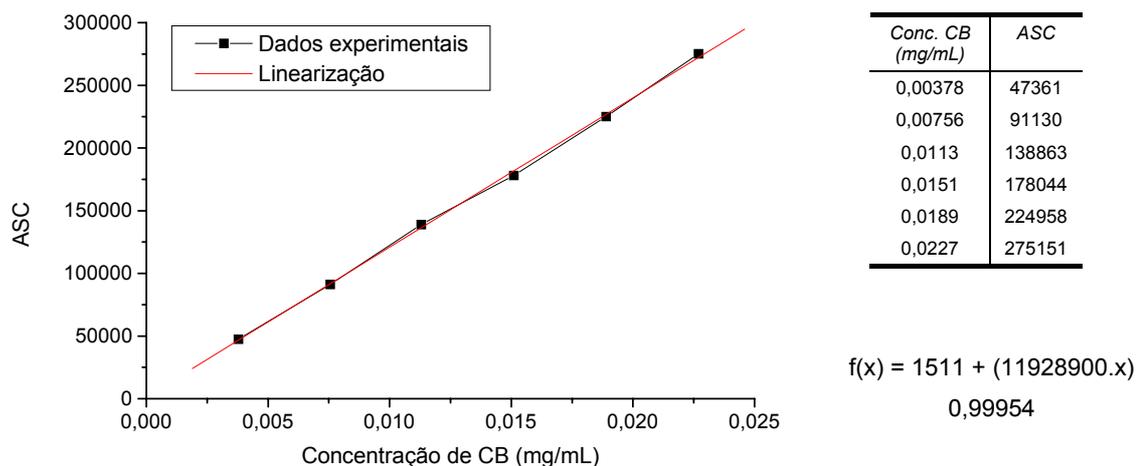


Figura 22: Gráfico correspondente à curva de calibração da CB por CLAE em 210 nm.

#### Análise por espectrofotometria no UV:

As mesmas soluções foram empregadas na elaboração da curva de calibração por espectrofotometria no UV, empregando-se o comprimento de onda 230 nm (Figura 23).

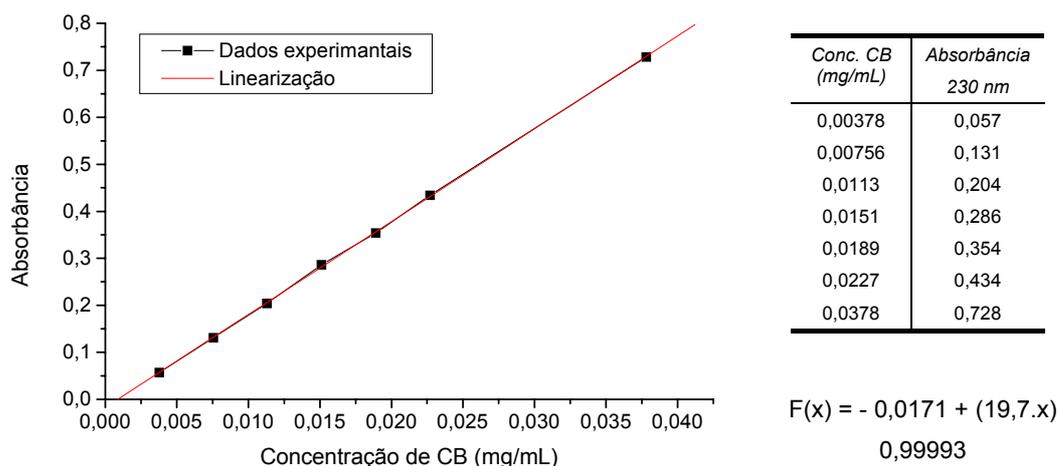


Figura 23: Gráfico correspondente à curva de calibração da CB por UV em 230 nm.

Em todas as análises realizadas com a CB foram obtidos coeficientes de correlação maiores que 0,999. Portanto, todas as equações obtidas têm boa relação com os dados obtidos nas análises.

#### 4.2.3.3. Fórmulas para cálculo da concentração

Conforme discutido anteriormente, com exceção da análise no UV em 210 nm da DHCB, cujo último ponto precisou ser excluído, todas as curvas de calibração apresentaram boa linearidade, comprovada no cálculo do coeficiente de correlação (Tabelas 22 e 23). Portanto, as equações obtidas por regressão linear podem ser utilizadas com segurança no cálculo da concentração de DHCB e CB realizadas nas mesmas condições da curva.

Tabela 22: Equação, fórmula e coeficiente de correlação para cada curva de calibração realizada por CLAE.

Substância	$\lambda$ (nm)	Função/ Fórmula	R
DHCB	230 nm	$f(x) = 2531 + (1765980.x)$ Conc. DHCB = $(ASC_a - 2531) / 1765980$	0,99998
	210 nm	$f(x) = 7237 + (6259580.x)$ Conc. DHCB = $(ASC_a - 7237) / 6259580$	0,99996
CB	230 nm	$f(x) = - 2426 + (19194300.x)$ Conc. CB = $(ASC_a + 2426) / 19194300$	0,99984
	210 nm	$f(x) = 1511 + (11928900.x)$ Conc. CB = $(ASC_a - 1511) / 11928900$	0,99954

Tabela 23: Equação, fórmula e coeficiente de correlação para cada curva de calibração realizada por espectrofotometria de absorção no UV.

<b>Substância</b>	$\lambda$ (nm)	<b>Função/ Fórmula</b>	<b>R</b>
<b>DHCB</b>	210	F(x) = 0,186 + (70,3.x) Conc. DHCB = (Ab <sub>a</sub> - 0,186)/ 7,03	0,9995
<b>CB</b>	230	F(x) = - 0,0171 + (19,7.x) Conc. CB = (Ab <sub>a</sub> + 0,0171)/ 19,7	0,99993

#### 4.2.3.4. Estabilidade das soluções padrão

Deve-se determinar a estabilidade da substância em análise na solução preparada de acordo com o método que está sendo avaliado. Durante o período em que as análises estiverem sendo realizadas deve-se ter certeza que não haverá degradação por hidrólise, fotólise ou adesão das substâncias à vidraria. Esta avaliação deve ser realizada por no mínimo 24 horas (HONG & SHAH, 2001). Neste sentido, foi avaliada a estabilidade das soluções de DHCB e CB através da análise por CLAE.

Tabela 24: Análise por CLAE, com detecção em 230 e 210 nm, da solução de DHCB.

<b>Dias</b>	<b>Detecção em 230 nm</b>			<b>Detecção em 210 nm</b>		
	<b>Média da ASC (n = 3)</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Média da ASC (n = 3)</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)</b>
1	300796	1047	0,35	1134533	54199	4,78
2	310743	13946	4,49	1104901	14026	1,27
3	312124	10700	3,33	1139037	9758	0,86
4	304276	5798	1,91	1128098	8122	0,72
5	307278	201,31	0,07	1099932	18691	1,70
6	303043	1478	0,49	1136635	20954	1,84
<b>Média (n = 3)</b>	306377			1123856		
<b>DP</b>	4463			17073		
<b>CV (%)</b>	1,46			1,52		

A análise de variância dos resultados da Tabela 24 resultou na aceitação da hipótese de que não existe diferença significativa ( $\alpha = 0,01$ ) entre os resultados obtidos nos diferentes dias. O teste F apresentou  $F_{\text{crítico}}$  igual a 5,06; para análise em 230 nm  $F_{\text{calculado}}$  foi igual a 2,81 e para a análise em 210 nm, 3,93.

O baixo coeficiente de variação também demonstra a estabilidade das soluções.

Tabela 25: Análise por CLAE, com detecção em 230 e 210 nm, da solução de CB.

<b>Dias</b>	<b>Detecção em 230 nm</b>			<b>Detecção em 210 nm</b>		
	<b>Média da ASC (n = 3)</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Média da ASC (n = 3)</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)</b>
1	339460	2185	0,64	202963	3267	1,61
2	329591	2993	0,91	211143	1322	0,63
3	336403	945	0,28	213130	5260	2,47
4	336521	4897	1,46	212353	3083	1,45
5	336721	1214	0,36	204435	3594	1,76
6	333740	1108	0,33	211241	3023	1,43
<b>Média (n = 3)</b>	335406			209211		
<b>DP</b>	3376			4357		
<b>CV (%)</b>	1,01			2,08		

A cucurbitacina B também apresentou estabilidade nas condições testadas. Neste caso o  $F_{\text{calculado}}$  foi igual a 4,97 para a análise em 230 nm e 3,93 para a análise em 210 nm. Estes valores são menores que o  $F_{\text{crítico}}$  igual a 5,06 ( $\alpha = 0,01$ ), portanto não há diferença entre os resultados analisados.

CLAE é um método adequado para determinação da estabilidade, visto que alterações químicas que aconteçam com a substância resultarão em produto com tempo de retenção provavelmente diferente da substância original. Não foram observados novos picos no decorrer das análises, nem alterações significativas do tempo de retenção.

Através da análise de variância e dos baixos coeficientes de variação encontrados podemos concluir que as soluções de DHCB a 0,94 mg/mL e CB a 0,189 mg/mL apresentaram estabilidade por seis dias a temperatura de cerca de 7°C.

### 4.3. Validação

Validar é garantir a confiabilidade analítica do laboratório, do método escolhido ou desenvolvido. Não validar é ter apenas um número não um resultado, pois qualquer análise está sujeita a diversos tipos de erros. Os erros que acontecem devido a problemas no método são considerados graves e devem ser eliminados por alterações na metodologia (LEITE, 1998).

Devem ser características básicas de qualquer metodologia: exatidão, precisão, segurança e higiene para o trato com o analito. A determinação da exatidão, concordância dos valores experimentais com o valor verdadeiro, e da precisão, concordância entre os vários valores experimentais obtidos, fazem parte do processo de

validação, cujo objetivo final é garantir a confiabilidade do resultado obtido assim como conhecer suas limitações (LEITE, 1998).

Somente métodos analíticos devidamente validados podem ser incluídos em monografias farmacopêicas, tanto que a Farmacopéia Americana traz um capítulo que trata especificamente de métodos de validação aplicáveis a qualquer tipo de método (HONG & SHAH, 2000; UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION, 2000).

O primeiro parâmetro a ser avaliado é a robustez, geralmente já avaliado durante o desenvolvimento do método. Estuda-se o efeito da alteração dos parâmetros de análise na seletividade. O passo seguinte é a determinação da linearidade. Para determinação da precisão são realizados ensaios de repetibilidade. A exatidão do método também precisa ser avaliada (HONG & SHAH, 2000; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1996).

#### **4.3.1. Linearidade**

Os dados a respeito da linearidade foram obtidos através das curvas de calibração. A DHCB apresentou boa linearidade nas concentrações de 0,0376 a 0,940 mg/mL por CLAE em 230 e 210 nm, e no UV em 230 nm. A linearidade no UV em 210 nm ficou entre as concentrações de 0,00376 e 0,0188 mg/mL. A CB nas concentrações entre 0,00378 e 0,0378 mg/mL por CLAE em 230 e 210 nm, e no UV em 230 e 210 nm. Estes dados estariam melhor fundamentados se tivessem sido coletados a partir de análises em triplicata. Mas conforme explicado na discussão da curva de calibração, não foi possível, por razões técnicas, preparar três soluções estoque de cada substância.

#### **4.3.2. Exatidão**

Existem diversas formas de se determinar a exatidão: através da comparação dos resultados da análise com aqueles obtidos com material padronizado de referência ou compará-los com resultados obtidos através de outro método já validado; e a quantificação da porcentagem do analito recuperado após sua adição à amostra em quantidade conhecida (HONG & SHAH, 2001). No caso da análise de drogas vegetais este teste é geralmente realizado adicionando-se quantidade conhecida do padrão à droga, ensaio este conhecido como recuperação.

Como não existe outro método que determine a quantidade de cucurbitacinas nas espécies em questão, assim como não existe uma droga vegetal referência, cuja

concentração das cucurbitacinas analisadas seja conhecida, a exatidão foi avaliada através da porcentagem de recuperação, após adição de 1,88 mg de DHCB e 0,136 mg de CB à raiz. A análise quantitativa foi realizada tanto por CLAE (Tabela 26) quanto por espectrofotometria no UV (Tabela 27).

A USP 24 (UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION, 2000) preconiza que este ensaio seja realizado em três níveis, ou seja, adicionar quantidade do padrão correspondente à 80, 100 e 120% da quantidade dosada. Como não se dispunha de quantidade suficiente dos padrões, foi realizado ensaio preliminar em apenas um nível (cerca de 100%), em triplicata.

Tabela 26: Recuperação (%) da DHCB e CB, por CLAE, em 230 e 210 nm cujas concentrações (mg de CB ou DHCB/ 100 g de raízes) foram calculadas através da curva de calibração.

$\lambda$ (nm)	230		210	
Substância	Conc. DHCB	Conc. CB	Conc. DHCB	Conc. CB
Conc. sem adição ( $\pm$ DP)	38,5 $\pm$ 3,7	2,59 $\pm$ 0,34	41,6 $\pm$ 2,5	2,37 $\pm$ 0,08
Conc. com adição ( $\pm$ DP)	77,3 $\pm$ 7,6	4,25 $\pm$ 0,04	67,4 $\pm$ 6,0	4,11 $\pm$ 0,29
<b>Recuperação (%)</b>	<b>90,4</b>	<b>77,6</b>	<b>76,1</b>	<b>76,8</b>

A recuperação média foi calculada a partir dos resultados obtidos com a DHCB em 210 nm CB em 210 e 230 nm, o que resultou em 76,8%. O valor obtido com a análise da adição de DHCB em 210 nm foi omitido pois no cromatograma a área correspondente à DHCB não pôde ser exatamente calculada em virtude da presença de ombro de origem ignorada.

Halawish e Tallamy (1993) determinaram a recuperação, também em um único nível, mas em diferentes etapas do método de preparo da amostra. Após purificação da amostra por extração em fase sólida, ou seja, todo o método de preparo da amostra, apresentou recuperação de 63,85%. Quando a recuperação foi determinada após a homogeneização das amostras, antes da extração em fase sólida, esta taxa foi de 84,5%. No caso do método desenvolvido, a amostra não foi submetida a tal processo de purificação sendo realizada apenas extração prévia com éter de petróleo. Portanto era esperada taxa de recuperação maior que 63,85 %.

Uma grande limitação desta técnica é o fato dela não avaliar a eficiência da extração com diclorometano a partir do conteúdo intracelular da raiz, já que as soluções dos padrões foram adicionadas diretamente sobre as mesmas moídas. Logicamente não havia possibilidade de se incorporar as substâncias ao local onde elas se encontram originalmente nas células da raiz.

O que pode ser concluído a partir desta análise é que há perda de cucurbitacinas durante o processo de preparo da amostra. Pode-se atribuir esta perda aos processos de filtração e/ou à extração prévia com éter de petróleo.

As mesmas soluções utilizadas na análise por CLAE foram diluídas (1:10) e analisadas em espectrofotômetro no UV nos comprimentos de onda de 230 nm, para cálculo da concentração de cucurbitacinas totais expressas em CB, e 210 nm, para cálculo da concentração de cucurbitacinas totais expressas em DHCB. Portanto, foram obtidos dois valores de recuperação: um para o resultado expresso em CB, obtido com a amostra onde foi adicionada somente a CB, e outro para o resultado expresso em DHCB, obtido com a amostra adicionada de quantidade conhecida de DHCB.

Tabela 27: Recuperação (%) de cucurbitacinas pelo método de espectrofotometria no UV com detecção em 230 e 210 nm, cujas concentrações (mg de cucurbitacinas totais expressas em CB e DHCB/ 100 g de planta) foram calculadas através da curva de calibração.

<b>Comprimento de onda</b>	<b>230 nm</b>	<b>210 nm</b>
<b>Resultado do doseamento</b>	<b>Conc. CB</b>	<b>Conc. DHCB</b>
Conc. sem adição ± DP	82,4 ± 8,3	366,4 ± 19,9
Conc. com adição ± DP	90,1 ± 7,0	407,9 ± 6,5
<b>% Recuperação</b>	<b>106,1%</b>	<b>98,7%</b>

Aparentemente estes resultados foram melhores que aqueles obtidos com a análise por CLAE, no entanto devemos fazer algumas considerações.

O método por espectrofotometria no UV não é capaz de distinguir as diferentes substâncias que compõem a amostra analisada, estão incluídas na análise no comprimento de onda de 210 nm todas as substâncias que absorvem radiação UV neste comprimento de onda, o mesmo acontece quando a análise é realizada em 230 nm. Portanto, o resultado obtido é sempre maior que aquele obtido na análise por CLAE em termos de concentração de cucurbitacinas.

Comparando-se o resultado encontrado no cálculo da porcentagem de recuperação pelo método espectrofotométrico, por volta de 100%, com aquele obtido na análise por CLAE, recuperação de 76,8%, pode-se concluir que esta recuperação de 100% pode ter sido obtido pela presença de interferentes na amostra. Já que a amostra utilizada foi a mesma e já se sabe que há perdas durante o processo.

Concluindo para se obter uma maior confiabilidade destes resultados é necessário repetir estas análises nos três níveis sugeridos pela literatura.

### 4.3.3. Precisão

De acordo com a USP (UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION, 2000) precisão é o grau de concordância entre resultados individuais obtidos pela aplicação do método analítico repetidas vezes em amostragens de uma amostra homogênea. Geralmente a precisão é expressa em termos de porcentagem relativa do desvio padrão de um número estatisticamente significativo de amostras, podendo ser determinada em três diferentes níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade também é chamada precisão intra-ensaio e é realizada através de diversas análises, pelo menos seis, da mesma amostra pelo mesmo analista, sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária consiste em se determinar as variações, que acontecem num mesmo laboratório, nos resultados obtidos por determinado método. Avalia-se a confiabilidade do método em condições diferentes daquelas em que foi desenvolvido. A reprodutibilidade avalia as diferenças entre resultados obtidos em diferentes laboratórios (HONG & SHAH, 2001). Como não se realizou nenhuma análise em outro laboratório ou equipamento a reprodutibilidade do método não foi testada.

No presente estudo foi avaliada a precisão intermediária e intraensaio do doseamento por CLAE e espectrofotometria no UV.

#### 4.3.3.1. Precisão intermediária

Em relação à precisão intermediária, avaliou-se a diferença entre as concentrações de CB e DHCB obtidas em 6 dias consecutivos. Analisou-se uma mesma amostra de raízes moídas de *W. ebracteata* em triplicata. A cada dia a amostra foi homogeneizada, preparada e analisada de acordo com o método desenvolvido (Figura 17). As condições experimentais – temperatura ambiente, analista, equipamentos, reagentes e parâmetros de análise – foram mantidas constantes.

As análises em espectrofotômetro de absorção no UV também foram realizadas nos comprimentos de onda de 230 e 210 nm. Foram analisadas as mesmas amostras utilizadas na análise por CLAE, mas diluídas 1:10.

Como as análises foram realizadas em dois comprimentos de onda – 210 e 230 nm – foi possível avaliar se há diferença, em relação à precisão na análise, ou seja, qual o comprimento de onda que fornece maior precisão. Além disso, é possível detectar diferenças na concentração de cucurbitacinas resultante.

Foi utilizada padronização externa, injetando-se todos os dias os padrões de CB e DHCB, em triplicata. O cálculo foi realizado também através da curva de calibração, comparando-se os resultados.

A comparação entre os dois métodos desenvolvidos, por CLAE e por espectrofotometria de absorção no UV, foi realizada através dos coeficientes de variação.

#### Análise por CLAE:

Os resultados obtidos nos seis dias em que a amostra foi analisada, realizando-se os cálculos da concentração de DHCB e CB por comparação entre a áreas destes e dos picos correspondentes no cromatograma da amostra, encontram-se na Tabela 28.

Na Tabela 29 constam os resultados da mesma análise cujo resultado foi obtido com base na curva de calibração.

Tabela 28: Teor de DHCB e CB em raízes de *W. ebracteata* (mg de DHCB ou CB por 100 g de raízes), por CLAE com detecção em 230 e 210 nm, cálculo pela ASC do padrão externo (n = 3).

<i>Dias</i>	<i>230nm</i>		<i>210 nm</i>	
	<i>DHCB Conc. ± DP (CV%)</i>	<i>CB Conc. ± DP (CV%)</i>	<i>DHCB Conc. ± DP (CV%)</i>	<i>CB Conc. ± DP (CV%)</i>
<b>Primeiro</b>	62,0 ± 0,88 (1,42)	3,79 ± 0,13 (3,41)	62,3 ± 1,33 (2,13)	5,43 ± 1,01 (18,66)
<b>Segundo</b>	62,5 ± 1,23 (1,96)	4,50 ± 0,52 (11,65)	64,4 ± 1,10 (1,70)	4,76 ± 0,04 (0,81)
<b>Terceiro</b>	63,9 ± 7,77 (12,18)	4,04 ± 0,19 (4,74)	58,1 ± 0,64 (1,09)	4,94 ± 1,01 (20,37)
<b>Quarto</b>	69,6 ± 0,43 (0,62)	4,29 ± 0,04 (1,02)	66,0 ± 0,51 (0,77)	4,85 ± 0,06 (1,25)
<b>Quinto</b>	65,4 ± 1,28 (1,96)	4,04 ± 0,07 (1,71)	62,5 ± 0,54 (0,87)	4,70 ± 0,05 (1,06)
<b>Sexto</b>	57,2 ± 2,70 (4,72)	3,80 ± 0,03 (0,86)	53,7 ± 3,13 (5,82)	4,71 ± 0,40 (8,40)
<b>Média*</b>	<b>65,0</b>	<b>4,13</b>	<b>60,2</b>	<b>4,93</b>
<b>DP*</b>	5,9	0,26	4,6	0,30
<b>CV(%)*</b>	<b>9,07</b>	<b>6,29</b>	<b>7,65</b>	<b>6,02</b>

A média, o desvio padrão e o coeficiente variação finais (\*) foram calculados com base na média das concentrações obtidas em cada dia. O coeficiente de variação reflete os erros do operador e limitações do método. Neste caso as possíveis fontes de erro foram:

- Granulometria da raiz analisada: No momento da pesagem da raiz tomou-se o cuidado de manter a homogeneidade granulométrica. No entanto, se existir diferença entre o conteúdo de cucurbitacinas nas diferentes partes da raiz e a mistura da raiz moída no momento da pesagem não for suficiente, esta diferença pode gerar resultado variável.
- Quantidade de substâncias extraídas: Diferenças na extração podem acontecer principalmente em função da granulometria, velocidade de agitação, temperatura.
- Perda de cucurbitacinas durante o processo: A quantidade de algodão utilizado na filtração pode fazer com que a perda seja diferente em cada análise. A fim de se evitar este acontecimento o algodão foi lavado com diclorometano após filtração. Pode haver perdas durante a transferência do extrato obtido após a evaporação do diclorometano para balão volumétrico de 5 mL.

Apesar destas considerações, pode-se afirmar que o método de análise quantitativa por CLAE permite boa precisão. A obtenção do extrato a partir de material vegetal pode explicar a variação obtida.

Tabela 29: Teor de DHCB e CB em raízes de *W. ebracteata* (mg de DHCB e CB por 100 g de raízes), por CLAE com detecção em 230 e 210 nm, cálculo pela curva de calibração (n = 3).

<i>Dias</i>	<i>230nm</i>		<i>210 nm</i>	
	<i>DHCB Conc. ± DP (CV%)</i>	<i>CB Conc. ± DP (CV%)</i>	<i>DHCB Conc. ± DP (CV%)</i>	<i>CB Conc. ± DP (CV%)</i>
<b>Primeiro</b>	55,8 ± 0,80 (1,43)	3,60 ± 0,12 (3,38)	60,0 ± 1,28 (2,14)	5,07 ± 0,92 (18,78)
<b>Segundo</b>	58,1 ± 1,15 (1,98)	4,14 ± 0,48 (11,56)	60,1 ± 1,03 (1,71)	4,45 ± 0,04 (0,82)
<b>Terceiro</b>	61,4 ± 7,52 (12,25)	3,80 ± 0,18 (4,70)	55,9 ± 0,61 (1,10)	4,66 ± 0,96 (20,51)
<b>Quarto</b>	69,4 ± 10,4 (14,9)	4,03 ± 0,04 (1,01)	63,0 ± 0,49 (0,78)	4,56 ± 0,06 (1,26)
<b>Quinto</b>	60,2 ± 1,18 (1,97)	3,81 ± 0,06 (1,69)	58,1 ± 0,51 (0,87)	4,25 ± 0,05 (1,07)
<b>Sexto</b>	51,9 ± 2,47 (4,75)	3,54 ± 0,03 (0,85)	51,6 ± 3,02 (5,85)	4,41 ± 0,37 (8,46)
<b>Média</b>	<b>59,5</b>	<b>3,82</b>	<b>58,1</b>	<b>4,57</b>
<b>DP</b>	5,92	0,23	3,97	0,28
<b>CV(%)</b>	<b>9,96</b>	<b>6,13</b>	<b>6,83</b>	<b>6,20</b>

A detecção em dois comprimentos de onda e a utilização de duas formas de se calcular o resultado final nos permite testar uma série de hipóteses:

A análise de variância aplicada aos resultados descritos nas tabelas 28 e 29 indica que:

1. No doseamento da DHCB não houve diferença significativa ( $\alpha = 0,01$ ) nos resultados obtidos com detecção em 210 e 230 nm, e com o cálculo sendo realizado por comparação direta com a ASC do padrão ou pela equação obtida através da curva de calibração. Portanto estatisticamente não existe diferença no resultado, seja ele obtido a partir de detecção a 210 ou 230 nm, e seja o cálculo realizado através da curva de calibração ou por comparação com padrão.
2. No caso do doseamento da CB, há diferença significativa ( $\alpha = 0,01$ ) nos resultados obtidos no doseamento de CB com detecção em 210 e 230 nm, e com o cálculo sendo realizado por comparação direta com a ASC do padrão ou pela equação obtida através da curva de calibração. Portanto foi realizada nova análise estatística.
3. Primeiramente foi testada a diferença entre os resultados obtidos através do cálculo realizado através da curva de calibração ou por comparação com padrão. Tanto na análise em 230 quanto na análise em 210 nm não houve diferença significativa nos resultados ( $\alpha = 0,01$ ).
4. Quando foi testado se existe diferença entre a determinação em 210 e 230 nm a análise de variância ( $\alpha = 0,01$ ) detectou diferença significativa entre os resultados obtidos. A análise em 210 nm resultou em concentração de CB maior que a análise em 230 nm. Este achado pode ser explicado pelo fato de existirem mais substâncias interferentes quando a detecção é realizada em 210 nm.

Portanto, foi selecionado o comprimento de onda de 230 nm.

#### Análise por espectrofotometria no UV:

As mesmas soluções analisadas por CLAE foram diluídas (1:10) e analisadas por espectrofotometria no UV. As análises foram realizadas no mesmo dia.

Tabela 30: Teor de cucurbitacinas totais (mg por 100 g de raiz) determinado através de espectrofotometria de absorção no UV.

<b>Dias</b>	<b>Cálculo pela curva de calibração</b>		<b>Cálculo pelo padrão</b>
	<b>DHCB – 210</b>	<b>CB – 230</b>	<b>CB – 230</b>
Primeiro	222	101	108
Segundo	149	78,9	77,6
Terceiro	180,3	90,0	82,6
Quarto	142	76,3	70,2
Quinto	177	88,6	86,1
Sexto	377	160	172,3
<b>Média</b>	207,9	99,1	99,5
<b>DP</b>	87,55	31,09	37,88
<b>CV(%)</b>	42,11	31,36	38,09

Os coeficientes de variação encontrados foram excessivamente elevados para análise quantitativa demonstrando a pouca precisão do método.

Os dois métodos não podem ser comparados em relação ao teor de cucurbitacinas fornecido, já que eles quantificam as mesmas de forma muito diferente. Através do CLAE pôde-se chegar a concentração de cada substância presente na amostra, já com o espectrofotômetro no UV todas as cucurbitacinas que absorvem radiação UV no comprimento de onda utilizado na detecção serão dosadas. Portanto, em 210 nm todas as cucurbitacinas são detectadas e o resultado é expresso em porcentagem de cucurbitacinas expressas em DHCB, já que o cálculo foi realizado com base na curva de calibração da DHCB.

Já em 230 nm acontece absorção máxima de cucurbitacinas com cadeia lateral insaturada. No entanto, como a DHCB encontra-se em grande quantidade na raiz, a absorção terminal da DHCB contribui para a absorção em 230 nm.

#### **4.3.3.2. Precisão intra-ensaio**

Todas as análises realizadas para determinação da precisão foram realizadas em triplicata, calculando-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação. Cada triplicata é uma avaliação da precisão intra-ensaio.

Considerando os resultados da Tabela 28, o coeficiente de variação foi de 0,62 a 20,4. Este último é considerado excessivamente alto. Os dois maiores coeficientes (20,4 e 18,7) foram obtidos na análise de CB em 210 nm. Como já foi discutido no item sobre

precisão intermediária e comprovado pela análise de variância, neste comprimento de onda a CB sofre influência de interferentes.

Considerando apenas os resultados da análise em 230 nm, a amplitude do coeficiente de variação foi de 0,62 a 12,18. Esta grande amplitude reforça a importância da análise em triplicata.

## 4.4. APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS

### 4.4.1. Doseamento de amostras comerciais de taiuiá e buchinha

O método desenvolvido foi aplicado em quatro amostras comerciais adquiridas como raiz de taiuiá, uma adquirida como cabeça-de-negro, e duas como buchinha. Destas apenas a primeira, denominada A1, apresentou perfil cromatográfico por CLAE semelhante ao da WE02MR (Figura 25). No entanto, macroscopicamente todas as raízes são semelhantes. A amostra A1 apresentou cor mais amarelada que as demais.

Inicialmente foi realizada a análise qualitativa, comparando-se os perfis cromatográficos em CCD (Figura 24) e CLAE (Figura 25).

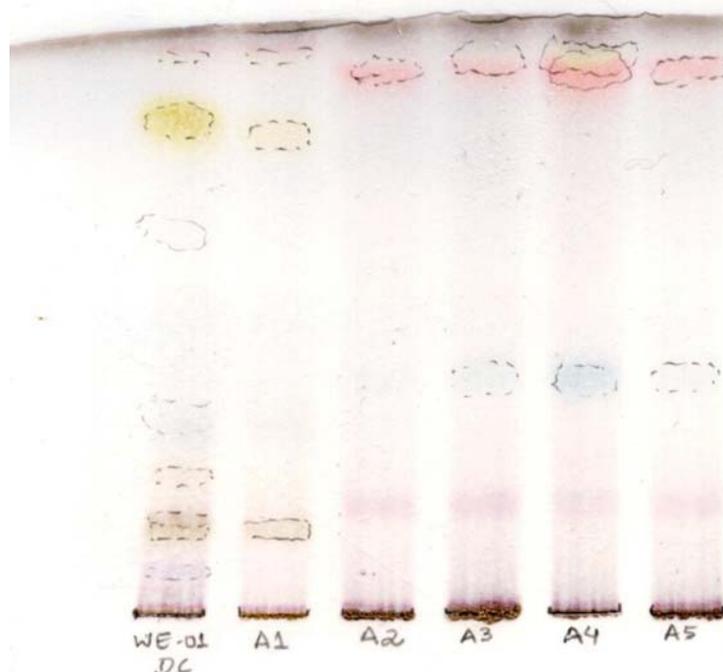


Figura 24: Análise das amostras comerciais analisadas por CCD (eluente EP:AcOEt:Isopropanol 20:10:0,5; fase estacionária: gel de sílica G F<sub>254</sub> e revelador: vanilina fosfórica).

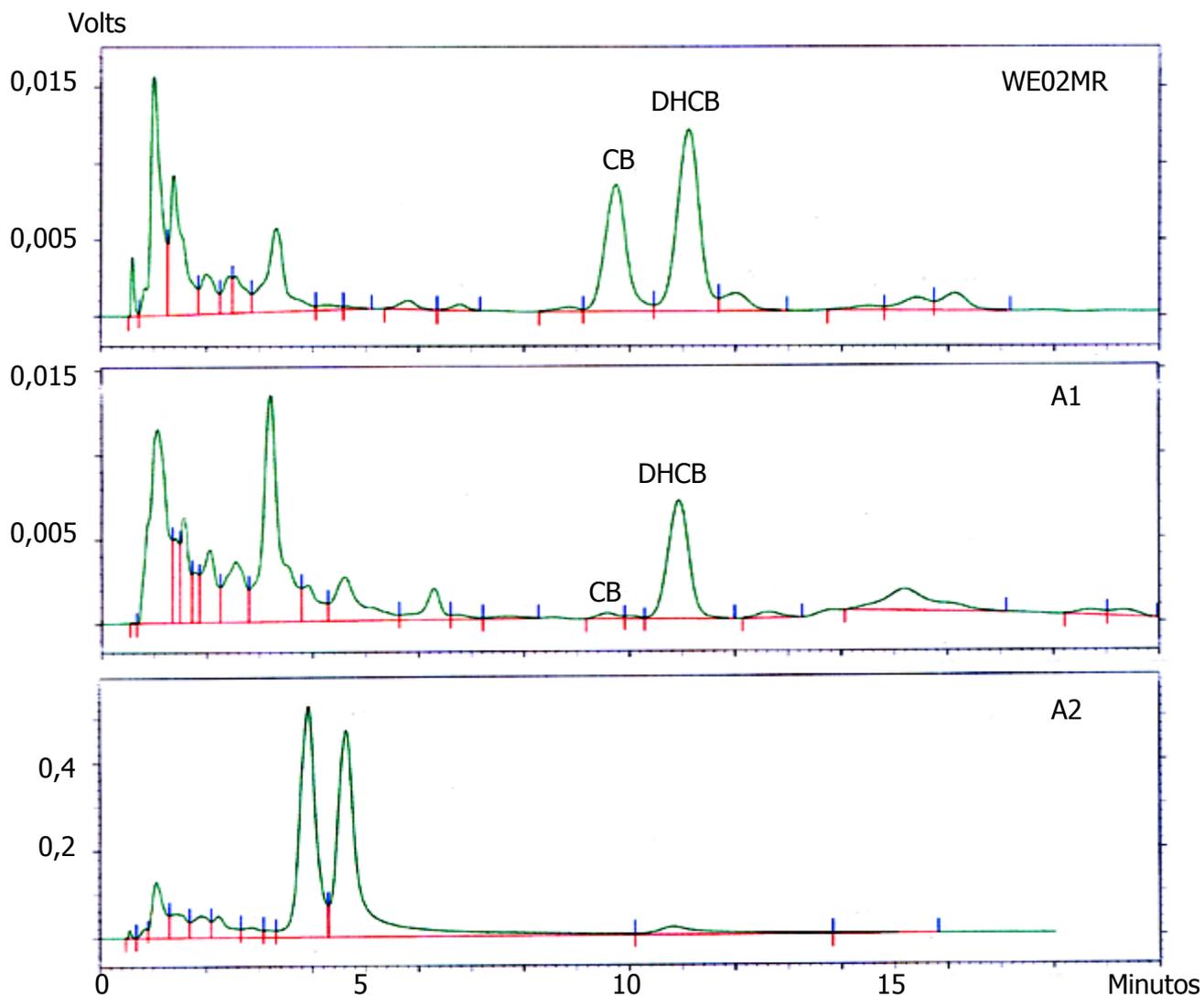


Figura 25: Comparação entre cromatogramas obtidos por CLAE das amostras comerciais A1 e A2, e WE02. Detecção em 230 nm.

As demais amostras comerciais (A2 – A5), não apresentadas na Figura 24, apresentaram perfil cromatográfico semelhante à amostra A2. Como nestas amostras foi detectada presença de substância de Tr semelhante à DHCB (pico 10 da amostra A2), esta foi dosada em todas as amostras (Tabela 31). No entanto, a correspondência em relação ao Tr não significa que a substância seja realmente DHCB, significa que nas condições testadas ela apresenta comportamento semelhante ao da DHCB. Pela CCD não se observou nenhuma mancha com comportamento cromatográfico ( $R_f$  e coloração) semelhante a DHCB.

Comparando-se o perfil cromatográfico da maioria das amostras comerciais com os dados da literatura a respeito de análise de taiuiá por CCD podemos concluir que não se trata de *C. tayuya* nem de *W. verticillata* (FARIAS, 1991; FARIAS e SCHENKEL, 1987).

Através da análise de amostras comerciais de taiuiá pode ser verificada a utilização de espécie cujo perfil cromatográfico por HPLC e CCD não permitiu sua identificação como *W. ebracteata*. A identificação desta espécie e dos seus constituintes químicos é uma necessidade real, pois todas as amostras utilizadas foram adquiridas como plantas medicinais para consumo humano. Além disso, as amostras comerciais apresentaram grande variabilidade em relação à concentração de substâncias.

Tabela 31: Concentração de DHCB e CB (mg da substância por 100 g de raiz) em amostras comerciais de taiuiá e cabeça-de-negro (A1 a A5), por CLAE com detecção em 230 nm, e cálculos realizados a partir da equação obtida pela curva de calibração.

<b>Amostra</b>	<b>Conc. DHCB</b>	<b>Conc. CB</b>
<b>A1</b>	26,4	0,1
<b>A2</b>	167	-
<b>A3</b>	30,4	-
<b>A4</b>	222	-
<b>A5</b>	122	-

A concentração de DHCB e CB encontrada na amostra comercial A1 - 26,4 e 0,1 mg/ 100 g de raízes, respectivamente - foi muito menor que aquela encontrada para WE02 - 65,0 e 4,13 mg/ 100 g de raízes. Deve-se levar em conta a grande diversidade entre indivíduos da mesma espécie vegetal.

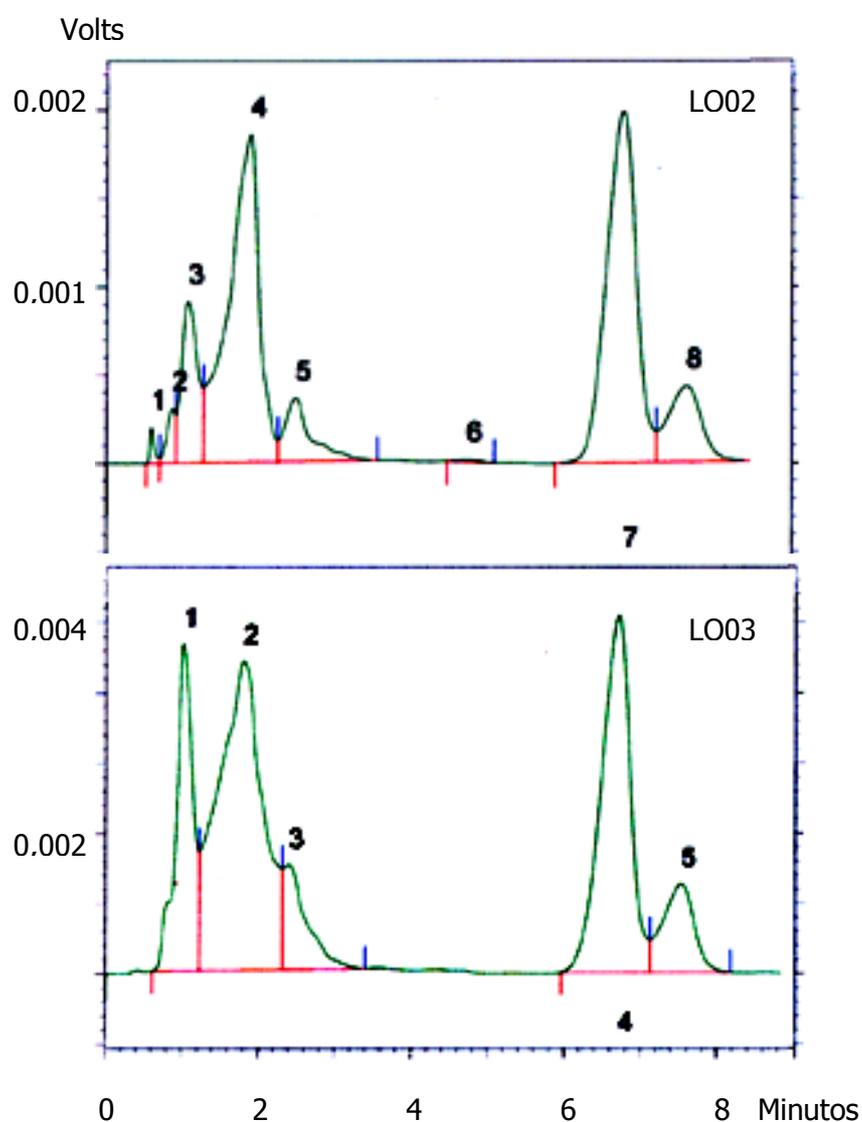
Há necessidade de estudos complementares que identifiquem as cucurbitacinas destas amostras. Estas raízes estão sendo comercializadas como taiuiá, sendo que não se conhece a sua identidade ou os riscos do uso destas substâncias para a saúde humana. A amostra A5 foi doada por uma indústria de fitoterápicos com laudo onde constava sua identificação botânica como *C. tayuya*. No entanto, pelos dados da literatura o perfil cromatográfico seria diferente se a raiz analisada fosse realmente *C. tayuya*. Esta espécie possui perfil diferente daquele obtido com a *W. ebracteata*, com maior quantidade de cucurbitacinas de cadeia lateral insaturada (FARIAS, 1991; SANTOS, SANTOS e SCHENKEL, 1996; FARIAS e SCHENKEL, 1987).

Foram adquiridas outras duas amostras comerciais de buchinha com o objetivo de verificar se os métodos desenvolvidos têm aplicação no doseamento de CB nesta espécie. As amostras preparadas conforme esquema apresentado na Figura 17, foram dosadas por CLAE e espectrofotometria de absorção no UV (Tabela 32).

Tabela 32: Análise quantitativa de amostras comerciais de *Luffa operculata*. Resultado da análise por CLAE em porcentagem de CB por 100 g de frutos; e por UV, cucurbitacinas totais expressas em CB por 100 g de frutos. Detecção em 230 nm.

		<b>Conc. CB <math>\pm</math> DP (CV %) por CLAE</b>	<b>Conc. Cucurbitacinas totais <math>\pm</math> DP (CV %) por UV</b>
<b>LO02MR</b>	Média (n = 3)	173 $\pm$ 4,27 (2,47)	172 $\pm$ 3,50 (2,03)
<b>LO03MR</b>	Média (n = 3)	65,8 $\pm$ 1,46 (2,21)	74,9 $\pm$ 12,2 (16,4)

Figura 26: Cromatogramas resultantes da análise de amostra comercial de buchinha aplicando-se o método desenvolvido.



O método por CLAE parece ser adequado para a análise de CB em amostras comerciais de frutos de buchinha. No entanto, há necessidade da realização dos ensaios de validação para esta planta. Em função da grande quantidade de cucurbitacinas

presentes nesta espécie, em relação à quantidade encontrada em *W. ebracteata*, foi necessária a utilização de apenas 0,2 g de frutos ao invés dos 2 g do método original. Além disso, durante o preparo da amostra foi utilizado apenas 10% do extrato diclorometânico. Este resultado já era esperado, pois no preparo dos extratos diclorometânicos, para serem utilizados no isolamento de padrões e testes farmacológicos, o rendimento da fração diclorometânica de *L. operculata* foi maior do que aquele obtido com *W. ebracteata* (Tabela 8). Outra diferença marcante entre os extratos, que pode ser observada na análise por CCD com revelação com vanilina fosfórica, é que no extrato de *W. ebracteata* prevalecem cucurbitacinas com cadeia lateral saturada e em *L. operculata*, cucurbitacinas de cadeia lateral insaturada (Figura 4).

Em relação ao teor de cucurbitacinas, observa-se uma grande variação entre as amostras. Este fato pode ser explicado pela utilização de frutos provenientes de diferentes indivíduos e/ou localidades. As plantas tendem a apresentar grande variação em relação à quantidade de seus constituintes químicos. O que reforça a necessidade da realização de doseamento em plantas destinadas ao consumo, principalmente, em se tratando de espécie tão tóxica como a *L. operculata*, cujos dados preliminares indicam variação da concentração de CB maior que 100%.

#### **4.4.2. Caracterização e doseamento de frações diclorometânicas**

Como os estudos farmacológicos realizados com plantas medicinais destinam-se a verificar a eficácia e/ou segurança no tratamento ou prevenção de doenças, o desejável é que os mesmos sejam realizados com extratos caracterizados, permitindo uma maior reprodutibilidade nos resultados. Muitos dos testes publicados foram realizados com extratos não padronizados, apesar de ser bastante conhecido o fato das plantas apresentarem grande variabilidade em relação à sua composição, já que esta depende de fatores genéticos, condições ambientais, data da coleta, forma de manuseio após a coleta e o modo de preparo dos extratos (BAUER e TITTEL, 1996; CALIXTO, 2000).

Em relação à quantificação, os métodos preferidos são CLAE e cromatografia gasosa, pois diversos componentes podem ser dosados em uma única análise. Em muitos casos é possível a utilização de técnicas fotométricas, mas elas não são suficientemente específicas; neste caso a utilização de derivatização pode aumentar suficientemente a especificidade e seletividade de um método fotométrico. A vantagem do método fotométrico está relacionada ao custo da análise. A tendência para o futuro é ir ainda mais além e se determinar a equivalência de extratos de plantas (BAUER e TITTEL, 1996).

No presente trabalho, as frações diclorometânicas (WE00DC, WE01DC e WE02MR) foram caracterizadas por CLAE, por comparação de alguns de seus picos com padrões de cucurbitacinas isoladas de *W. ebracteata*. Realizou-se análise qualitativa, quantificação relativa e doseamento de DHCB e CB por CLAE (Tabelas 33, 34 e 35) dos extratos testados farmacologicamente.

Tabela 33: Tempos de retenção (min.) obtidos através de análise por CLAE (CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 40:60, 1,2 mL/min., 230 nm) de substâncias de referência isoladas de *W. ebracteata* visando a caracterização da fração WE00DC utilizada em testes farmacológicos.

<b>Picos</b>	<b>Cucurbitacina</b>	<b>Padrão</b>	<b>WE00DC</b>	<b>WE01DC</b>	<b>WE02MR</b>
1	Cucurbitacina R	3,24	3,24	3,24	3,24
2	Cucurbitacina D	3,34	-	-	-
3	Cucurbitacina G/H	4,63	-	-	4,75
4	Cucurbitacina J/K	6,66	6,57	-	6,59
5	Cucurbitacina B	9,65	9,66	9,63	9,72
6	Di-hidrocucurbitacina B	11,07	11,03	11,01	11,11
7	Cucurbitacina E	15,85	15,41	-	15,62
8	Di-hidrocucurbitacina E	18,75	18,98	-	-

Como o tempo de retenção da cucurbitacina D está muito próximo daquele da cucurbitacina R não foi observado pico correspondente à primeira nas frações diclorometânicas. A detecção da di-hidrocucurbitacina E foi dificultada pela pequena quantidade desta no extrato, conforme já detectado por Farias e colaboradores (1993).

A análise por CLAE permite também que a porcentagem relativa de cada substância detectada seja calculada. A Tabela 34 apresenta esta porcentagem, média de duas determinações, nos comprimentos de onda de 230 e 200 nm.

Tabela 34: Porcentagem relativa das principais cucurbitacinas presentes nas frações WE00DC, WE01DC e WE02MR em relação ao total de substâncias detectadas em 230 nm e 200 nm.

<b>Picos</b>	<b>Cucurbitacina</b>	<b>230 nm</b>			<b>200 nm</b>		
		<b>WE00DC</b>	<b>WE01DC</b>	<b>WE02MR</b>	<b>WE00DC</b>	<b>WE01DC</b>	<b>WE02MR</b>
1	CR	24,18	5,0	7,88	20,88	-	6,18
5	CB	2,81	20,3	18,95	1,16	-	3,60
6	DHCB	16,27	21,4	24,99	20,61	-	46,59
7	CE	0,66	0,63	0,98	1,67	-	

Observação: WE01DC não foi analisada em 200 nm.

No comprimento de onda de 230 nm, as cucurbitacinas com cadeia lateral insaturada (CB, cucurbitacina D e cucurbitacina E) apresentam maior absorção em relação àquelas cuja cadeia lateral é saturada. Como a maior parte das cucurbitacinas presentes em *W. ebracteata* possuem apenas absorção terminal (DHCB, cucurbitacina R), esta análise foi repetida em 200 nm.

Conforme esperado, a proporção relativa de CB diminuiu muito. A diminuição da intensidade de absorção da cucurbitacina R pode ser explicada pelo fato dos picos correspondentes às cucurbitacinas R e D não estarem resolvidos.

Foi observada maior semelhança entre WE01DC e WE02MR que entre estas frações e a fração WE00DC. Como WE01DC e WE02MR provém da mesma planta, coletada em épocas e ano diferentes, e preparada por técnicas diferentes, o perfil por CLAE de WE01DC e WE02MR foi semelhante. Já a fração utilizada em ensaios farmacológicos (WE00DC) apresentou menor quantidade relativa de DHCB e CB (Tabela 35).

As cucurbitacinas – DHCB e CB – foram dosadas por CLAE, sendo o cálculo realizado pela curva de calibração (Tabela 35).

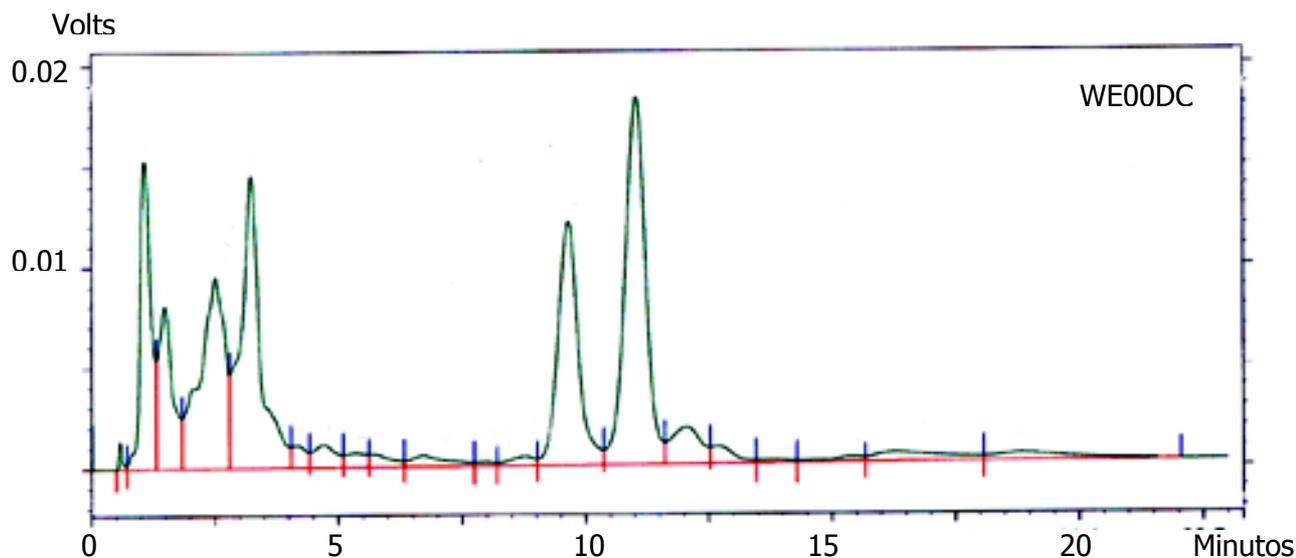


Figura 27: Cromatograma da fração WE00DC.

Tabela 35: Doseamento de DHCB e CB na fração diclorometânica utilizada em ensaios farmacológicos e no extrato preparado conforme metodologia desenvolvida,  $n = 3$ , resultado expresso em mg de DHCB ou CB em 100 g de extrato  $\pm$  DP (CV%).

<b>Cucurbitacina</b>	<b>WE00DC Conc. <math>\pm</math> DP (CV%)</b>	<b>WE01DC Conc. <math>\pm</math> DP (CV%)</b>
<b>DHCB</b>	44,7 $\pm$ 0,86 (1,92)	30,2 $\pm$ 1,00 (3,32)
<b>C B</b>	2,70 $\pm$ 0,03 (1,27)	1,80 $\pm$ 0,11 (6,12)

Desta forma temos, além do perfil cromatográfico da fração diclorometânica (Figura 21) e da porcentagem relativa de cada cucurbitacina, o doseamento de DHCB, componente majoritário, e CB, componente de importância toxicológica. Não se pode relacionar diretamente estes valores com a concentração presente nas raízes, pois cada um dos extratos foi preparado de uma forma diferente. Mas pudemos comprovar a utilidade do método no doseamento de extratos e caracterizar o extrato utilizado em testes farmacológicos.

Estudos anteriores com a fração diclorometânica de *W. ebracteata* (WE00DC) demonstraram potente atividade anti-nociceptiva ao inibir de maneira dose dependente contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e a segunda fase do teste da formalina, onde a dor é de origem inflamatória. Ainda, a WE00DC apresentou efeito anti-edematogênico ao inibir o edema de pata induzido pela carragenina em ratos (PETERS et al., 1997). Na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, a WE00DC

reduziu, de maneira significativa, os parâmetros inflamatórios avaliados como migração celular e formação do exsudato, onde houve redução na produção de PGE<sub>2</sub> (PETERS et al., 1999). Dando continuidade aos estudos realizados com a WE00DC, foi verificada redução significativa da incapacidade motora e produção de óxido nítrico na artrite induzida pelo zymosan. Num estudo complementar, observou-se que a WE00DC inibiu a atividade da ciclooxigenase 2 (COX-2) sem interferir com a atividade de COX-1 em células COS-7 transfectadas com cADN de COX-1 ou COX-2 humano. Além disso, a WE00DC não causou dano a mucosa gástrica (ANEXO 1).

O resultado por CLAE foi calculado como quantidade de CB em mg em 100 mg do extrato, já por espectrofotometria de absorção no UV esta unidade de concentração significa quantidade de cucurbitacinas totais expressas como CB, em mg, em 100 mg do extrato.

Tabela 36: Concentração de CB na fração LO01DC por CLAE e de cucurbitacinas totais expressas em CB, espectrofotometria no UV. Detecção em 230 nm.

<b>Método</b>	<b>CLAE</b>	<b>UV</b>
<b>Média ± DP (CV%)</b>	52,2 ± 4,28 (8,19)	87,8 ± 6,19 (7,06)

#### 4.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A quantificação de substâncias por CLAE pode ter diversas aplicações, portanto a partir do momento em que um método é desenvolvido, o mesmo pode ser empregado, por exemplo, no controle sazonal a fim de se verificar a melhor época de coleta; análise de raízes provenientes de diferentes locais a fim de se determinar a faixa de concentração em que as cucurbitacinas podem estar presentes; utilização do doseamento como parâmetro para determinação das condições de cultivo, etc.

Um grande problema relacionado ao uso de taiuiá é a parte da planta utilizada como antiinflamatória, pois a utilização indiscriminada de raízes inviabiliza a vida da planta. Deve existir sempre uma preocupação em relação à preservação da espécie. Neste estudo foi possível verificar que uma mesma raiz, se não arrancada na sua totalidade, mas sim cortada apenas na porção terminal, regenera, podendo ser colhida, posteriormente nova amostra. Existe ainda a possibilidade da utilização de cultura de células para produção das cucurbitacinas. Alguns trabalhos já descrevem esta

possibilidade (ATTARD e SCILUNA, 2001; HALAWEISH e TALLAMY, 1998). Halaweish e Tallamy (2001) utilizaram CLAE na quantificação de cucurbitacinas para otimização das condições da cultura de células.

Pode-se explorar o potencial das folhas de *W. ebracteata* como droga antiúlcera, testando, por exemplo, a relação entre esta atividade e a quantidade de flavonóides (GONZALEZ e DISTASI, 2002).

Ressalta-se o alto teor de cucurbitacina B presente nos frutos de *L. operculata*, sendo esta a substância majoritária em frações diclorometânicas desta parte da planta. Considerando a alta toxicidade da cucurbitacina B, são necessários estudos mais aprofundados sobre a segurança na utilização desta planta.

Nem sempre o método que extrai maior quantidade de substância é o mais indicado, a precisão é fundamental no caso de análise quantitativa, para se conseguirem resultados reprodutíveis que possam ser utilizados na aprovação ou reprovação de planta para uso humano.

Em relação à recuperação ressalta-se a importância de se repetir o ensaio realizando-se a análise também com a adição de 80 e 120% da quantidade de cucurbitacina encontrada na amostra, e não apenas 100% como foi realizado neste trabalho.

#### **4.6. PERSPECTIVAS**

Primeiramente, pretende-se continuar a pesquisa em conjunto com o Programa de Pós-graduação em Farmacologia com o objetivo de se determinar dose tóxica e a dose efetiva de extratos de *W. ebracteata* e *L. operculata*.

Conforme discutido no item 4.2.3.4., a análise por CLAE pode ser utilizada na determinação da estabilidade de cucurbitacinas. Seria interessante analisar a estabilidade em meio ácido visando simular a possível degradação no estômago. Muitas cucurbitacinas, inclusive DHCB e CB, possuem cadeia lateral acetilada, sendo assim existe a possibilidade de ocorrer hidrólise. Se esta hipótese for verdadeira, pode-se desenvolver método em cujo preparo da amostra esteja incluída hidrólise ácida ou básica. Conclusões mais completas poderiam ser obtidas através de trabalho em conjunto com a Farmacologia, que poderia comparar atividade de extratos hidrolisados e não-hidrolisados, assim como detectar possíveis diferenças entre a administração destes extratos por via oral e parenteral.

Em relação ao método propriamente dito, poderia ser testada extração com diferentes quantidades de solvente visando aumentar o teor de cucurbitacinas extraídas.

Uma modificação que seria extremamente interessante é a utilização de padrão interno, que poderia ser uma substância de mais fácil obtenção que as cucurbitacinas.

Um grande problema na análise quantitativa de plantas medicinais é a obtenção dos padrões, o que demanda tempo e recursos financeiros. Utilização de padrão interno de fácil obtenção tornaria o método mais rápido e econômico, pois, realizando a devida validação, não haveria necessidade da análise de padrões externos.

Poderia se ampliar as possibilidades de utilização do método, testando o mesmo com fitoterápicos.

Em relação à análise por espectrofotometria no UV, há necessidade de otimização. Uma alteração que poderia ser testada é a reação das cucurbitacinas com azul de tetrazol e leitura em 530 nm, com o objetivo de tornar o método mais seletivo (GÖRÖG, 1983).

Como se percebeu a comercialização de espécie de taiuiá não identificado e cujas raízes são semelhantes às da *W. ebracteata*, o próximo passo seria descobrir a fonte destas raízes e identificar botanicamente a espécie.

Em relação ao doseamento de CB em *L. operculata*, há necessidade de validar a técnica testada.

## 5. CONCLUSÕES

*W. ebracteata* é uma boa fonte de di-hidrocucurbitacina B, enquanto a partir de *L. operculata* pode ser isolada cucurbitacina B.

Os parâmetros da análise por CLAE selecionados foram: eluente CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 40:60; fluxo 1,2 mL/min. e detecção em 230 nm.

A detecção em 230 nm foi mais apropriada para a cucurbitacina B por apresentar menor interferência de outras substâncias presentes no extrato. O que foi demonstrado pelo fato da concentração de CB obtida com detecção em 210 nm ser significativamente maior que aquela obtida quando a detecção acontece em 230 nm.

Em relação ao modo de preparo da amostra, o melhor dentre os testados, foi refluxo com DC com prévia extração com EP sob agitação.

Em análise por CLAE com resultados comparados por análise de variância, foi determinada a estabilidade das soluções de DHCB e CB em geladeira (cerca de 7°C) por seis dias.

O cálculo para obtenção da porcentagem de DHCB e CB pode se realizado com base na curva de calibração e na comparação direta com padrão. Neste trabalho, não houve diferença significativa nos resultados obtidos por estas duas formas, em análise realizadas em seis dias consecutivos, sendo utilizada uma curva de calibração e análise diária de soluções padrão.

Em relação ao método por CLAE com detecção em 230 nm, a precisão intermediária encontrada – 6 a 10% - foi considerada satisfatória por tratar-se da análise de plantas medicinais. Como a precisão intraensaio apresentou grande variação - de 0,62 a 15% - grande parte do erro experimental pode ser atribuído ao método de preparo das amostras. A fim de se minimizar o erro experimental é imprescindível que o método seja realizado em triplicata desde a extração do material vegetal.

A recuperação, em média de 76,8%, após a adição de cerca de 100% da quantidade de cada cucurbitacina encontrada na amostra, demonstrou que existe perda de cucurbitacinas durante o preparo da amostra.

Quanto ao método de doseamento de cucurbitacinas totais por espectrofotometria de absorção no UV, tanto a precisão quanto a exatidão obtidas foram insatisfatórias, portanto este método precisa ser reformulado para sua aplicação no doseamento de cucurbitacinas em *W. ebracteata*. A forma de preparo da amostra para este método é ainda mais importante na precisão deste que na precisão por CLAE.

No doseamento de amostras de frutos de *L. operculata* os resultados obtidos por CLAE e espectrofotometria no UV foram mais compatíveis.

Através de ensaio preliminar sugere-se que cucurbitacinas podem sofrer decomposição em meio ácido. Frente a este fato seria interessante método que determinasse concentração de cucurbitacinas após hidrólise.

É possível a utilização do método desenvolvido na análise de *L. operculata* e outras espécies, além de *W. ebracteata*, denominadas de taiuiá. Podem ser necessárias alterações no modo de preparo da amostra, por exemplo, na quantidade de amostra pesada e realização de diluições.

Recomenda-se a realização CCD revelada com vanilina fosfórica em associação com o CLAE na análise de raízes cujo perfil cromatográfico por CLAE difere daquele encontrado para raízes de *W. ebracteata*. Desta forma pode-se obter informações a respeito da estrutura das substâncias detectadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIL, A.; MIRÓ, M.; JIMENEZ, J.; ANEIROS, J.; CARACUEL, M.D.; GARCIA-GRANADOS, A.; NAVARRO, M.C. Isolation of an anti-hepatotoxic principle from the juice of *Ecballium elaterium*. **Planta Medica**, vol.65, n.7, p.673-675, 1999.

ALMEIDA, F.R.C.; RAO, V.S.N.; MATOS, M.E.O. Inhibition of formaldehyde-induced arthritis by a purified fraction prepared from *Wilbrandia verticillata* which contains novel norcucurbitacin glucosides. **Brazilian Journal of Medical & Biological Research**, vol.22, n.11, p.1397-1400, 1989.

ALMEIDA, F.R.C.; RAO, V.S.N.; MATOS, M.E.O. Antiinflammatory, antitumor and antifertility effects in rodents of two nor-cucurbitacins glucosides from *Wilbrandia* species. **Phytotherapy Research**, vol.6, n.4, p.189-193, 1992.

ARISAWA, M.; HATASHITA, T.; NUMATA, Y.; TANAKA, M.; SASAKI, T. Citotoxic principles from *Chrysosplenium flagelliferum*. **International Journal of Pharmacognosy**, vol.35, n. 2, p. 141-143, 1997.

ARISAWA, M.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D.; CORDELL, G.A.; FARNSWORTH, N.R. Plant anticancer agents. Part 30. Cucurbitacins from *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.73, n.3, p.411-413, 1984.

ATTARD, E.G.; SCILUNA, A. *Ecbalium elaterium*: an in vivo source of cucurbitacins. **Fitoterapia**, vol.72, n.1, p.46-53, 2001.

BAUER, R. **Die HPLC-Analyse von Cucurbitacinhaltigen Arzneidrogen und Phorbolestern**. München. 1984. Dissertation (Doktor der Naturwissenschaften) Fakultät für Chemie und Pharmazie - Ludwig-Maximilians-Universität, München, Alemanha.

BAUER, R; BERGANZA, L.H.; SELIGMANN, O.; WAGNER, H. Cucurbitacins and flavone C-Glycosides from *Cayaponia tayuya*. **Phytochemistry**, vol.24, n.7, p.1587-1591, 1985.

BAUER, R.; TITTEL, G. Quality assessment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies. **Phytomedicine**, vol.2, n.3, p.193-198, 1996.

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

CHAMPNEY, R.; FERGUSON, N.M.; FERGUSON, G.G. Selected pharmacological studies of *Luffa operculata*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.63, n.6, p.942-943, 1974.

CORRÊA, P.M. **Dicionário d e plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, IBDF, 1984.

CROVETTO, R.M. Revisión crítica del género *Wilbrandia*. **Dawiniana**, vol.12, n.1, p.17-42, 1960.

DANG, G. van; RODE, B.M.; STUPPNER, H. Quantitative electronic structure-activity relationship (QESAR) of natural cytotoxic compounds: maytansinoids, quassinoids and cucurbitacins. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.2, n.5-6, p.331-350, 1994.

- DUNCAN, K.L.K.; DUNCAN, M.D.; ALLEY, M.C.; SAUSVILLE, E.A. Cucurbitacin E induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in protate carcinoma cells. **Biochemical Pharmacology**, vol.52, n.10, p.1553-1560, 1996.
- DUNCAN, M.D.; DUNCAN, K.L.K. Cucurbitacin E target proliferating endothelia. **Journal of Surgical Research**, vol.69, n.1, p.55-60, 1997.
- EDERY, H.; SCHATZBER-PORATH, G.; GITTER, S. Pharmacodynamic activity of elatericin (cucurbitacin D). **Arch. Int. Pharmacodyn.**, vol.130, p.315-335, 1961.
- FANG, X.; PHOEBE Jr., C.H.; PEZZUTO, J.M.; FONG, H.H.S.; FARNSWORTH, N.R. Plant anticancer agents, XXXIV. Cucurbitacins from *Elaeocarpus dolichostylus*. **Journal of Natural products**, vol.47, n.6, p.988-993, 1984.
- FARIAS, M.R. **Cucurbitacine aus *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (Cucurbitaceae)**. Bonn, 1991. Tese (Doktor der Naturwissenschaften) Mathematisch naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn, Alemanha.
- FARIAS, M.R.; SCHENKEL, E.P. Caracterização de cucurbitacinas em espécies vegetais conhecidas popularmente como taiuiá. **Ciência e Cultura**, vol.39, n.10, p.970-973, 1987.
- FARIAS, M.R.; SCHENKEL, E.P.; MAYER, R.; RÜCKER, G. Cucurbitacins as constituents of *Wilbrandia ebracteata*. **Planta Medica**, vol.59, n.3, p.272-275, 1993.
- FARIAS, M.R.; SCHENKEL, E.P.; VIANNA, R.M.J.; SANTOS, R.I. dos. Identificação de Amostras Comerciais de Raiz de Taiuiá como *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.1, n.2, 200-202, 1986.
- FARMACOPEIA Brasileira. São Paulo: Nacional, 1926. p.885.
- FIGUEIREDO, E.G.; RAO, V.S.; CIPRIANO, T.C.; MATOS, M.E. Effect of a purified fraction from *Wilbrandia* (cf) *verticillata* in carbon tetrachloride-induced hepatic injury. **Revista Brasileira de Farmácia**, vol.73, n.1, p.13-14, 1992.
- GONZALEZ, F.G.; DISTASI, L.C. Anti-ulcerogenic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. **Phytomedicine**, vol. 9, n. 2, p.125-134, 2002.
- GÖRÖG, S. **Quantitative analysis of steroids**. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1983. (Studies in analytical chemistry, vol. 5)
- GORSKI, P.M.; JAWORSKI, A.; SHANNON, S.; ROBINSON, R.W. Rapid thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography quantification of cucurbitacin c in cucumber cotyledons. **Hortscience**, vol.21, n.4, p.1034-1036, 1986.
- GUHA, J.; SEN, S. The cucurbitacins, a review. **Plant Biochemistry Journal**, vol.2, n.1, p.12-28, 1975.
- HALAWEISH, F.T.; TALLAMY, D.W. Quantitative determination of cucurbitacins by high performance liquid chromatography and high performance thin layer chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, vol.16, n.2, p.497-511, 1993.
- HALAWEISH, F.T.; TALLAMY, D.W. Production of cucurbitacins by cucurbit cell cultures. **Plant Science**, vol.131, n.2, p.209-218, 1998.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen**. Basel: Birkhauser, 1989. vol.8, p.363-375 e 711.

HIMENO, E.; NAGAO, T.; HONDA, J.; OKABE, H.; IRINO, N.; NAKASUMI, T. Structures of cayaponosides A, B, C and D, glucosides of new nor-cucurbitacins in the roots of *Cayaponia tayuya*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol.40, n.10, p.2885-2887, 1992.

HIMENO, E.; NAGAO, T.; HONDA, J.; OKABE, H.; IRINO, N.; NAKASUMI, T. Structures of new non-aromatized nor-cucurbitacin glucosides in the roots of *Cayaponia tayuya*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol.41, n.5, p.986-988, 1993.

HIMENO, E.; NAGAO, T.; HONDA, J.; OKABE, H.; IRINO, N. Studies on the constituents of the root of *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. I. Structures of cayaponosides, new 29-nor-1,2,3,4,5,10-hexa-dehydrocucurbitacin glucosides. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol.42, n.11, p.2295-2300, 1994a.

HIMENO, E.; NAGAO, T.; HONDA, J.; OKABE, H.; IRINO, N.; NAKASUMI, T. Studies on the constituents of the root of *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. II. Structures of cayaponosides, new 29-nor-2-11-dioxocucurbita-3,5-diene glucosides. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol.42, n.11, p.2301-2304, 1994b.

HIMENO, E.; NAGAO, T.; HONDA, J.; OKABE, H.; IRINO, N.; NAKASUMI, T. Studies on the constituents of the root of *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. III. Structures of cayaponosides, 29-nor-1,2,3,4,5,10-exadehydrocucurbit-6-ene glucosides. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol.42, n.11, p.2370-2372, 1994c.

HONG, D.D.; SHAH, M. In: CARTENSEN, J.T.; RHODES, C.T. (ed.) **Drug stability**. New York: Marcel Dekker, 2000. Cap. 11, p.329-384.

HUTT, T.F.; HERRINGTON, M.E. The determination of bitter principles in zucchini *Cucurbita pepo*. **Journal of the Science of Food & Agriculture**, vol.36, n.11, p.1107-1112, 1985.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Methodology**. 1996.

KAWAHARA, N; KURATA, A.; HAKAMATSUKA, T.; SEKITA, S.; SATAKE, M. Two novel cucurbitacins, neocucurbitacins A and B, from the Brazilian folk medicine "Buchinha" (*Luffa operculata*) and their effect in PEBP2 $\alpha$ A and OCIF gene expression in human osteoblast-like saos-2 cell line. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol.49, n. 10, p.1377-1379, 2001.

KEULEN, H.A.van. Fluorodensitometric estimation of cucurbitacin-C in leaves of *Cucumis sativus*. **Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition**, vol.31, n.2, p.129-138, 1981.

KONOSHIMA, T; TAKASAKI, M.; KOZUKA, M.; NAGAO, T.; OKABE, H.; IRINO, N.; NAKASUMI, T.; TOKUDA, H; NISHINO, H. Inibitory effects of cucurbitane triterpenoids on Epstein-Barr Virus activation and two stage carcinogenesis of skin tumor II. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, vol.18, n.2, p.284-287, 1995.

KUSUMOTO, K; NAGAO, T.; OKABE, H.; YAMAUCHI, T. Studies on the constituents of *Luffa operculata* Cogn. I. Isolation and structure of luperosides A-H, dammarane-type

triterpene glycosides in the herb. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol.37, n.1, p.18-22, 1989.

LAZARIS, D.; CHINOU, I.; ROUSSIS, V.; VAYIAS, C.; ROUSSAKIS, C. Chemical constituents from *Ecballium elaterium* L. (Cucurbitaceae) and their effects on a non-small-cell bronchial carcinoma line. **Pharmaceutical & Pharmacological Letters**, vol.8, n.1, p.50-51, 1998.

LAVIE, D; GLOTTER, E. The cucurbitanes, a group of tetracyclic triterpenes. **Fortschr. Chem. Org. Naturst.**, vol.29, p.307-362, 1971.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 3ª ed. Campinas, SP: Átomo, 1998. 224p.

MATOS, F.J. de A. **Plantas Mediciniais: Guia de seleção e emprego de plantas usadas no nordeste do Brasil**. 2ª ed., Fortaleza:Imprensa universitária – UFC, 2000. p.91.

MATOS, F.J. de A.; GOTTLIEB, O.R. Isocucurbitacina B, constituinte citotóxico de *Luffa operculata*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol.39, n.2, p.245-247, 1960.

MATOS, M.E.O.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A.; BRAZ-FILHO, R. Nor-cucurbitacin glucosides from *Wilbrandia* Species. **Phytochemistry**, vol.30, n.3, p.1020-1023, 1991.

MATSUO, K.; DEMILO, A.B.; SCHRODER, R.F.W.; Martin, P.A.W. Rapid high-performance liquid chromatography method to quantitate elaterinide in juice and reconstituted residues from a bitter mutant of *Hawkesbury watermelon*. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, vol.47, n.7, 2755-2759, 1999.

MENGUE, S.S.; SCHENKEL, E.P.; MENTZ, L.A.; SCMIDT, M.I. Especies vegetales utilizadas por embarazadas con el objeto de provocar la menstruación. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, vol.16, n.4, p. 251-258, 1997.

MIRÓ, M. Cucurbitacins and their pharmacological effects. **Phytotherapy Research**, vol.9, n.3, p.159-168, 1995.

MORAES, M.O.; FONTELES, M.C.; MORAES, M.E.A.; MACHADO, M.I.L.; MATOS, F.J.A. Screening for anticancer activity of plants from the Northeast of Brazil. **Fitoterapia**, vol.68, n.3, p.235-239, 1997.

MUSZA, L.L.; SPEIGHT, P.; MCELHINEY, S.; BARROW, C.J.; KILLAR, L.M. Cucurbitacins, cell adhesion inhibitors from *Conobea scoparioides*. **Journal of Natural Products**, vol.57, n.11, p.1498-1502, 1994.

MÜLLER, A.; WICHTL, M. Question of the cardiac activity of *Gratiola officinalis* L. **Pharmazeutische Zeitung**, vol.124, n.37, p.1761-1766, 1979.

NAKANO, K.; KANAI, Y.; MURAKAMI, K.; TAKAISHI, Y. TOMIMATSU, T. Nor-cucurbitacin glucosides from caputo nigri. **Phytochemistry**, vol.37, n.3, p.817-820, 1994.

NAKANO, K.; KANAI, Y.; MURAKAMI, K.; TAKAISHI, Y. Cucurbitacin glycosides from caput nigri. **Phytochemistry**, vol.39, n.1, p. 205-207, 1995a.

NAKANO, K.; KANAI, Y.; MURAKAMI, K.; TAKAISHI, Y. Cucurbitacin glycosides from cabeça-de-negro. **Phytochemistry**, vol. 39, n.1, p.209-211, 1995b.

NEUWINGER, H.D. **Afrikanische Arzneipflanzen und Jagdgifte**. Stuttgart: Wissenschaftliche Vergesellschaft, 1994.

OKABE, H.; NAGAO, T.; HACHIYAMA, S.; YAMAUCHI, T. Studies on the constituents of *Luffa operculata* Cogn. II. Isolation and structure elucidation of saponins in the herb. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol.37, n.4, p.895-900, 1989.

PAGOTO, C.L.A.; KAPLAN, M.A.C.; GOTTLIEB, O.R. Cucurbitacinas: fármacos ou toxinas? **Rev. Bras Farm.**, vol.77, n.3, p.113-124, 1996.

PANOSSIAN, A.; GABRIELIAN, E.; WAGNER, H. On the mechanism of action of plant adaptogens with particular reference to cucurbitacin R diglucoside. **Phytomedicine**, vol.6, n.3, p.147-155, 1999.

PANOSSIAN, A.; GABRIELIAN, E.; WAGNER, H. Plant adaptogens. II. Bryonia as an adaptogen. **Phytomedicine**, vol. 4, n.1, p.85-99, 1997.

PEREIRA, A.M.C.B.; FARIAS, M.R.; VARGAS, V.M.F. Study of the mutagenic activity of extracts of the plant *Wilbrandia ebracteata*. **Phytotherapy Research**, vol.10, n.6, p.512-516, 1996.

PEREIRA, B.M.R.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, N.A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas III – Atividade antiedematogênica. **Revista Brasileira de Farmácia**, vol.73, n.4, p.85-86, 1992.

PETERS, R.R.; FARIAS, M.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. **Planta Medica**, vol.63, n.6, p.525-528, 1997.

PETERS, R.R.; SALEH, T.F.; LORA, M.; PATRY, C.; BRUM-FERNANDES, A.J. de; FARIAS, M.R., RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* on carrageenan-induced pleurisy in mice. **Life Sciences**, vol.64, n.26, p.2429-2437, 1999.

PORTO, M.L. **Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul**, vol.8, n.31, p.1-64, 1974.

RAIKHLIN-EISENKRAFT, B.; BENTUR, Y. *Ecbalium elaterium* (squirting cucumber): Remedy or poison? **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, vol.38, n.3, p. 305-308, 2000.

RAO, V.S.N.; ALMEIDA, F.R.C.; MORAES, A.P.; SILVA, J.V.; NASCIMENTO, S.C.; MORAES, M.O. Evaluation of the purified fraction of *Wilbrandia verticillata* from antitumour activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, vol.86, p.43-46, 1991.

RAO, V.S.; SILVA, J.C.R.; MEDEIROS. Effects of antiinflammatory plant extracts on ovoimplantation in rats. **Phytotherapy Research**, vol.9, n.6, p.458-459, 1995.

RÍOS, J.L.; GINER, R.M.; JIMENEZ, M.J.; WICKMAN, G.; HANCKE, J.L. A study on the anti-inflammatory activity of *Cayaponia tayuya* root. **Fitoterapia**, vol.61, n.3, p.275-278, 1990.

RYU, S.Y.; CHOI, S.U.; LEE, S.H.; LEE, C.O.; AHN, J.W. Cytotoxicity of cucurbitacins in vitro. **Archives of Pharmacal Research**, vol.18, n.1, p.60-61, 1995.

- SALVIANO, P.A. Revisão sobre o uso terapêutico da *Luffa operculata* (L.) Cogniaux (cabacinha). **Revista Brasileira de Medicina**, vol.49, n.9, p.672-674, 1992a.
- SALVIANO, P.A. Tratamento da sinusite com preparação contendo *Luffa operculata* e solução fisiológica. **Revista Brasileira de Medicina**, vol.49, n.9, p.581-582, 1992b.
- SANTOS, R.I.; SCHENKEL, E.P. Caracterização cromatográfica de C-glicoflavonas em espécies de *Cayaponia*. **Ciência e Cultura**, vol.42, n.12, p.1207-1209, 1990.
- SANTOS, R.I. dos; SANTOS, M.A. dos; SCHENKEL, E. P. Analysis of the plant drug *Wilbrandia ebracteata* (Cogn.). **International Journal of Pharmacognosy**, vol.34, n.4, p.300-302, 1996.
- SCHENKEL, E.P.; FARIAS, M.R.; MAYER R.; BREITMAIER, E.; RUCKER G. Cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. **Phytochemistry**, vol.31, n.4, p.1329-1333, 1992.
- SCHOENMAKERS, P.J. **Optimization of chromatographic selectivity: a guide of method development**. Amsterdam: Elsevier, 1986. (Journal of chromatography library, vol.35)
- SEZIK, E. Research on the Turkish medicinal plant *Ecbalium eleaterium*. **Chemistry of Natural Compounds**, vol.33, n.5, p.541-542, 1998.
- SHOHAT, B.; BEEMER, A.M.; GITTER, S.; LAVIE, D. Antifertility activity of dihydroelatericin A in the female mouse. **Experientia**, vol.28, n.10, 1972.
- SNYDER, L.R.; GLAJCH, J.L.; KIRKLAND, J.J. **Practical HPLC Method Development**. New York: John Wiley & Sons, 1988.
- SILVA, E.A. Contribuição para o estudo farmacológico de *Luffa operculata* Cogn. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1983. APUD: SALVIANO, P.A. Revisão sobre o uso terapêutico da *Luffa operculata* (L.) Cogniaux (cabacinha). **Revista Brasileira de Medicina**, vol.49, n.9, p.672-674, 1992.
- STEWART, M.J.; STEENKAMP, V.; ZUCKERMAN, M. The toxicology of African herbal remedies. **Therapeutic Drug Monitoring**, vol.20, n.5, 1998.
- STUPPNER, H.; WAGNER, H. TLC and HPLC analysis of iridoid, cucurbitacin and phenol glycosides from *Picrorrhiza kurroa*. **Scientia Pharmaceutica**, vol.60, Jun 30, p.73-85, 1992.
- STURM, S.; STUPPNER, H. Analysis of cucurbitacins in medicinal plants by high-pressure liquid chromatography-mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, vol.11, n.2, p.121-127, 2000.
- TESSIER, A.M.; PARIS, R.R. Sur des euphorbiacées toxiques africaines à cucurbitacines. **Toxicological European Research**, vol.1, n.5, p.329-336, 1978.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION. United States Pharmacopeia. 24.ed. The National Formulary. 19.ed. Philadelphia: National Publishing, 2000.
- VLACHOS, P.; KANITSAKIS, N.N. fatal cardiac and renal failure due to *Ecbalium elaterium* (squirting cucumber). **Clinical toxicology**, vol.32, n.2, p.737-738, 1994.

WAGNER, H.; NORR, H.; WINTERHFF, H. Plant adaptogens I. Bryonia as an adaptogen. **Phytomedicine**, vol.1, p.63-76, 1994.

WITKOWSKI, A.; KONOPA, J. Binding of the cytotoxic and antitumor triterpenes, cucurbitacins, to glucocorticoid receptors of HeLa cells. **Biochimica et Biophysica Acta (Biochim Biophys. Acta)**, vol.674, n.2, p.246-255, 1981.

WITKOWSKI, A.; WOYNAROWSKA, B.; KONOPA J. Inhibition of the biosynthesis of DNA, RNA and protein in HeLa S3 cells by cucurbitacins, glucocorticoid-like cytotoxic triterpenes. **Biochemical Pharmacology**, vol.33, n.7, p.995-1004, 1984.

YESILADA, E.; TANAKA, S.; SEZIK, E.; TABATA, M. Isolation of an anti-inflammatory principle from the fruit juice of *Echallium elaterium*. **Journal of Natural Products**, vol.51, n.3, p.504-508, 1988.